



HAL
open science

Analyse structurale et dynamique par RMN des domaines N-terminaux des protéines DsbD et PilB de *Neisseria meningitidis* et de leur interaction

Marc Quinternet

► **To cite this version:**

Marc Quinternet. Analyse structurale et dynamique par RMN des domaines N-terminaux des protéines DsbD et PilB de *Neisseria meningitidis* et de leur interaction. Génie des procédés. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2008. Français. NNT : 2008INPL102N . tel-01753012

HAL Id: tel-01753012

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01753012>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine
(Spécialité : Génie des Procédés)

par
Marc Quinternet

Soutenue publiquement le 9 décembre 2008

Analyse structurale et dynamique par RMN des domaines
N-terminaux des protéines DsbD et PilB de
Neisseria meningitidis et de leur interaction

- Membres du jury -

Président :

M. Guy Branlant Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I

Rapporteurs :

M. Jean-Marc Lancelin Professeur, Université Claude Bernard, Lyon

M. Bruno Kieffer Professeur, Université Louis Pasteur/ESBS, Strasbourg

Examineurs :

M. Bertrand Friguet Professeur, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI

M. Manh-Thong Cung Directeur de Recherche, CNRS/INPL, Nancy

Mme Marie-Christine Averlant-Petit Chargée de Recherche, CNRS/INPL, Nancy

Invités :

Mme Sandrine Boschi-Muller Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy I

Mlle Pascale Tsan Maître de Conférences, Université Claude Bernard, Lyon

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS.....	4
AVANT PROPOS.....	5
PARTIE 1 - INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	6
CHAPITRE 1 : CONTEXTE BIOLOGIQUE	7
I. La protéine DsbD : généralités.....	8
II. Le domaine C-terminal de DsbD (cDsbD).....	10
II.1. Etudes structurales à l'état libre.....	10
II.2. Etudes structurales à l'état complexé.....	12
III. Le domaine transmembranaire de DsbD (tDsbD).....	13
III.1. Les thiorédoxines.....	13
III.1.1. Rôle des Trx	13
III.1.2. Mécanisme catalytique des Trx	14
III.1.3. Aspects structuraux des Trx	15
III.1.4. Spécificité de substrat des Trx.....	16
III.2. Le domaine transmembranaire de DsbD (tDsbD).....	17
IV. Le domaine N-terminal de DsbD (nDsbD).....	19
IV.1. Rôle fonctionnel de la formation et de l'isomérisation des ponts disulfure chez <i>Escherichia coli</i>	19
IV.1.1. La disulfide oxydase DsbA et son régénérateur DsbB	21
IV.1.2. La protéine DsbC et son homologue DsbG.....	22
IV.1.2.1. Fonction d'isomérase	23
IV.1.2.2. Fonction de chaperon.....	24
IV.1.3. nDsbD, activateur des voies de formation et d'isomérisation des ponts disulfure	25
IV.2. La voie de synthèse du cytochrome c.....	25
IV.2.1. Les cytochromes c bactériens et leurs systèmes de maturation	25
IV.2.1.1. Les cytochromes c bactériens	25
IV.2.1.2. Rôle des cytochromes c	26
IV.2.1.3. Les différents systèmes de maturation des cytochromes c	27
IV.2.2. La protéine DsbE.....	28
IV.3. Le système de réparation des protéines oxydées	30
IV.3.1. Oxydation des méthionines par les formes activées de l'oxygène (FAO).....	30
IV.3.2. Conséquence de l'oxydation des méthionines	31
IV.3.3. Les méthionine sulfoxyde réductases	31
IV.3.4. Le domaine N-terminal de PilB.....	33
IV.4. Le domaine N-terminal de DsbD : aspects structuraux	34
IV.4.1. Structure de nDsbD d' <i>E. coli</i> à l'état non lié	34
IV.4.2. Les différents modes d'interaction de nDsbD sous forme de complexe	35
IV.4.3. La fonction centrale de nDsbD	38
V. Conclusion et problématique	39
CHAPITRE 2 : LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE APPLIQUEE AUX PROTEINES	41
I. Les principes de la RMN et le phénomène de résonance	41
I.1. Les principes.....	41
I.2. Application aux protéines.....	43
II. Démarche pour l'étude structurale des protéines par RMN.....	43
II.1. Attribution séquentielle	44
II.2. Résolution d'une structure tridimensionnelle en solution	46
II.2.1. Les contraintes de distances spatiales	46

II.2.2. Les contraintes angulaires	47
II.2.3. Les contraintes orientationnelles	48
II.2.4. La modélisation moléculaire	49
II.3. Les avancées technologiques.....	50
II.3.1. L'appareillage	50
II.3.2. Le marquage des protéines	51
II.3.3. Les outils d'analyse des données RMN	52
II.3.3.1. Traitement des données spectrales brutes	53
II.3.3.2. L'analyse spectrale	53
II.3.3.3. Détermination des contraintes angulaires et orientationnelles	54
II.3.3.4. Le calcul des structures issues des traitements RMN.....	55
II.3.3.5. La validation de structure.....	55
II.3.3.6. Automatisation de la démarche RMN	55
II.3.3.6.1. Automatisation de l'attribution des résonances.....	55
II.3.3.6.2. Automatisation du calcul des structures RMN et calcul <i>ab initio</i>	56
II.4. Etude d'un complexe protéine-protéine	56
II.4.1. Cartographie basée sur la perturbation des déplacements chimiques	57
II.4.2. Le transfert d'aimantation	57
II.4.3. Echange de protons amidiques	58
II.4.4. Les expériences de Noesy filtrées	59
II.4.5. Autres méthodes.....	60
II.4.6. Les logiciels	60
III. Détermination de la dynamique des protéines par RMN	61
III.1. Phénomène d'échange	61
III.2. Les mécanismes de relaxation de spin	63
III.2.1. Principes de la relaxation de spin	63
III.2.2. Les expériences RMN.....	64
III.2.3. Le formalisme de Lipari et Szabo	65
IV. Conclusion	66
CHAPITRE 3 : OBJECTIFS DES TRAVAUX.....	67
CHAPITRE 4 : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	68
PARTIE 2 – RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	78
CHAPITRE 1 : ETUDE STRUCTURALE ET DYNAMIQUE DU MUTANT C103S DU DOMAINE N-TERMINAL DE LA PROTEINE DsbD DE <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i>	79
I. Introduction.....	79
II. Attribution séquentielle du mutant nDsbD _{C103S}	80
II.1. Etudes préliminaires	80
II.2. Premiers spectres	80
II.3. Résultats.....	81
II.4. Publication	81
III. Etude de la structure 3D en solution et de la dynamique interne du mutant C103S du domaine N-terminal de DsbD de <i>Neisseria meningitidis</i>	85
III.1. Etude de la structure en solution	85
III.1.1. Méthodes utilisées pour le calcul des structures.....	85
III.1.2. Analyse de la structure en solution de nDsbD _{C103S} obtenue par RMN.....	85
III.2. Analyse de la dynamique interne de nDsbD _{C103S}	86
III.3. Discussion	87
III.4. Publication	89
CHAPITRE 2 : ETUDE STRUCTURALE ET DYNAMIQUE DU DOMAINE N-TERMINAL DE LA PROTEINE PilB DE <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i>	103
I. Introduction.....	103

<i>II. Attribution séquentielle des formes réduite et oxydée de NterPilB</i>	104
II.1. Etudes préliminaires	104
II.2. Premiers spectres	105
II.3. Résultats	106
II.4. Publication	107
<i>III. Etude, en milieu aqueux, de la structure et de la dynamique interne des formes réduite et oxydée du domaine N-terminal de PilB de Neisseria meningitidis (NterPilB)</i>	111
III.1. Etude de la structure, en solution aqueuse, de NterPilB sous ses deux formes	111
III.1.1. Méthodes pour le calcul des structures	111
III.1.2. Analyse structurale des formes réduite et oxydée obtenues par RMN	111
III.2. Etude des paramètres de relaxation des noyaux ¹⁵ N du squelette peptidique des deux formes de NterPilB	113
III.3. Discussion	114
III.4. Publication	116
CHAPITRE 3 : ETUDE STRUCTURALE ET DYNAMIQUE DU COMPLEXE COVALENT ENTRE NDSBD ET NTERPILB DE NEISSERIA MENINGITIDIS	133
<i>I. Introduction</i>	133
<i>II. Données cinétiques</i>	134
<i>III. Attribution séquentielle du complexe covalent nDsbD-SS-NterPilB</i>	135
III.1. Production des échantillons	135
III.2. Premiers spectres	136
III.3. Résultats	137
III.3.1. Attribution du mutant C70S de NterPilB	137
III.3.2. Attribution du complexe covalent nDsbD-SS-NterPilB	138
<i>IV. Etude de la structure et de la dynamique interne du complexe covalent nDsbD-SS-NterPilB</i>	140
IV.1. Modélisation de la structure	140
IV.1.1. Méthodes pour le calcul des structures	140
IV.1.2. Analyse de la structure du complexe nDsbD-SS-NterPilB	141
IV.2. Etude de la dynamique interne	141
IV.3. Discussion	142
IV.4. Publication	143
PARTIE 3 - CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	166
PARTIE 4 - ANNEXE	172

Liste des Abréviations

CaM	Calmoduline
Cap-loop	Région couvercle de nDsbD
CMP	Cytochrome Maturation Protein
COSY	COrrelation SpectroscopY
CSA	Chemical Shift Anisotropy
CSI	Chemical Shift Index
CPMG	Carr Purcell Meiboom Gill
Cys	Cysteine
Da	Dalton
DTT	DiThioThréitol : $C_4H_{10}O_2S_2$
FAO	Formes Actives de l'Oxygène
FID	Free Induction Decay
FLHE	Phénylalanine Leucine Histidine Acide Glutamique
HADDOCK	High Ambiguity Driven protein-protein DOCKing
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
Met	Methionine
MetSO	Methionine sulfoxyde: L-[R,S]Met(O)
Msr	Méthionine Sulfoxyde Réductase
nDsbD	Domaine N-terminal de la protéine DsbD.
nOe	nuclear Overhauser effect
NterPilB	Domaine N-terminal de la protéine PilB de <i>Neisseria meningitidis</i>
NOESY	Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
PDB	Protein Data Bank
Pont S~S	Pont disulfure
RDC	Residual Dipolar Coupling
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROESY	Rotational nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
RX	Rayons X
TALOS	Torsion Angle Likelihood Obtained from Shift and sequence similarity
TOCSY	TOtal Correlation SpectroscopY
TROSY	Transverse Relaxation Optimized SpectroscopY
Trx	Thiorédoxine
Trx-like	de nature structurale similaire à Trx

Avant propos

--

Cette thèse entre dans le cadre d'une longue collaboration, de plusieurs dizaines d'années, entre l'équipe *Biostructures* du Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire et l'équipe *Enzymologie* du laboratoire Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire. Cette collaboration nancéienne est née du désir d'apporter des réponses d'ordre structural à des questions d'ordre enzymologique. Le thème « étude structurale de protéines » a démarré en 1999 avec l'implantation d'un spectromètre RMN à haut champ à Nancy.

La thématique générale abordée est celle du métabolisme d'oxydoréduction chez les bactéries et plus précisément celle du mécanisme de réparation des protéines oxydées. En effet, deux thèses portant sur la protéine MsrA d'*E. coli* et sur le domaine MsrB de PilB de *N. meningitidis* ont été soutenues précédemment (respectivement par N. Coudeville et A. Thureau). Ces travaux ont cherché à déterminer les bases structurales du mécanisme de reconnaissance de ces protéines envers un substrat de type protéine oxydée.

Des études ont montré que ces deux protéines (MsrA et MsrB) interviennent dans la réduction des fonctions sulfoxyde générées sur les résidus méthionine des protéines oxydées. Ces dernières dérivent des espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote engendrées, par exemple, par un stress oxydant ou une attaque immunitaire de l'hôte.

La protéine PilB, issue de la bactérie pathogène *N. meningitidis*, est constituée de trois domaines, dont deux portent une activité MsrA et MsrB et un, le rôle de régénération des domaines Msr. Le présent travail traite particulièrement des propriétés structurales et dynamiques de ce troisième domaine, situé en position N-terminale de PilB (NterPilB), et de son interaction avec son partenaire réducteur, le domaine N-terminal de la protéine DsbD (nDsbD).

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors du changement d'état d'oxydation de NterPilB ainsi que les facteurs structuraux et dynamiques qui induisent sa reconnaissance par la protéine nDsbD, nous avons entrepris une étude de ces deux partenaires par RMN.

- Partie 1 -

Introduction bibliographique

Chapitre 1 : Contexte biologique

Les bactéries du genre *Neisseria* sont des bactéries aérobies gram négatives, et les espèces *Neisseria gonorrhoeae* et *Neisseria meningitidis* sont des pathogènes obligatoires de l'homme. *N. gonorrhoeae* colonise les tractus génitaux masculin et féminin et est responsable de la blennorragie ou gonorrhée, alors que *N. meningitidis* est responsable de méningites et de septicémies. Pendant l'infection, les bactéries pathogènes sont exposées à un stress oxydant généré par les mécanismes de défense de l'hôte. Pour détecter et combattre ce stress oxydant, les bactéries pathogènes du genre *Neisseria* ont acquis différents mécanismes de défense, parmi lesquels certains sont également associés à leur virulence (Seib *et al.*, 2006 ; Seib *et al.*, 2004).

Les travaux de Taha *et al.* avaient, dès 1988, identifié un gène spécifique des bactéries du genre *Neisseria*, appelé pilB, et supposé responsable de leur virulence *via* un rôle dans la régulation de la piliation (Taha *et al.*, 1998). Depuis, différentes études ont montré que la protéine PilB ne joue aucun rôle dans la piliation mais serait impliquée dans la résistance au stress oxydant (Skaar *et al.*, 2002). PilB est composée de trois domaines : le domaine central et le domaine C-terminal, qui portent respectivement des activités méthionine sulfoxyde réductases (Msr) A et B (Olry *et al.*, 2002), et un domaine N-terminal (NterPilB) à activité disulfure oxydoréductase (Wu *et al.*, 2005). Les Msr catalysent la réduction des méthionines (Met) oxydées sous forme de méthionine sulfoxyde (MetSO) en Met en présence de thiorédoxine (Trx). Deux classes de Msr ont été caractérisées, chacune d'elles étant spécifique de la réduction de la fonction sulfoxyde d'un des deux diastéréoisomères de MetSO : la MsrA réduit spécifiquement l'isomère S de la fonction sulfoxyde alors que la MsrB est spécifique de la réduction de l'isomère R. Le domaine NterPilB possède la séquence WCPLC comparable aux centres disulfure rédox de type Trx avec son potentiel rédox de -0,230 V. Il a été montré que ce domaine N-terminal est capable de recycler l'activité réductase des domaines Msr isolés de PilB (Wu *et al.*, 2005) avec cependant une meilleure efficacité pour le domaine MsrB. La structure du domaine NterPilB a été résolue par radiocristallographie mettant en œuvre la diffraction des rayons X et a montré la présence d'un repliement de type Trx, et plus particulièrement de type DsbE avec une boucle additionnelle FLHE (Ranaivoson *et al.*, 2006). Des études récentes *in vitro* ont montré que le domaine N-terminal de PilB de *N. gonorrhoeae* était réduit par le domaine N-terminal de la protéine DsbD (nDsbD) d'*E. coli* (Brot *et al.*, 2006).

Les protéines Dsb (pour Disulfide bond) appartiennent à la famille des oxydoréductases. Elles catalysent la formation de ponts disulfure (ponts S~S) au niveau du périplasma des bactéries par deux mécanismes distincts : l'oxydation des cystéines (Cys) des protéines nouvellement secrétées et l'isomérisation des ponts disulfure non-natifs de ces mêmes protéines (Messens et Collet, 2006). Par

exemple, DsbA est une protéine monomérique qui, sous sa forme oxydée, possède un pont disulfure. Elle catalyse la formation de ponts disulfure au niveau des protéines nouvellement sécrétées dans le périplasma (Martin *et al.*, 1993), DsbA se retrouvant alors sous sa forme réduite. Elle sera ensuite réoxydée par la protéine transmembranaire DsbB qui va transférer ses électrons aux quinones sous forme oxydées (Bader *et al.*, 1999, Grauschopf *et al.*, 2003). DsbB constitue la seule protéine du système Dsb qui ne possède pas un repliement de type Trx (Jander *et al.*, 1994). La cytochrome oxydase réoxyde à son tour les quinones sous leur forme réduite et transfère ses électrons à l'oxygène moléculaire. Dans les protéines contenant plus d'une paire de Cys, DsbA peut introduire des ponts disulfure non natifs bloquant les protéines dans des conformations non natives. Les DsbC et DsbG catalysent l'isomérisation des ponts disulfure non présents dans la structure native des protéines, ces deux enzymes étant conservées sous leur forme réduite grâce à la protéine DsbD (Haebel *et al.*, 2002, Heras *et al.*, 2004). Cette protéine transmembranaire présente trois domaines et permet le transfert des électrons de la Trx cytoplasmique vers le périplasma. Ce système Dsb contient une protéine supplémentaire appelée DsbE et qui n'est pas impliquée dans le repliement des protéines nouvellement synthétisées mais dans la voie de maturation des cytochromes c. Cette enzyme est également réduite par DsbD (Stirnemann *et al.*, 2005).

Le premier chapitre de cette thèse a pour objectif de présenter le contexte biologique de cette étude et notamment les phénomènes de formation des liaisons disulfure au sein du périplasma. Pour mieux comprendre l'importance des protéines mises en jeu, le plan de cette première partie sera axé sur l'analyse de la fonction et des caractéristiques structurales de DsbD et de ses partenaires biologiques. Cette protéine se trouve à la croisée des chemins de diverses voies métaboliques ayant toutes un point commun : la transmission d'électrons vers une cible spécifique.

I. La protéine DsbD : généralités

DsbD est une protéine qui peut être divisée en trois domaines et qui permet de transférer les électrons provenant du cytoplasme vers le périplasma des bactéries gram négatives. Cette transmission se fait par une cascade d'échanges de ponts disulfure *via* les trois domaines de la protéine et implique ainsi trois paires de cystéines (une paire pour chacun des trois domaines) (Stewart *et al.*, 1999). Ce mécanisme a pu être identifié grâce à l'utilisation de cellules délétées du gène *dsbD* et transformées par des plasmides permettant la complémentation en chacun des trois domaines de la protéine. Il a été montré que ces 3 domaines interagissaient alors l'un avec l'autre pour restaurer l'activité DsbD. L'utilisation d'enzymes ou de protéines mutantes a permis de montrer que les électrons cheminaient des extrémités C-terminale vers N-terminale, soit de tDsbD à nDsbD *via* cDsbD (Katzen *et al.*, 2000).

DsbD a pour particularité d'interagir, *via* ses domaines transmembranaire et N-terminal, avec des protéines présentant un repliement de type Trx ou « Trx-fold » (Riestsch *et al.*, 1997, Stirnemann *et al.*, 2006). Ce repliement se caractérise par la présence d'un feuillet à 4 brins β , flanqué de 3 hélices. Des variations s'observent autour de cette définition de base et ce sont notamment les nombres de brins β et d'hélices α qui peuvent différer, l'organisation générale du repliement restant similaire.

Différentes études ont montré que cette protéine est impliquée dans trois voies métaboliques importantes pour la bactérie (Figure 1) :

- la voie de biogenèse des cytochromes *c* ;
- le système chaperon et d'isomérisation des ponts disulfure ;
- le système de réparation des protéines oxydées.

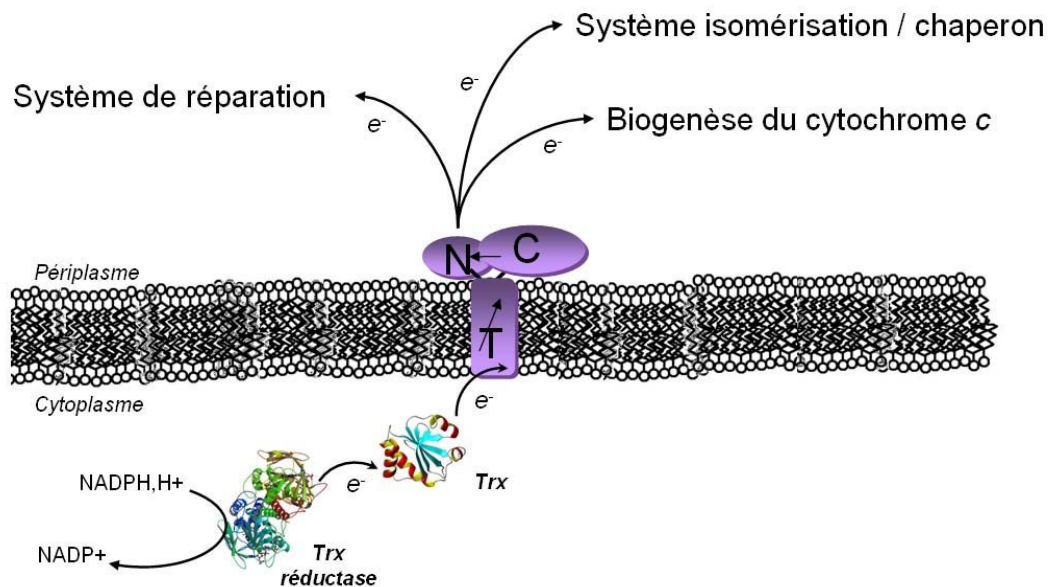


Figure 1 : Représentation schématique du mode de fonctionnement de la protéine DsbD. Les électrons du NADPH,H+ sont cédés à la Trx réductase. Ils vont par la suite rejoindre, via la Trx, le domaine tDsbd (T), le domaine cDsbd (C), le domaine nDsbd (N). Ils seront finalement distribués dans trois voies métaboliques distinctes.

C'est la protéine DsbD d'*E. coli* qui a été la plus largement étudiée, notamment d'un point de vue structural. Les premières études bio-informatiques réalisées sur DsbD suggéraient que son domaine C-terminal (cDsbd) appartenait à la superfamille structurale des Trx, notamment du fait, d'une part, de la présence d'une signature CXXC du site actif, typique de ce repliement et, d'autre part, de sa similarité de séquence avec le domaine Trx de PDI (pour Protein Disulfide Isomerase (Missiakas *et al.*, 1995; Kemmink *et al.*, 1996; Kemmink *et al.*, 1997). De la même façon, la partie centrale de DsbD a été rapidement identifiée comme étant un domaine transmembranaire à huit hélices (Stewart *et al.*, 1999; Chung *et al.*, 2000; Gordon *et al.*, 2000).

Cependant, la topologie du domaine N-terminal (nDsbd) demeurerait incertaine en l'absence de structures RX ou RMN. La séquence de ce domaine ne contient pas de signature du type Trx (CXXC) mais possède un motif CX₅C. En 2002, deux équipes ont résolu et de façon indépendante la structure de nDsbd. Goulding *et al.* ont déterminé la structure RX d'une forme oxydée et non liée de la protéine alors que, peu après, Haebel *et al.* ont publié une étude structurale globale du complexe entre nDsbd et l'homodimère DsbC (nDsbd-SS-DsbC). Contrairement aux autres protéines de la famille des Dsb, à savoir DsbA, DsbC, CcmG/DsbE et cDsbd qui possèdent toutes un repliement de type Trx, nDsbd comporte un repliement de

type immunoglobuline (Ig) consistant en une structure de type « β -sandwich » formé de deux feuillets antiparallèles. Les deux cystéines actives Cys103 et Cys109 relient deux brins β voisins dans la forme oxydée de nDsbD. De plus, une région en forme de « couvercle » et allant des résidus 68 à 72, protège ces cystéines et défavorise les réactions rédox non spécifiques. La structure du domaine cDsbD a, elle aussi, été caractérisée par cristallographie et présente, comme attendu, un repliement de type Trx. Il possède une fonction de transporteur d'électrons entre les deux domaines tDsbD et nDsbD (Kim *et al.*, 2003; Stirnimann *et al.*, 2006).

A ma connaissance, il n'existe pas d'études structurales précises sur une espèce bactérienne autre qu'*E. coli*. Dans ce qui suit, chacun des domaines de la protéine va être présenté selon sa fonction principale et va servir de point de départ pour la présentation des voies métaboliques dans lesquelles il est impliqué.

II. Le domaine C-terminal de DsbD (cDsbD)

Ce domaine permet de transférer les électrons provenant de tDsbD vers nDsbD. Son rôle est donc crucial dans le fonctionnement général de la protéine puisque le transfert direct entre tDsbD et nDsbD est impossible, ce dernier ne pouvant interagir qu'avec des repliements de type Trx. Des études structurales par RX et par RMN ont en effet conduit à caractériser le domaine cDsbD comme un repliement Trx. Il est constitué de 4 brins β et de 6 hélices α (Kim *et al.*, 2003).

A priori, ce rôle essentiel de transduction est le seul identifié pour cDsbD. Cependant, la façon précise avec laquelle se fait le cheminement des électrons *via* les trois domaines de DsbD demeure irrésolue mais doit impliquer, de toute évidence, des changements conformationnels significatifs pour que les paires de cystéines interagissent entre elles. Le domaine périplasmique cDsbD doit interagir avec le domaine tDsbD pour lequel il a été montré que les cystéines pointent vers la face cytoplasmique de la membrane plasmique, comme requis, par ailleurs, pour la réception des électrons provenant de la thiorédoxine (Katzen *et al.*, 2003). De plus, cDsbD interagit avec le domaine périplasmique soluble nDsbD (Rozhkova *et al.*, 2004). Ces observations posent la question de la flexibilité conformationnelle de cDsbD, question à laquelle l'étude de ce domaine à l'état non-lié ne donnerait pas une réponse convaincante.

II.1. Etudes structurales à l'état libre

Les structures de cDsbD sous ses deux formes, réduite et oxydée, ont été résolues par RX (Figure 2). Les auteurs de cette étude ont conclu que les différences structurales entre les deux états rédox étaient mineures. De plus, la comparaison des structures de cDsbD avec les thiorédoxines humaine et d' *E. coli* donne à penser que cDsbD est très rigide. Ce sont en effet la faible réorientation de la position des chaînes latérales et la faible variation de la distance $S\gamma$ - $S\gamma$ avec l'état rédox qui ont amené à de telles suggestions (Stirnimann *et al.*, 2006).

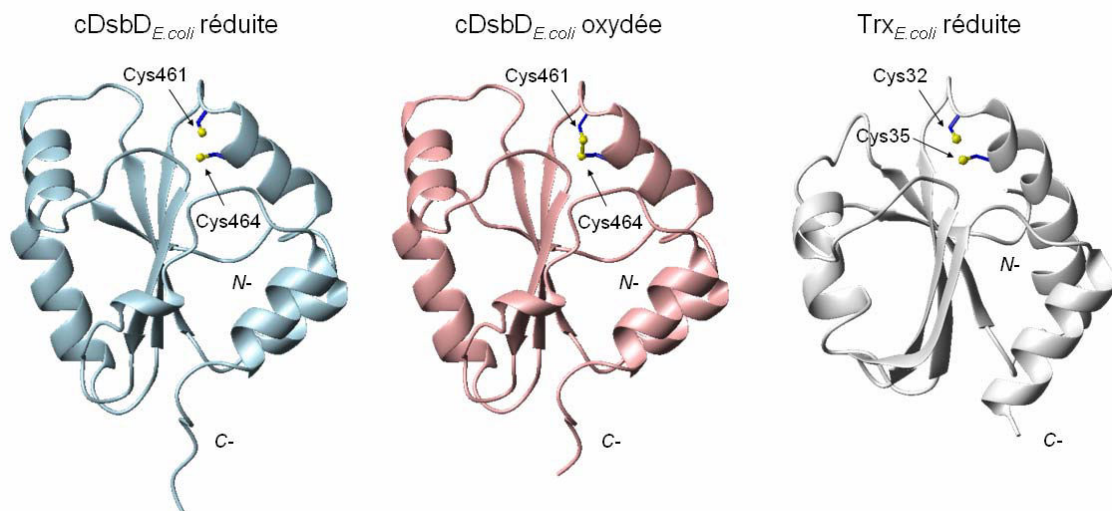


Figure 2 : Représentation des structures RX des formes réduite et oxydée de cDsbD (résolues par Kim *et al.*, 2003) et de la structure RMN de la forme réduite de Trx1 d'*E. coli* (résolue par Jeng *et al.*, 1994). Les chaînes latérales des résidus cystéines sont représentées par des bâtons bleus et les atomes de soufre par des boules jaunes. Les extrémités N- et C-terminales des protéines sont aussi indiquées. Les numéros d'accès PDB sont les suivants : 2fwe, 2fwf et 1xob.

Une étude par RMN de cDsbD dans chacune de ses deux formes réduite et oxydée suggère que des changements structuraux d'une amplitude significative pourraient être observés lors de la formation du pont S~S (Mavridou *et al.*, 2007). Ces modifications pourraient toucher non seulement les résidus du motif CXXC, mais aussi d'autres zones de la protéine spatialement proches de ce motif. Ces présomptions sont supportées par l'analyse comparative des variations de déplacements chimiques des noyaux ^1H et ^{15}N des formes réduite et oxydée de cDsbD avec celles de la Trx d' *E. coli* réduite et oxydée. L'amplitude de ces variations serait suffisamment importante pour suggérer l'existence de différences structurales entre les deux états de cDsbD. De plus, il existe des différences notables de valeurs de pKa pour un résidu dans l'entourage proche des cystéines de cDsbD, le pKa d'un résidu étant en effet grandement influencé par son environnement immédiat. Ainsi, le résidu Asp455 de cDsbD voit son pKa passer d'une valeur de 6,6 à 5,9 après réduction du pont disulfure alors que le pKa du résidu Asp26, équivalent dans la Trx_{E.coli}, ne subit aucun changement. Il est cependant à regretter l'absence de structures en solution et résolues par RMN confirmant ces hypothèses structurales.

La détermination des pKa des cystéines du motif CXXC de cDsbD indique des valeurs de 10,5 et de plus de 12,2 pour les cystéines 461 et 464 respectivement. Ces valeurs sont particulièrement élevées et sont influencées par les résidus Asp455 et Glu468. Ces données, déterminées par RMN par Mavridou *et al.*, sont différentes de celles mesurées par Stirnimann *et al.* (avec un pKa de 9,3 pour Cys461). Ces derniers ont d'ailleurs noté qu'une valeur élevée de pKa pour la Cys461 ne pouvait être corrélée avec le potentiel rédox d'interconversion du pont disulfure. Cette particularité de cDsbC, mise en évidence par RMN, suggère que les modèles simples de corrélation entre pKa et potentiel réducteur ne semblent pas s'appliquer au cas de cette protéine. Comme dit précédemment, cDsbD ne semble interagir qu'avec le domaine nDsbD. Toutes ces observations laissent penser que cDsbD doit posséder des propriétés structurales et chimiques particulières qui la protègent efficacement d'interactions non spécifiques.

II.2. Etudes structurales à l'état complexé

La structure d'un complexe covalent entre cDsbD et nDsbD a été résolue par RX (Rozhkova *et al.*, 2004) (Figure 3). Concernant l'étude fine des pKa des résidus du site actif, la formation du complexe engendre une augmentation de la valeur du pKa de l'Asp455 de 4,8 à 9,9. Il semble probable que l'augmentation de réactivité de la Cys461 dans le complexe soit due à la protonation de Asp455, cette dernière conduisant à une diminution substantielle (de l'ordre de 1,2 unités de pH) du pKa de Cys461. Une perturbation du même ordre touchant le résidu Glu468 pourrait permettre une diminution encore plus importante du pKa de Cys461. Ce serait donc un changement de l'environnement électrostatique qui serait à l'origine de l'augmentation de la réactivité de Cys461 lors de la formation du complexe entre cDsbD et nDsbD. Ce mécanisme est différent de celui observé pour l'homologue structural ResA pour lequel un changement structural induit par la fixation de l'apocytochrome c serait responsable de l'activation de la cystéine 74 (Colbert *et al.*, 2006).

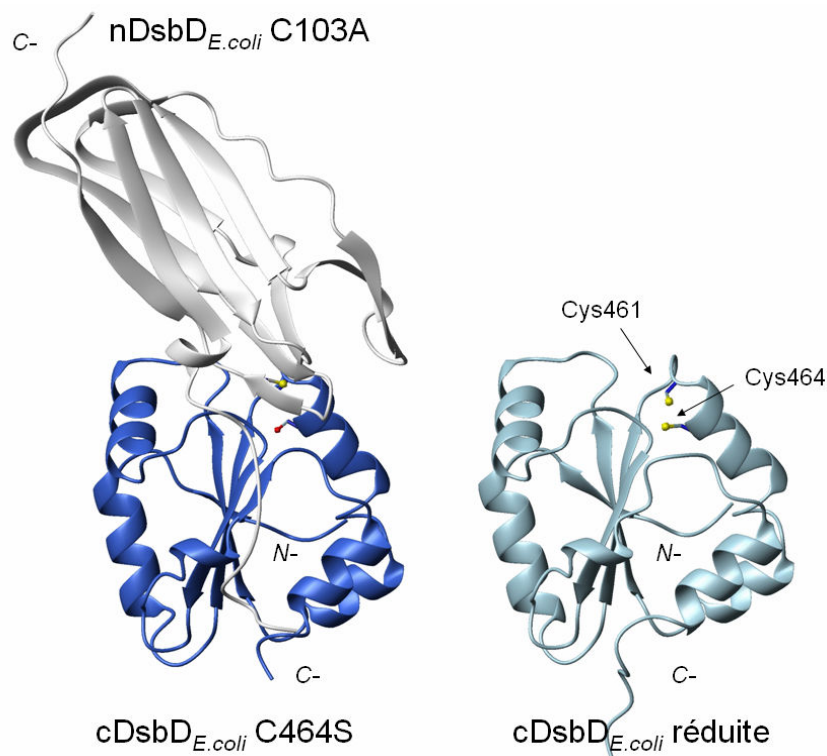


Figure 3 : Représentation des structures RX du complexe covalent entre cDsbD et nDsbD (résolu par Rozhkova *et al.*) et de la forme réduite non liée de cDsbD chez *E. coli*. La structure du complexe fait appel à deux mutants : cDsbD(C464S) et nDsbD(C103A). Les chaînes latérales des cystéines sont représentées par des bâtons bleus, les atomes de soufre par des boules jaunes et les atomes de carbone des alanines par des boules rouges. Les extrémités N- et C-terminales des protéines sont aussi indiquées. Les numéros d'accès PDB sont les suivants : 1vrs et 2fwe.

La formation du complexe entre cDsbD et nDsbD induit principalement des changements structuraux d'envergure au niveau de nDsbD. Ces changements seront décrits dans la partie concernant le domaine N-terminal de la protéine DsbD. Cette étude suggère aussi que l'interaction entre cDsbD et nDsbD

est moins spécifique qu'entre nDsbD et DsbC mais que l'importante concentration locale entre les deux domaines de DsbD peut compenser, en quelque sorte, cette perte de spécificité.

Il n'existe pas d'études structurales fines de l'interaction entre cDsbD et le domaine transmembranaire tDsbD. Toutefois, il est évident que les modifications conformationnelles, si elles ont lieu, doivent ou devraient concerner tDsbD si l'on admet que les électrons doivent franchir les 60 Å de la membrane plasmique.

III. Le domaine transmembranaire de DsbD (tDsbD)

Ce domaine est enchâssé dans la membrane plasmique de la bactérie. Il interagit avec la Trx et le domaine cDsbD qui présentent tous deux le même type de repliement. De par sa nature transmembranaire, les études structurales concernant ce domaine sont compliquées que ce soit par RX ou par RMN. Toutefois, certaines hypothèses sur le fonctionnement de tDsbD peuvent être émises puisque les deux partenaires privilégiés de ce domaine appartiennent à des compartiments cellulaires différents. Cette partie sera l'occasion de présenter les thiorédoxines bactériennes.

III.1. Les thiorédoxines

Les Trx sont des protéines présentes chez tous les êtres vivants. Elles présentent un potentiel rédox à pH 7,0 de -0,270 V (Laurent *et al.*, 1964) et vont donc avoir un rôle de réducteur au niveau du cytoplasme. Elles sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques présentés de façon non exhaustive dans le paragraphe suivant.

III.1.1. Rôle des Trx

La première fonction décrite pour Trx 1 d'*E. coli* est sa fonction de donneur d'électrons à la ribonucléotide réductase (RNR), enzyme essentielle à la synthèse de l'ADN qui catalyse la réduction des quatre ribonucléotides en leurs désoxyribonucléotides correspondants (Laurent *et al.*, 1964). Trx 1 permet également la réduction de sulfonucléotide réductases, (APS réductase et PAPS réductase), enzymes qui catalysent la réduction d'adénylate sulfate en sulfite. Ainsi, l'adénosine-5'-phosphosulfate (APS) est réduite par l'APS réductase et la 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS) est réduite par la PAPS réductase. Le mécanisme catalytique proposé pour ces deux sulfonucléotide réductases SR fait intervenir la Trx (Carroll *et al.*, 2005) (Figure 4).

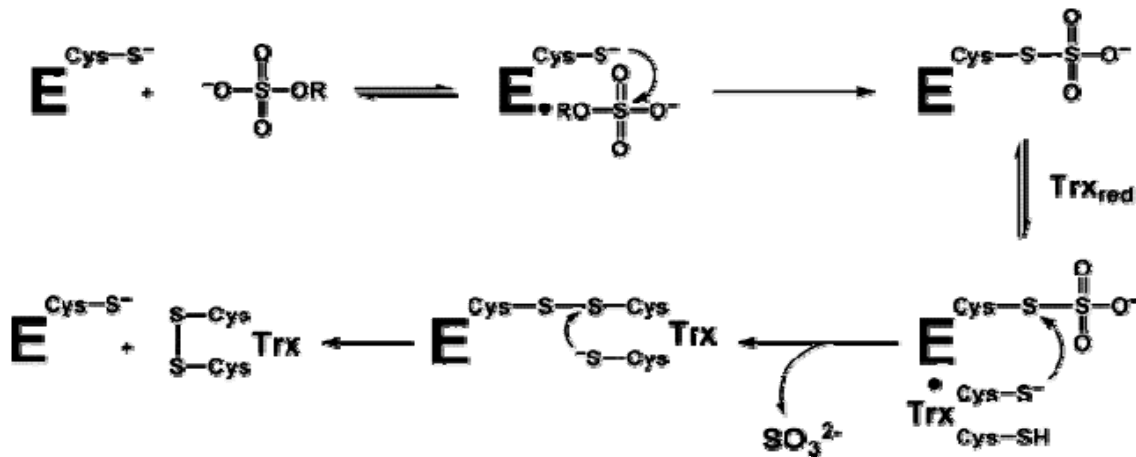


Figure 4 : Mécanisme de réduction de l'APS ou de la PAPS par une SR, APS réductase ou PAPS réductase (d'après Chartron et al., 2007).

Trx 1 humaine joue le rôle de facteur de croissance pour de nombreuses cellules, notamment les lymphocytes (Wakasugi *et al.*, 1990) et les fibroblastes (Oblong *et al.*, 1994). Elle est également impliquée directement dans la résistance au stress oxydant en tant que peroxydase en réduisant H_2O_2 (Nakamura *et al.*, 1994). Elle est connue aussi comme donneur d'électrons pour de nombreuses cibles : Msr (Gonzalez Porque, *et al.*, 1970), la glutathion peroxydase (Bjornstedt *et al.*, 1994), les peroxyrédoxines à une Cys (Pedrajas *et al.*, 2000), les peroxyrédoxines à deux Cys typiques (Netto *et al.*, 1996) et atypiques (Seo *et al.*, 2000). Trx 1 joue aussi un rôle dans la transduction du signal intracellulaire, en régulant l'activité de protéines qui se fixent sur l'ADN, comme par exemple, les protéines Jun/Fos et le facteur nucléaire NFkB. Trx 1 est également un facteur important dans la régulation de l'activité de fixation à l'ADN de p53, soit de façon directe soit *via* la protéine Ref-1 (Ueno *et al.*, 1999).

III.1.2. Mécanisme catalytique des Trx

Les Trx vont catalyser la réduction de ponts disulfure au sein de protéines oxydées. Les Trx sont des enzymes possédant deux Cys catalytiques, Cys32 et Cys35, au sein d'une signature WCGPC. La chaîne latérale de Cys32 est accessible au solvant et possède un pKa de 7,5 (Chivers *et al.*, 1997). Ceci lui permet de se retrouver à pH 7,0 en partie sous forme thiolate et de pouvoir jouer le rôle de nucléophile. Au contraire, Cys35 présente une valeur de pKa de l'ordre de 9, ce qui la rend très peu réactive. Le caractère nucléophile de Cys35 pourrait être augmenté par une catalyse basique. Le mécanisme proposé pour la réduction de protéines oxydées sous la forme d'un pont disulfure par Trx peut se décomposer en trois étapes. La première étape consiste en l'attaque nucléophile de Cys32 sous sa forme thiolate au niveau d'une des Cys de la protéine cible impliquée dans le pont disulfure intramoléculaire. Il y a alors formation transitoire d'un nouveau pont disulfure intermoléculaire entre Trx et sa cible. Au sein de cet intermédiaire intermoléculaire, le pKa de Asp26 est abaissé (de 9,2 à 7,6), ce qui lui permet d'être en partie sous forme déprotonée à pH 7,0. Ainsi, dans la seconde étape, Asp26 va pouvoir accepter le proton de Cys35. Ainsi déprotonée, Cys35 va pouvoir, dans une ultime étape, attaquer Cys32, ce qui entraîne la libération de la

protéine cible sous sa forme réduite et de Trx sous sa forme oxydée avec un pont disulfure Cys32/Cys35 (Figure 5). Trx, pour être de nouveau active, devra être réduite à son tour.

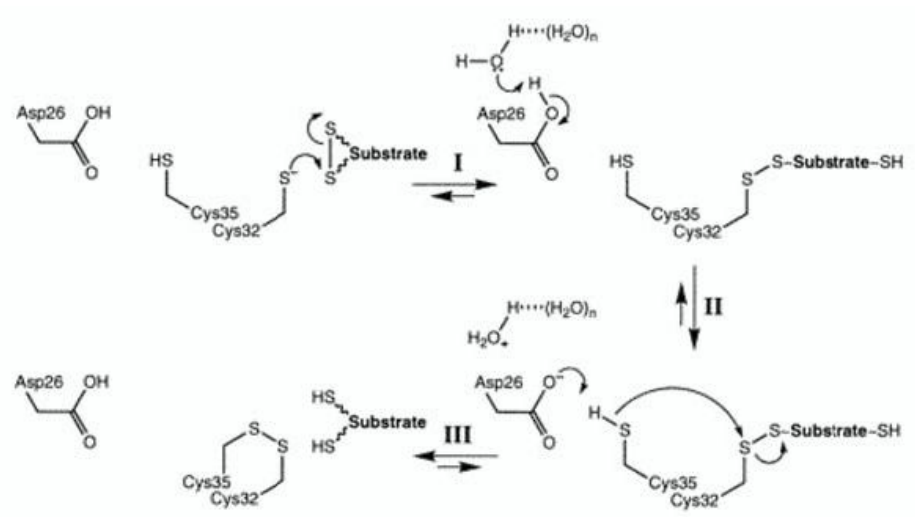


Figure 5 : Mécanisme de réduction d'une cible oxydée sous la forme d'un pont disulfure par Trx. (d'après Chivers et Raines, 1997)

III.1.3. Aspects structuraux des Trx

La structure des Trx est hautement conservée chez de nombreuses espèces. Elle consiste en un feuillet β central à 5 brins, entouré par 4 hélices α . Ces structures secondaires sont arrangées en un motif $\beta\alpha\beta\alpha\beta\beta\alpha$ (Holmgren *et al.*, 1975). Cette topologie contient ce qui est communément appelé un repliement Trx correspondant au motif $\beta\alpha\beta\alpha\beta\beta\alpha$ (Weichsel *et al.*, 1996) (Figure 6). En dépit de grandes variations des structures primaires, des fonctions et des structures globales des protéines, ce « Trx-fold » se retrouve dans les glutarédoxines, les glutathione peroxydases et transférases, les disulfide isomérases et transférases (Martin *et al.*, 1995).

Ce repliement Trx se retrouve notamment dans la très grande majorité des membres du système Dsb.

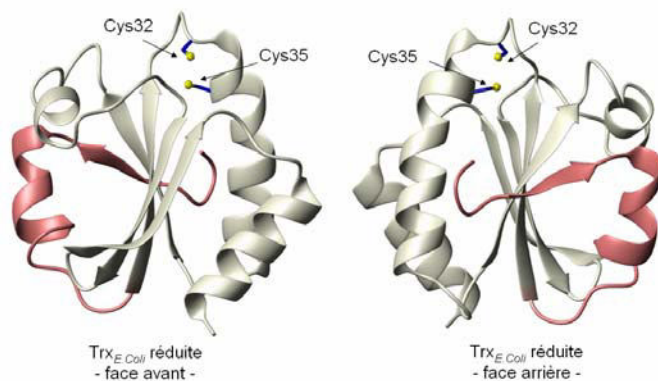


Figure 6 : Représentation de la structure en solution obtenue par RMN de Trx1 d'E. coli selon deux angles de vue. Le « Trx-fold » $\beta\alpha\beta\alpha\beta\beta\alpha$ est représenté en gris. Les cystéines actives sont figurées en bleu et leur atome de soufre est représenté comme une boule jaune. Le numéro d'accès PDB est le suivant : 1xob.

III.1.4. Spécificité de substrat des Trx

Les Trx sont des protéines ubiquitaires capables de réduire de nombreuses cibles protéiques possédant des fonctions très diverses. L'examen des séquences de ces différentes cibles ne semble pas indiquer l'existence d'une séquence signature permettant une reconnaissance spécifique par une Trx. Quels sont donc alors les facteurs structuraux et moléculaires impliqués dans la reconnaissance entre une Trx et ses cibles ?

Les premières structures décrites entre une Trx et ses cibles sont des structures de complexes covalentement liés par un pont disulfure : l'une, entre Trx 1 humaine, très similaire à Trx 1 d'*E. coli*, et des peptides correspondant à des fragments de protéines cibles (NFκB et Ref-1) (Qin *et al.*, 1995 ; Qin *et al.*, 1996) ; l'autre, entre la Trx réductase et Trx 1 d'*E. coli* (Lennon *et al.*, 2000). Ces structures montrent une reconnaissance localisée entre Trx et ses cibles *via* l'implication d'interactions hydrophobes.

Récemment, la structure tridimensionnelle de Trx 1 d'*E. coli* liée covalentement par un pont disulfure intermoléculaire entre sa Cys catalytique et l'une des Cys de la PAPS réductase a été résolue (Chartron *et al.*, 2007). On y voit que Trx interagit avec les 10 derniers résidus de la PAPS réductase. La reconnaissance de ce segment se présente essentiellement sous forme de contacts hydrophobes, de liaisons H entre chaînes principales et d'un réseau de ponts salins. Une conséquence de ces nombreux contacts est que Cys32 de Trx 1 est positionnée de façon optimale pour réaliser une attaque nucléophile sur la PAPS réductase. Cys35 serait alors également bien positionnée pour attaquer le pont disulfure intermoléculaire. De plus, la modélisation de l'intermédiaire sulfocystéine de la PAPS réductase dans la structure du complexe suggère l'existence d'une poche putative de liaison du sulfite au niveau de l'interface protéine-protéine et constituée de nombreux résidus largement conservés, notamment Trp31, Gly33, et Pro34 appartenant à Trx. Ce site pourrait permettre de positionner correctement Cys32 de Trx nécessaire à l'attaque nucléophile de l'intermédiaire sulfocystéine de la PAPS réductase.

Très récemment, la première structure d'un complexe covalent entre une Trx et une de ses cibles protéiques a été obtenue par RMN. Il s'agit d'un complexe entre Trx et l'arsenate réductase (ArsC) (Li *et al.*, 2007). ArsC est une enzyme impliquée dans la détoxification de l'arsenate. Elle catalyse la réduction de l'arsenate (AsV) en arsenite (AsIII). Son mécanisme catalytique fait appel à trois résidus Cys : Cys10 est responsable de la première attaque nucléophile sur l'arsenate qui conduit à la formation d'un intermédiaire covalent ArsC-AsV ; l'attaque par Cys82 conduit dans un deuxième temps à la formation d'un pont disulfure intramoléculaire Cys10/Cys82 et au relargage de l'arsenite ; finalement l'attaque de la troisième Cys, Cys89, conduit à la libération de Cys10 et à la formation d'un pont disulfure intramoléculaire Cys82/Cys89 exposé en surface. Ce pont disulfure sera ensuite réduit par Trx (pour revue, voir Messens *et al.*, 2006). Le complexe qui a été étudié par RMN entre ArsC et Trx de *B. subtilis* est un complexe artificiel obtenu avec une liaison covalente intermoléculaire entre les Cys32 (équivalent *E. coli*) de Trx et Cys89 d'ArsC, à partir de variants protéiques ne possédant plus les autres Cys (Figure 7).

Globalement, les structures de Trx sous ses formes réduite puis oxydée et sous forme de complexe ne présentent pas de différences majeures. Des ajustements structuraux locaux sont observés au niveau d'un résidu valine en position C-terminale du cinquième brin β et au niveau d'une hélice α . Au niveau d'ArsC, la boucle qui contient les Cys82 et Cys89 adopte une conformation intermédiaire entre celles des formes réduite et oxydée. En effet, cette boucle se replie en hélice α dans la forme réduite, alors que dans la forme complexée cette hélice n'est pas complètement formée. Les interactions impliquées au sein de ce complexe sont essentiellement des interactions de type hydrophobe.

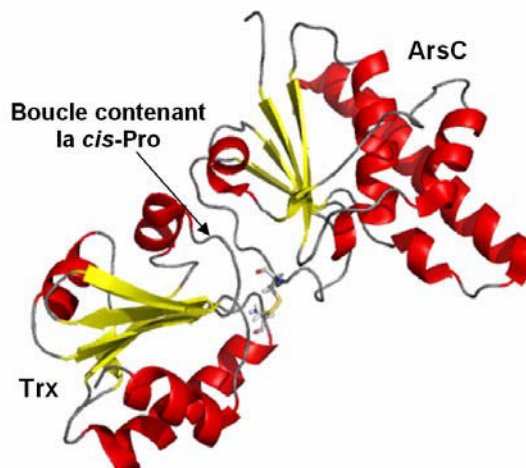


Figure 7 : Représentation schématique de la structure du complexe entre Trx 1 de *B. subtilis* et ArsC de *B. subtilis*. Les résidus Cys32 de Trx 1 et Cys89 d'ArsC sont représentés. Le numéro d'accès PDB est le suivant : 2ipa.

Il est à noter que toutes les protéines Trx-like (littéralement « Trx-similaire ») possèdent un résidu cis-Proline qui semble être important pour la reconnaissance entre Trx et ses cibles puisqu'il permettrait de positionner correctement la chaîne latérale du résidu alanine adjacent impliqué dans des interactions hydrophobes avec ses partenaires.

III.2. Le domaine transmembranaire de DsbD (tDsbD)

La source principale d'électrons pour DsbD est la thiorédoxine 1 ; cependant, la thiorédoxine 2 (largement moins exprimée) peut, quand elle est surexprimée, suppléer Trx1 (Cho *et al.*, 2007). Ces protéines, comme nous venons de le voir, sont globalement rigides et possèdent deux cystéines (organisées en un motif particulier CXXC) absolument nécessaires à leur activité. Il a été montré que les glutarédoxines bactériennes, présentant des rôles similaires à ceux des Trx, n'étaient pas capables de supporter la réduction de tDsbD (Rietsch *et al.*, 1997).

L'échange de pont disulfure fait intervenir la paire de cystéines 163/285 de tDsbD. Les chaînes latérales de ces résidus doivent pointer vers le cytoplasme de la bactérie pour interagir avec la paire de cystéines 32/35 de Trx et vers le périplasma pour interagir avec la paire de cystéines 461/464 de cDsbD.

Une étude récente a montré que la paire de cystéines de tDsbD était accessible à un agent alkylant et ce, de chaque côté de la membrane plasmique (Cho *et al.*, 2006).

Les analyses structurales faites sur tDsbD prédisent la présence de 8 hélices, ces dernières représentant autant de segments transmembranaires. Des alignements entre les séquences de tDsbD provenant de différents organismes pointent le rôle de certains résidus Pro conservés (Hiniker *et al.*, 2006). Ceux-ci sont présents dans les segments transmembranaires 1 et 4 de tDsbD, chacun de ces segments renfermant une des deux cystéines du domaine. L'hypothèse de changements conformationnels induits par les partenaires Trx et cDsbD ne s'appuie pas encore sur de réels arguments ; c'est pourquoi, considérant la nécessité de proximité des atomes de soufre des cystéines pour la formation du pont disulfure, il a été proposé que tDsbD adopte une structure en « sablier », avec en son centre, les cystéines alors accessibles à cDsbD et Trx (Cho *et al.*, 2007) (Figure 8).

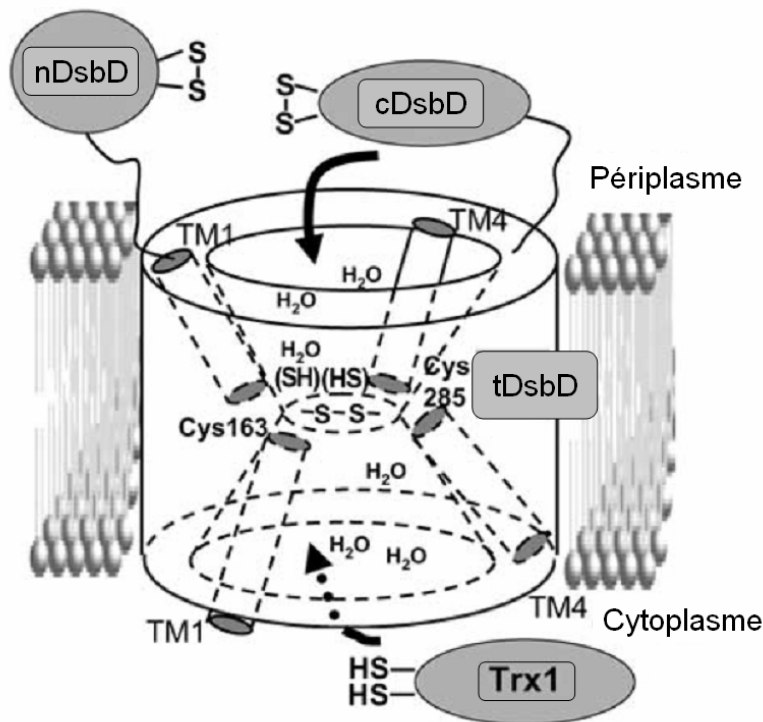


Figure 8 : Représentation d'un modèle structural pour tDsbD (d'après Cho *et al.*, EMBO J., 2007). Ce modèle rend compte de la présence de deux cavités permettant l'accès à chacun des partenaires cytoplasmique (Trx1) et périplasmique (cDsbD). La paire de cystéines de tDsbD est au centre de la structure et implique le rapprochement des segments transmembranaires 1 et 4 (TM1 et TM4).

Une alternative à cette proposition pourrait être l'implication d'un petit cofacteur comme l'ubiquinone ou la menaquinone (comme c'est le cas pour la protéine DsbB) ; cependant aucune molécule de ce type n'a pu être identifiée dans des extraits méthanol/hexane de DsbD. De plus, le flux d'électrons à travers tDsbD a été déterminé comme thermodynamiquement favorable et ne nécessiterait donc pas le recours à un cofacteur (Rozhkova *et al.*, 2008).

IV. Le domaine N-terminal de DsbD (nDsbD)

Le domaine N-terminal de DsbD est le domaine « fonctionnel » de la protéine dans le compartiment périplasmique. Il se charge de répartir le flux d'électrons provenant du cytoplasme (via les domaines tDsbD et cDsbD vers différentes voies métaboliques (Figure 1). Cette transmission se fait par échange de ponts disulfure et implique la paire de cystéines 103/109 de nDsbD. Ce domaine présente un repliement de type immunoglobuline inédit pour une disulfide réductase et qui a pour particularité d'interagir uniquement avec des repliements de type Trx (Goulding *et al.*, 2002). Diverses études, dont cette thèse, montrent l'adaptabilité remarquable du site actif de nDsbD lors de l'interaction avec un substrat (Stirnemann *et al.*, 2006).

Cette partie, la plus vaste, sera l'occasion de présenter les changements structuraux qui ont lieu au sein de nDsbD durant son mécanisme catalytique mais aussi les différentes voies métaboliques dans lesquelles intervient, en tant que premier maillon la protéine nDsbD. Comme dans les parties précédentes, ce seront les aspects structuraux qui seront essentiellement mis en avant.

IV.1. Rôle fonctionnel de la formation et de l'isomérisation des ponts disulfure chez *Escherichia coli*

La formation de ponts disulfure est un phénomène très important qui résulte d'une modification post-traductionnelle de protéines sécrétées dans le périplasme des bactéries. Une erreur amenant à la formation de ponts disulfure impropres ou à une vitesse de formation trop lente sont des facteurs qui peuvent conduire à des phénomènes d'agrégation et de dégradation par les protéases. Cette modification permet à la protéine d'acquieser son repliement fonctionnel et stable. Par exemple, la phosphatase alcaline est une protéine périplasmique qui contient deux ponts disulfure nécessaires pour l'obtention adéquate d'un repliement et d'une fonction. Si ces liaisons covalentes ne sont pas formées, la protéine est presque complètement dégradée *in vivo* (Barwell *et al.*, 1991).

Une protéine dont la chaîne protéique contient un pont S-S ne peut adopter qu'un nombre restreint de conformations comparativement à une protéine dont les cystéines restent sous leurs formes thiol ou thiolate. La diminution d'entropie qu'engendrent ces liaisons disulfure est un facteur clef pour leur propre existence. Les ponts disulfure peuvent être formés spontanément par la présence et l'action de molécules d'oxygène moléculaire, sous l'influence de facteurs catalytiques. En effet, dans des conditions aérobies, une mince couche de cystine est générée à l'interface air/liquide quand une solution de cystéines est exposée à l'air libre (Figure 9). Cependant, ce type de réaction spontanée est très lent et ne peut cadrer avec les besoins rapides de la cellule.

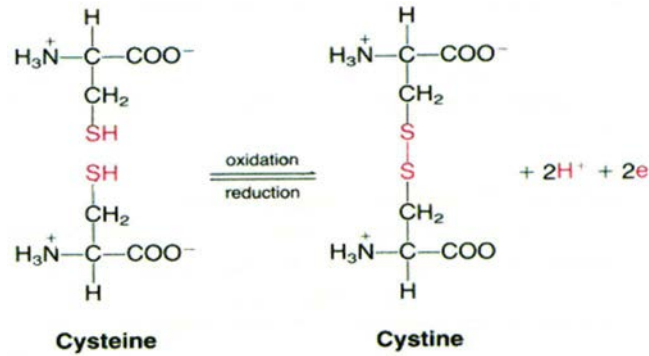


Figure 9 : Formation d'une molécule de cystine à partir de 2 molécules de cystéine

La première protéine découverte comme catalysant la formation de ponts S~S est la protéine eucaryotique PDI (pour Protein Disulfide Isomerase). Elle participe avec Ero1 à la machinerie complexe, responsable de ces modifications post-traductionnelles, et est présente dans le réticulum endoplasmique des cellules eucaryotes (Sevier *et al.*, 2002).

Chez la bactérie gram négative *E. coli* (qui servira de modèle), la formation et l'isomérisation d'un pont intramoléculaire entre 2 cystéines sont catalysées par les membres de la famille protéique appelée Dsb (Kadokura *et al.*, 2003 ; Nakamoto *et al.*, 2004 ; Hiniker *et al.*, 2003). Ces deux types de réactions, formation et isomérisation des ponts disulfure, sont couplés mais représentent deux voies enzymatiques indépendantes. La voie de formation des ponts disulfure est assurée par les protéines solubles DsbA et membranaires DsbB, celle d'isomérisation, par les protéines DsbC et DsbG (Figure 10).

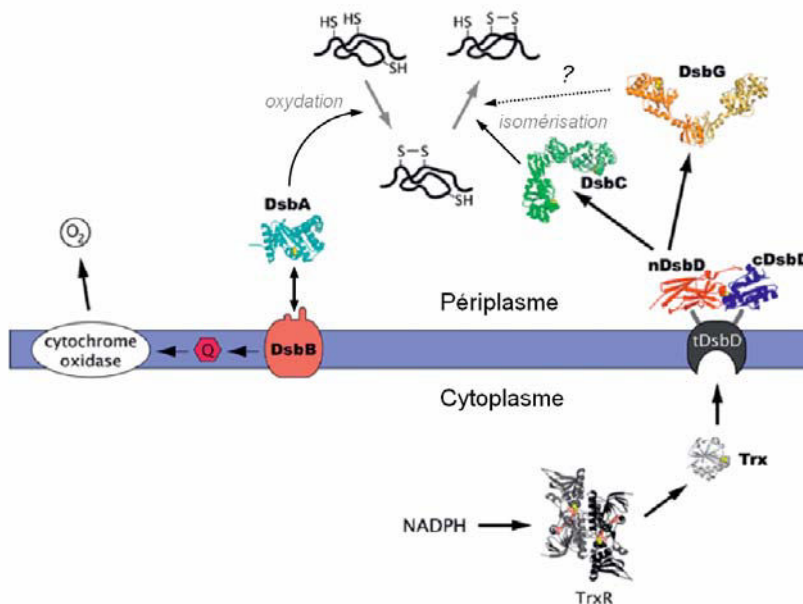


Figure 10 : Représentation schématique du système de formation et d'isomérisation des ponts disulfure par le système Dsb chez *E. coli* (adaptée de Stirnimann *et al.*, 2006). DsbA et DsbB interviennent dans la formation de ponts S~S, DsbC intervient dans l'isomérisation de ces ponts. La fonction d'isomérase *in vivo* pour DsbG n'est pas confirmée. DsbD apporte et transfère les électrons cytoplasmiques de Trx vers le périplasme pour recycler ses partenaires DsbC et DsbG.

IV.1.1. La disulfide oxydase DsbA et son régénérateur DsbB

DsbA introduit rapidement, mais de façon aléatoire, un pont disulfure sur son substrat protéique non-natif (Wunderlich *et al.*, 1993 ; Darby *et al.*, 1996). Chez *E. coli*, il est prédit qu'au moins 300 protéines contenant deux résidus cystéines (ou plus) peuvent être sécrétées dans le périplasma de la bactérie (McCarthy *et al.*, 2000). Cela représente autant de substrats potentiels pour DsbA.

La protéine DsbA possède un repliement de type Trx associé à un domaine hélicoïdal formé de plusieurs hélices α (Martin *et al.* 1993) (Figure 11). On y trouve la paire de cystéines 30/33 organisée en un motif CXXC caractéristique des oxydoréductases. C'est cette paire de cystéines qui permet l'arrachement des électrons des protéines à oxyder. Généralement, un pont S-S stabilise une protéine. Pourtant, la forme oxydée de DsbA est moins stable que sa forme réduite (Zapun *et al.*, 1993) et représente la forme *in vivo* de la protéine dans le périplasma (Kishigami *et al.*, 1995). Ce phénomène fournit la force thermodynamique nécessaire pour la formation du nouveau pont disulfure sur la protéine cible. Ainsi, DsbA possède un pouvoir oxydant très important (indiqué par son potentiel rédox d'une valeur de -120 mV) et le pKa, d'une valeur de 3,0 déterminé pour Cys30, fait que ce résidu est essentiellement sous forme thiolate au pH physiologique (Grauschopf *et al.*, 1995).

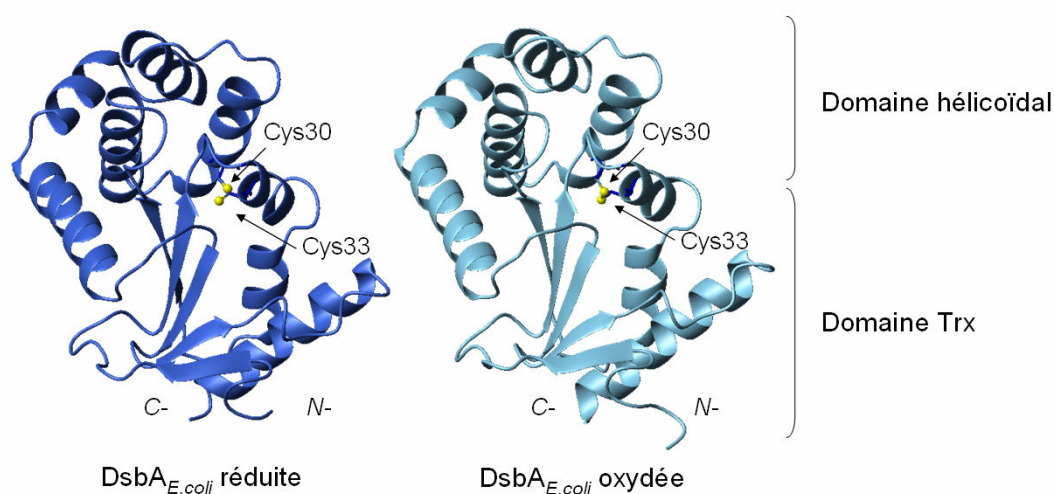


Figure 11 : Structures RX des formes réduite et oxydée de DsbA d'*E. coli*. Les résidus cystéine sont représentés. Les numéros d'accès PDB sont les suivants : 1a2l et 1a2j

La résolution des structures RX des formes réduite et oxydée a permis de montrer que DsbA doit ou devrait interagir *via* des forces hydrophobes avec son partenaire non replié, ce type d'interaction facilitant la multiplicité de substrat pour la protéine (le domaine hélicoïdal de la protéine, surplombant le site actif, permet la création d'une poche hydrophobe permettant de fixer le substrat). Cette adaptabilité vis-à-vis du substrat est confortée par une étude RMN qui montre, grâce à une étude de la dynamique de la chaîne peptidique de la protéine, que DsbA de *Vibrio cholerae* (et notamment sa forme oxydée) est largement flexible (Horne *et al.*, 2007). Les auteurs ont proposé que la flexibilité accrue de la forme oxydée (celle qui échange son pont S-S avec son substrat) favoriserait sa multiplicité de substrat. La forme réduite, plus

rigide et donc moins adaptable, serait alors plus à même de relarguer le substrat oxydé et d'interagir spécifiquement avec son partenaire oxydant DsbB.

La protéine membranaire DsbB est chargée de réoxyder DsbA de manière à lui redonner sa forme active (Bader *et al.*, 1999). Les analyses structurales, faites sur DsbB, prédisent la présence de 4 hélices transmembranaires et de 2 boucles périplasmiques, contenant chacune une paire de cystéines (les paires 41/44 et 104/130). Toutes ces cystéines sont indispensables pour le fonctionnement de la protéine. Les deux électrons qui proviennent de DsbA sont ensuite cédés à l'ubiquinone-8 par DsbB (Bader *et al.*, 2000). L'implication de ce type de molécules (ubiquinone en condition aérobie et menaquinone en condition anaérobie) suggère que le pouvoir oxydant nécessaire à la formation des ponts S~S est fourni par la chaîne respiratoire chez *E. coli*. Dans le modèle d'action proposé pour DsbB, c'est le thiolate de la cystéine 30 de DsbA qui attaque le pont disulfure Cys104~Cys130 de DsbB. Les électrons de DsbA sont transférés, après rupture du complexe mixte entre DsbA et DsbB, sur DsbA. Il se produit un échange de pont disulfure entre les cystéines libres 104 et 130 et les cystéines liées 41~44 au sein de DsbB. Finalement, le pont Cys41~Cys44 est régénéré par une quinone (Figure 12).

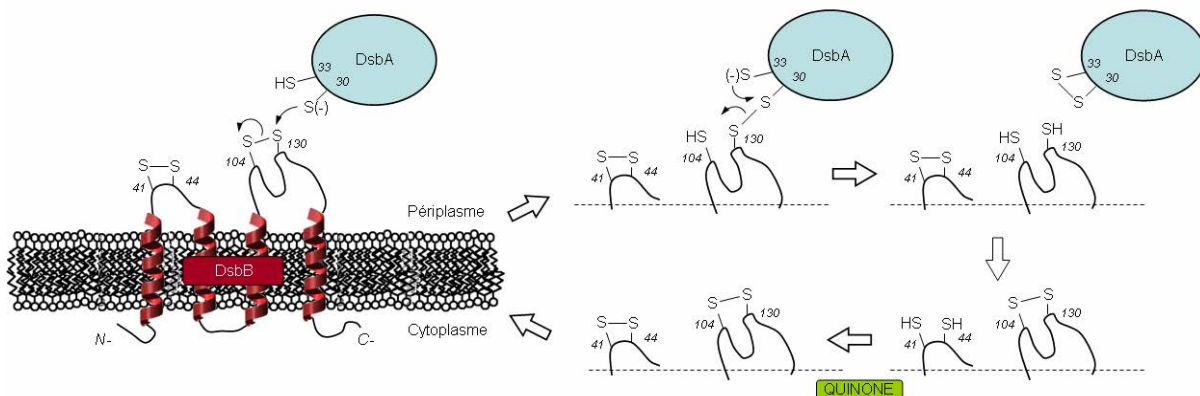


Figure 12 : Fonctionnement schématique du système DsbA/DsbB

Les électrons pourront finalement être pris en charge par la cytochrome oxydase qui cède, à son tour, les électrons à l'oxygène moléculaire.

DsbB est la seule enzyme identifiée qui a la possibilité d'utiliser le pouvoir réducteur des quinones pour générer des liaisons disulfure *de novo* (Bader *et al.*, 2000). Son résidu Arg48, qui appartient à la première boucle périplasmique, semble jouer un rôle important dans cette fonction (Xie *et al.*, 2002). Ce mécanisme pourrait impliquer deux molécules de quinones, l'une arrimée à DsbB et l'autre échangeable avec le « pool » global de quinones (Regeimbal *et al.*, 2003).

IV.1.2. La protéine DsbC et son homologue DsbG

Ces deux protéines sont impliquées dans la fonction d'isomérisation des ponts disulfure. Les fonctions thiol réduites de leurs résidus cystéines actifs permettent la formation de complexes mixtes avec les substrats oxydés contenant un pont S~S incorrect, la destruction de ce pont et la formation d'une

nouvelle liaison S~S corrigée. Pour jouer leur rôle, DsbC et DsbG doivent donc être maintenues à l'état réduit. C'est le domaine nDsbD qui est en charge d'apporter des électrons à ces isomérases.

IV.1.2.1. Fonction d'isomérase

Toutes les protéines contenant au moins deux cystéines peuvent potentiellement formées des ponts disulfure intramoléculaires. Par exemple, une protéine avec 4 paires de cystéines ne possède qu'une chance sur cent d'atteindre un repliement correct par oxydation aléatoire. Ainsi, pour que le repliement soit conforme et rapide, il faut que les ponts S~S non valides soient cassés puis reformés. Cela nécessite l'intervention de protéines isomérases spécifiques. DsbA, qui est un oxydant très puissant, peut oxyder de façon non spécifique et très rapide les fonctions thiol de divers composés. Elle peut donc être à l'origine de l'introduction de ponts disulfure non-natifs dans les protéines possédant plusieurs cystéines (Rietsch *et al.*, 1997). DsbA possède également une activité isomérase mais cependant très lente, donc insuffisante pour effectuer des opérations de relecture efficaces.

Les ponts disulfure non natifs que DsbA introduit sont réarrangés par la protéine DsbC, une isomérase périplasmique très efficace aux propriétés de protéine chaperonne (Chen *et al.*, 1999). DsbC, qui ne réagit pas avec DsbA, est maintenue dans son état catalytique réduit par le domaine N-terminal de la protéine DsbD (Rozhkova *et al.*, 2004 ; Zapun *et al.*, 1995 ; Porat *et al.*, 2004).

DsbC fut le premier élément de la voie bactérienne d'isomérisation des ponts disulfure à être caractérisé structuralement (McCarthy *et al.*, 2000). Cette protéine est un homodimère en forme de V, chacun des monomères contenant un domaine de dimérisation en position N-terminal (résidus 1 à 61) et un domaine catalytique à son extrémité C-terminale (résidus 78 à 216) et connecté par un lien α -hélicoïdal (Figure 13). Le domaine catalytique de la protéine peut être divisé en deux sous-domaines. Le premier (comprenant les résidus 78 à 122 et 167 à 216) possède un repliement de type Trx et renferme deux cystéines (98 et 101) nécessaires à son activité. Le second (comprenant les résidus 123 à 166) est une insertion localisée à la même position que celle retrouvée dans le repliement Trx de DsbA. L'arrangement global du dimère est tel qu'un large sillon hydrophobe sépare les deux sites actifs. Il a été proposé que ce sillon constitue le site de fixation des substrats protéiques et qu'il serait indispensable aux activités d'isomérase de DsbC.

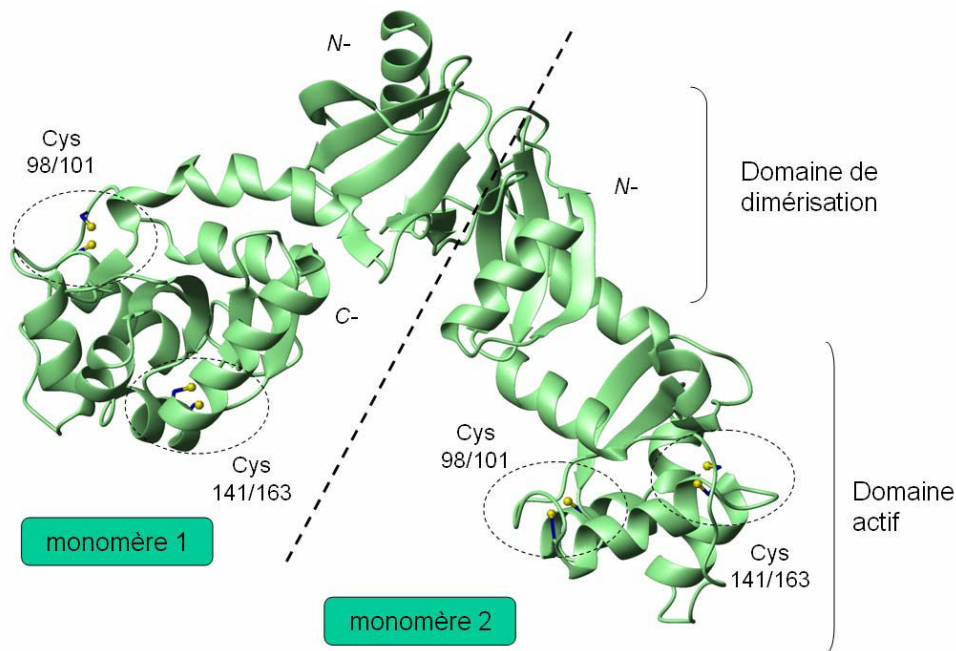


Figure 13 : Structure RX de DsbC d'*E. coli*. Les atomes de soufre des cystéines sont représentés sous forme de boules jaunes. Le numéro d'accès PDB est le suivant : 1eej.

Il a d'ailleurs été montré que la dimérisation de la protéine était indispensable pour lui conférer son activité d'isomérase et qu'elle empêchait son interaction avec DsbB (Sun *et al.*, 2000; Bader *et al.*, 2001). De plus, la dimérisation de DsbC augmente son affinité envers son réducteur nDsbD. En effet, la structure obtenue par rayons X du complexe entre nDsbD et le dimère DsbC met en lumière le fait que chacun des monomères de DsbC rentre en contact avec nDsbD (Goldstone *et al.*, 2001 ; Haebel *et al.*, 2002). Deux surfaces d'interaction se distinguent sur nDsbD : une première, au niveau des cystéines du pont disulfure ; une deuxième, au niveau d'une des faces latérales de la protéine.

Plus récemment, la structure de DsbG, une protéine partageant 24% d'identité de séquence avec DsbC a été résolue (Heras *et al.*, 2004). DsbG est un paralogue putatif de DsbC dont la fonction cellulaire est encore inconnue. Elle présente toutefois une lente activité d'isomérase (Andersen *et al.*, 1997; Shao *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2004). Comme DsbC, DsbG adopte une structure dimérique en forme de V mais de plus grande taille. Cela est essentiellement dû au fait que DsbG possède un lien hélicoïdal plus long de quelques résidus entre le domaine Trx et le domaine de dimérisation. De plus, le sillon que forme DsbG est approximativement deux fois plus grand que celui observé dans DsbC et sa surface présente un caractère encore plus hydrophobe (Heras *et al.*, 2004).

IV.1.2.2. Fonction de chaperon

Comme les ponts S~S sont généralement enfouis dans la structure des protéines et présents dans des environnements hydrophobes, leur réduction, quand elle est nécessaire, doit être précédée par une étape de dépliement local ou global permettant l'exposition au réducteur. Des ponts disulfure non-natifs peuvent être aussi bien enfouis qu'exposés. L'aptitude qu'ont DsbC et DsbD à isomériser des ponts

disulfure suggère qu'elles sont capables d'interagir avec des segments hydrophobes d'une protéine. Cette propriété rappelle celle des protéines chaperonnes. De façon non surprenante, il a été montré que DsbC et DsbG assistaient *in vitro* le repliement de substrats modèles tels que le lysozyme, la glycéraldehyde-3-phosphate déshydrogénase, la citrate synthase et la luciférase et que l'activité chaperonne de DsbG était même indépendante de son état rédox (Chen *et al.*, 1999 ; Shao *et al.*, 2000).

La présence d'un large sillon hydrophobe en forme de V (beaucoup plus large que la poche hydrophobe de DsbA) dans les homodimères de DsbC et de DsbG peut fournir une interface propice à des interactions non covalentes avec une large gamme de substrats. Ceci est conforté par la plus grande stabilité des complexes mixtes impliquant DsbC et un partenaire en comparaison avec ceux impliquant DsbA (Darby *et al.*, 1998). Ainsi, comme c'est également le cas pour l'activité isomérase, il a été montré que la dimérisation de DsbC et DsbG était nécessaire à leur fonction de protéines chaperonnes.

IV.1.3. nDsbD, activateur des voies de formation et d'isomérisation des ponts disulfure

Le domaine nDsbD est celui qui, dans le périplasma, permet de maintenir à l'état réduit les protéines DsbC et DsbG. Ces dernières sont en charge de corriger les erreurs introduites par l'oxydase DsbA, enzyme recyclée par DsbB. Si l'apport d'électrons *via* nDsbD ne peut pas se faire, ce sont ces deux voies qui sont bloquées. De plus, l'activité chaperonne de DsbC et DsbG ne pourrait plus perdurer. A ce rôle déjà crucial, s'ajoute celui d'apport de pouvoir réducteur pour la voie de synthèse du cytochrome *c*. C'est ce qui va être détaillé à présent.

IV.2. La voie de synthèse du cytochrome *c*.

IV.2.1. Les cytochromes *c* bactériens et leurs systèmes de maturation

IV.2.1.1. Les cytochromes *c* bactériens

Les cytochromes *c* sont des protéines de 8 à 14 kDa impliquées dans le transfert d'électrons et localisées du côté périplasmique de la membrane. Dans ces cytochromes, le cofacteur hémique est lié covalamment *via* deux liaisons thioéthers entre les deux groupements vinyles de l'hème et les deux Cys de l'apocytochrome *c* au niveau d'un motif de liaison CXXCH (Figure 14). Le résidu His, présent au niveau de ce motif, sert de ligand axial au Fe²⁺ de l'hème.

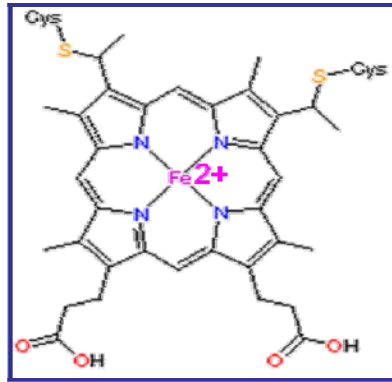


Figure 14 : Représentation schématique d'un hème de type c et de sa fixation au sein d'un cytochrome c. L'hème est relié aux deux Cys de l'apocytochrome c via deux liaisons thioéthers impliquant les groupements vinyloxy de l'hème. L'atome de Fe^{2+} est coordonné par quatre noyaux pyrroles et par His de l'apocytochrome c et appartenant à la signature CXXCH (non figuré sur le schéma).

Chez les bactéries, la fixation covalente de l'hème à l'apocytochrome a normalement lieu dans le périplasme. Jusqu'ici, trois systèmes de maturation des cytochromes c ont été mis en évidence, deux retrouvés chez les bactéries et un, spécifique des organismes eucaryotes. D'un point de vue chimique, la formation de liaisons thioéther ne se fait pas facilement, le mécanisme restant à déterminer. Des études *in vitro* ont permis de montrer que la fixation de l'hème de façon covalente à l'apocytochrome c était possible en présence de réducteur (DTT), ce qui implique que le pont disulfure de l'apocytochrome c doit être réduit pour l'obtention de cytochromes c matures. De nombreuses études ont également démontré que l'hème est essentiel à la structuration des cytochromes c. En effet, des études de dichroïsme circulaire ont montré qu'en absence de l'hème, le cytochrome c est complètement déstructuré par rapport à la forme ayant fixé l'hème (Fischer *et al.*, 1972).

Les cytochromes c ne possèdent pas de repliement caractéristique. En effet, il existe une très grande variabilité au niveau des structures tridimensionnelles de ces protéines et elles peuvent également adopter plusieurs niveaux d'oligomérisation.

IV.2.1.2. Rôle des cytochromes c

Les cytochromes c sont impliqués principalement dans le transfert des électrons au sein de la chaîne respiratoire et ainsi, dans la production d'ATP. Il est à noter qu'il existe des protéines contenant un hème de type c qui n'interviennent pas au niveau de la chaîne respiratoire bactérienne mais qui vont avoir un rôle catalytique ou de détoxication. Par exemple les cytochromes c' jouent un rôle dans la détoxication du NO. Les cytochromes c' appartiennent à la famille des cytochromes c puisqu'ils possèdent une signature CXXCH et que l'hème est également lié via deux liaisons thioéther entre les groupements vinyloxy de l'hème et les groupements thiol de deux Cys. Ces cytochromes c' présentent cependant un repliement très caractéristique composé de quatre hélices α et peuvent être retrouvés sous les formes monomérique, dimérique (le plus souvent) ou encore tétramérique (Figure 15).

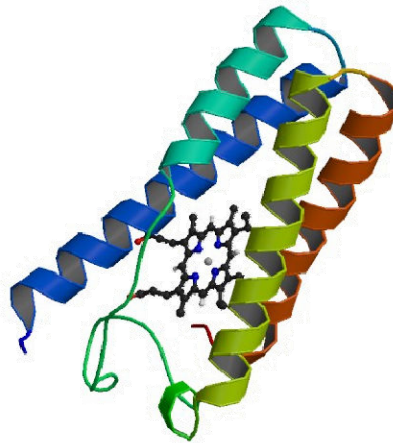


Figure 15 : Cytochrome *c'* de *Rhodospseudomonas capsulata*. La partie hémique est visible au centre des 4 hélices α . Le numéro d'accès PDB est le suivant : 1cpq

Ces cytochromes *c'* sont des protéines périplasmiques retrouvées généralement chez les organismes photosynthétiques ou dénitrifiants méthylophiles et dont le rôle est de réduire le soufre. Cependant, l'analyse des génomes de nombreux pathogènes tels que *N. meningitidis*, *B. pertussis* et *Pseudomonas aeruginosa* a montré l'existence de gènes codant des cytochromes *c'* (Cross *et al.*, 2000). L'hème des cytochromes *c'* se lie préférentiellement à de petites molécules non chargées telles que l'oxyde nitrique (NO) ou le monoxyde de carbone (CO). Il a été décrit que l'expression de ce cytochrome *c'* permettait d'augmenter la résistance de *R. capsulatus* à NO (Cross *et al.*, 2000). Ces cytochromes agissent non seulement par séquestration de NO mais permettraient également de transformer NO en entités non toxiques pour la cellule telles que N_2O (Cross *et al.*, 2001).

N. meningitidis possède également un cytochrome *c'* qui a été purifié et caractérisé *in vitro* (Huston *et al.*, 2005). Tout comme chez *R. capsulatus*, ces cytochromes *c'* permettraient d'augmenter la résistance des bactéries vis-à-vis de NO (Stevanin *et al.*, 2005).

IV.2.1.3. Les différents systèmes de maturation des cytochromes *c*

La maturation des cytochromes *c* est une modification post-traductionnelle qui se produit chez toutes les bactéries et les Archeae qui possèdent des cytochromes *c* ainsi que dans les mitochondries et les chloroplastes des cellules eucaryotes. Cette maturation consiste en la fixation covalente de l'hème sur l'apocytochrome *via* deux liaisons thioéther. Trois systèmes distincts de maturation des cytochromes *c* ont pu être mis en évidence.

Les bactéries, les plantes, les Archeae ainsi que certains protozoaires utilisent un des systèmes de maturation de type I ou II, qui font intervenir, respectivement, neuf et quatre protéines. Chez les bactéries utilisant un des systèmes I ou II, la maturation des cytochromes *c* a lieu dans le périplasme. Ceci implique, d'une part, que l'hème et l'apocytochrome soient transloqués à travers la membrane plasmique, et d'autre part, que les Cys de l'apocytochrome soient sous leur forme réduite pour pouvoir fixer l'hème. En effet, le

périplasma des bactéries est un milieu oxydant, et les Cys de l'apocytochrome *c* sécrété vont être oxydés sous forme d'un pont disulfure, *via* la protéine DsbA. De ce fait, après son export vers le périplasma, l'apocytochrome va être incapable de fixer l'hème.

Les systèmes de maturation I et II des cytochromes *c* sont les plus répandus. Ils font tous les deux intervenir, en toute première étape, le domaine nDsbD qui doit céder ses électrons à une première protéine DsbE (équivalente à CcmG) (Figure 16). Cette dernière va permettre la réduction directe de l'apocytochrome dans le cas du système II ou *via* CcmH, dans le cas du système I. Il est à noter que l'espèce bactérienne *E. coli* adopte un système de type I contrairement à l'espèce bactérienne *N. meningitidis*, qui utiliserait un système de maturation de type II.

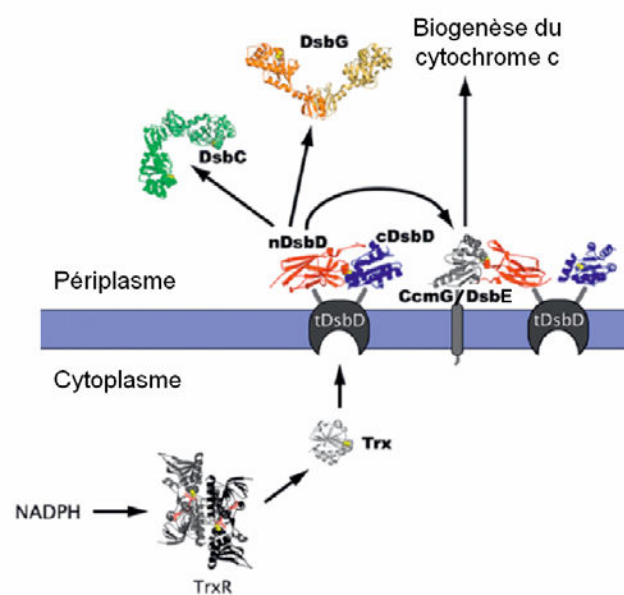


Figure 16 : Représentation des partenaires périplasmiques et cytoplasmiques de nDsbD. La première étape de la voie de biosynthèse des cytochromes *c* est figurée (adaptée de Stirnimann *et al.*, *Cell. Mol. Life Sci*, 2006)

Les eucaryotes, quant à eux, possèdent un système dit de type III qui contient une seule enzyme appelée CCHL (cytochrome *c* haem lyase) permettant la fixation de l'hème à l'apocytochrome.

IV.2.2. La protéine DsbE

A ce jour, plusieurs structures tridimensionnelles de DsbE ont été résolues : CcmG d'*E. coli*, CcmG de *B. japonicum*, ResA de *B. subtilis*, ainsi que la structure d'une DsbE particulière de la bactérie gram positive de *M. tuberculosis* (Ouyang *et al.*, 2006 ; Edeling *et al.*, 2002 ; Colbert *et al.*, 2006 ; Goulding *et al.*, 2004). La DsbE de *M. tuberculosis* présente une activité plutôt oxydante et cette différence de fonction par rapport aux autres DsbE se retrouve également au niveau de sa séquence et de sa structure.

Les DsbE sont des protéines monomériques constituées d'hélices α et de feuillet β qui contiennent un domaine avec un repliement de type Trx avec deux insertions supplémentaires. La première insertion est

située à l'extrémité N-terminale de la protéine et présente une structure en épingle à cheveux contenant deux brins β . La seconde insertion, également appelée insertion centrale, est localisée après le motif $\beta\alpha\beta$ et est composée d'une hélice α ainsi que d'un brin β (Figure 17). CcmG/DsbE possède de plus un segment hélicoïdal en position N-terminale permettant son ancrage dans la membrane. Ces insertions sont conservées chez tous les homologues de DsbE. Une délétion de l'insertion centrale empêche la formation de cytochromes *c* matures, sans toutefois changer la stabilité de la protéine (Edeling *et al.*, 2002). Cette insertion centrale pourrait donc avoir un rôle dans l'interaction entre DsbE et ses deux partenaires protéiques : l'apocytochrome *c* ou DsbD. Au contraire, une étude cristallographique a montré que l'insertion située en position N-terminale et contenant deux brins β était essentielle pour le maintien de la structure globale de la protéine ainsi que pour le maintien de la structure du site actif (Ouyang *et al.*, 2006). Une délétion de cette partie N-terminale empêche la formation de cytochromes *c* matures. Des alignements de séquences d'homologues de CcmG ont permis de mettre en évidence l'existence d'une région strictement conservée GVXGXPETF et appelée région « Fingerprint ». La structure de CcmG montre que cette région forme une boucle proche du site actif. A l'intérieur de ce motif se trouve le résidu Pro adoptant une disposition *cis* que l'on retrouve dans toutes les protéines Trx-like. La structure de CcmG d'*E. coli* révèle que la disposition « *cis*-Pro » dans cette région « Fingerprint » aide à stabiliser la structure du site actif grâce à des interactions de van der Waals avec le pont disulfure du site actif et grâce à la formation d'une liaison hydrogène avec une des Thr du site actif (Ouyang *et al.*, 2006). De plus, cette isomérisation *cis* permettrait de positionner correctement le résidu Ala143 adjacent pour permettre une interaction avec le partenaire DsbD. Le résidu Glu145 de cette région « Fingerprint » forme un pont salin avec Arg158 (parfois remplacé par Lys dans les différentes séquences de CcmG) ainsi qu'un réseau de liaisons hydrogène avec les chaînes principales des résidus présents à l'extrémité N-terminale. Toutes ces interactions permettent de positionner correctement la liaison amide *cis* Ala-Pro et donc de stabiliser le site actif.

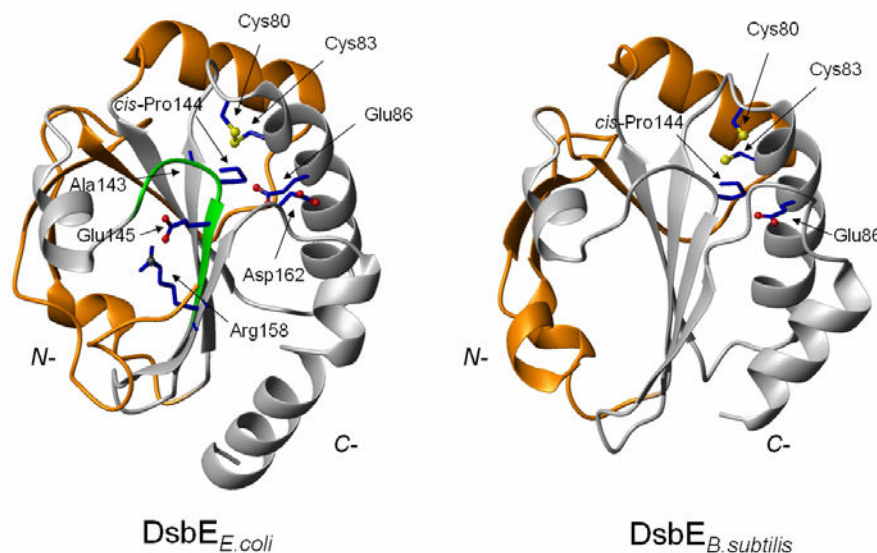


Figure 17 : Structures RX de la forme oxydée de DsbE d'*E. coli* et de la forme réduite de DsbE de *B. subtilis*.. Les deux insertions supplémentaires (par rapport au repliement Trx) sont figurées en orange et la région « fingerprint » en vert. Les atomes de soufre des cystéines du site actif sont représentés sous forme de boules jaunes. Les résidus Glu86, Pro144 et l'isomérisation *cis* de la liaison amide Ala143-Pro144 communs aux deux structures sont figurés. Les résidus Ala143, Glu145, Arg158 et Asp162 de DsbE d'*E. coli* sont aussi indiqués. La numérotation des résidus est basée sur celle d'*E. coli*. Les numéros d'accès PDB sont les suivants : 2b1k et 1lu4.

Le site actif des DsbE, comme celui de toutes les Trx-like, possède une signature CXXC. Néanmoins, une des particularités du site actif est qu'il est localisé dans un environnement constitué de nombreux résidus à caractère acide. Ceci est dû à la présence de deux Glu strictement conservés chez toutes les DsbE et d'un Asp qui n'est pas strictement conservé. DsbE de *M. tuberculosis* possède une structure tridimensionnelle quelque peu différente de celle décrite ci-dessus. Des alignements de séquence et des superpositions de structures 3D ont permis de mettre en évidence que deux régions strictement conservées chez les DsbE ne sont pas retrouvées dans DsbE de *M. tuberculosis*. En effet, la région N-terminale structurée en épingle à cheveux est beaucoup plus petite chez DsbE de *M. tuberculosis*, ce qui ne lui permet pas d'adopter une structuration similaire, la région « Fingerprint » n'étant pas conservée (Figure 17).

La structure RX d'un complexe entre nDsbD et DsbE d'*E. coli* a été résolue. Il en ressort que les changements structuraux majeurs s'opèrent au niveau de nDsbD. Ces aspects seront détaillés plus loin.

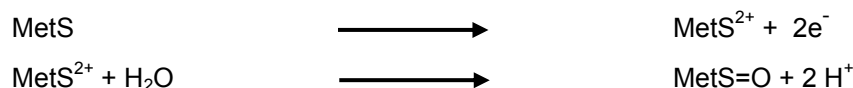
IV.3. Le système de réparation des protéines oxydées

Il a récemment été montré que le domaine nDsbD était capable d'interagir avec le domaine N-terminal de la protéine PilB (Brot *et al.*, 2006). Cette protéine, spécifique des bactéries du genre *Neisseria*, est impliquée dans les systèmes de réparation des protéines oxydées. En effet, elle possède deux domaines Méthionine sulfoxyde réductase capables de prendre en charge et de réparer les résidus méthionines sulfoxyde qui se forment sur les protéines sensibles aux espèces oxydantes. Ces dernières peuvent être produites, par exemple, par le système immunitaire de l'hôte du pathogène. En combattant les conséquences d'un métabolisme oxydant, une bactérie accroît ainsi sa pathogénicité.

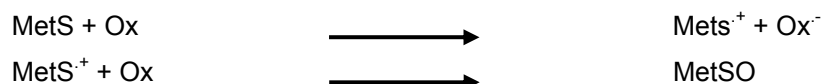
IV.3.1. Oxydation des méthionines par les formes activées de l'oxygène (FAO)

Le métabolisme aérobie produit en permanence des formes activées de l'oxygène (FAO). Cette production de FAO est contrebalancée par des systèmes de défenses anti-oxydants (catalases, peroxydases, superoxyde dismutases...). Cependant, dans certaines conditions, cet équilibre peut être rompu, à la suite soit d'une augmentation de la production de FAO (exposition à des concentrations élevées en O₂, infection bactérienne...), soit d'une diminution de l'efficacité des systèmes antioxydants. Ceci conduit alors à une augmentation des concentrations intracellulaires en FAO, appelée communément stress oxydant. Ces FAO vont réagir avec de nombreuses biomolécules, notamment avec l'ADN, les lipides ou encore les protéines, prenant part ainsi au processus du vieillissement cellulaire (Harman, 1981). Au niveau des protéines, un des acides aminés le plus sensible à l'oxydation par les FAO est la méthionine (Met).

Les Met vont être oxydées par deux mécanismes différents, impliquant une oxydation à un ou deux électrons. L'oxydation à deux électrons entraîne la formation d'un dication qui, en présence d'eau ou d'un réactif oxydant, va former la méthionine sulfoxyde (MetSO).



L'oxydation à un électron entraîne la formation d'un radical cation. Cette espèce est très instable et peut être oxydée en sulfoxyde par certaines FAO *via* une oxydation à un électron (pour revue, voir Schoneich, 2005).



Plusieurs entités oxydantes (Ox) vont être responsables de la formation de MetSO. On citera le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), le radical hydroxyle (OH[·]), le peroxyxynitrite (HOONO).

IV.3.2. Conséquence de l'oxydation des méthionines

L'oxydation des Met peut conduire à la dégradation de la protéine en constituant un marqueur de reconnaissance pour le protéasome (Friguet *et al.*, 2006). Ce phénomène, s'il est trop fréquent, peut donc être néfaste pour le métabolisme bactérien. Toutefois, l'oxydation des Met peut être aussi considérée comme une modification post-traductionnelle non enzymatique qui entraîne des changements des propriétés de ce résidu. En effet, la chaîne latérale de Met est plutôt hydrophobe et flexible. Au contraire, après oxydation en MetSO, la chaîne latérale devient plus polaire et plus encombrante. En fonction de la localisation des résidus Met oxydés, les conséquences peuvent être différentes.

Ainsi l'oxydation de Met enfouies au sein d'une protéine va engendrer des changements conformationnels locaux pouvant mener à l'altération, voire à la perte ou au gain de la fonction de certaines protéines. Par exemple (et pour n'en citer qu'un), la vitesse d'ouverture et de fermeture des canaux K⁺-dépendant est dépendante de l'état d'oxydation de certains résidus Met (Ciorba *et al.*, 1997). De plus, l'oxydation de résidus Met localisés à la surface de protéines peut avoir un rôle de protection pour ces protéines vis-à-vis d'un stress oxydant, en jouant un rôle préventif de tampon (Gitlin *et al.*, 1996).

IV.3.3. Les méthionine sulfoxyde réductases (Msr)

Les Msr catalysent la réduction des MetSO en Met et sont donc impliquées dans la lutte contre le stress oxydant, le vieillissement cellulaire et dans la pathogénicité des bactéries. Il existe deux classes de Msr, A et B, permettant respectivement la réduction des deux diastéréoisomères (LS) et (LR) de MetSO. Dans le cas de PilB de *Neisseria meningitidis*, en plus d'un troisième domaine en position N-terminale, ces deux domaines MsrA et MsrB sont présents.

Les MsrA et les MsrB ont un mécanisme catalytique identique. Les MsrA et MsrB, caractérisées jusqu'ici, sont des enzymes contenant des Cys essentielles à leur fonction. Elles présentent toutes le même mécanisme catalytique faisant intervenir la chimie de l'acide sulfénique (Figure 18) (Boschi-Muller *et al.*, 2000 ; Olry *et al.*, 2002 et pour revue, voir Boschi-Muller *et al.*, 2005).

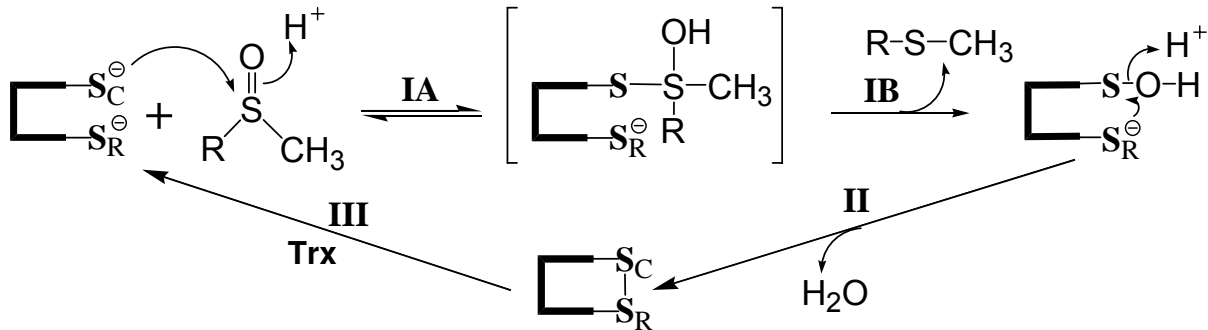


Figure 18 : Mécanisme catalytique des Msr à deux Cys. La formation du complexe Msr_{red} /substrat n'est pas explicitée. L'étape MetSO réductase peut être divisée en deux sous-étapes. Le substrat sulfoxyde est attaqué par la Cys catalytique (SC) de la MetSO réductase lors de l'étape IA, conduisant à la formation d'un état de transition de type sulfurane. Ce sulfurane évolue selon l'étape IB pour aboutir au relargage du soufre et à la formation de l'intermédiaire acide sulfénique, instable dans le milieu. L'attaque de la Cys de recyclage (SR) sur cet intermédiaire permet de former un pont disulfure intramoléculaire avec perte d'une molécule d'eau, lors de l'étape II. Enfin, le pont disulfure est réduit par Trx au cours de l'étape III (d'après Olry *et al.*, 2002).

Pourtant ces deux protéines ne présentent aucune identité de séquence. Leurs structures tridimensionnelles s'avèrent être également différentes (Figure 19). Les Msr sont toutes deux des protéines monomériques de 170 à 211 résidus pour les MsrA et de 146 résidus pour les MsrB. Les aspects structuraux relatifs aux Msr ne seront pas développés ici.

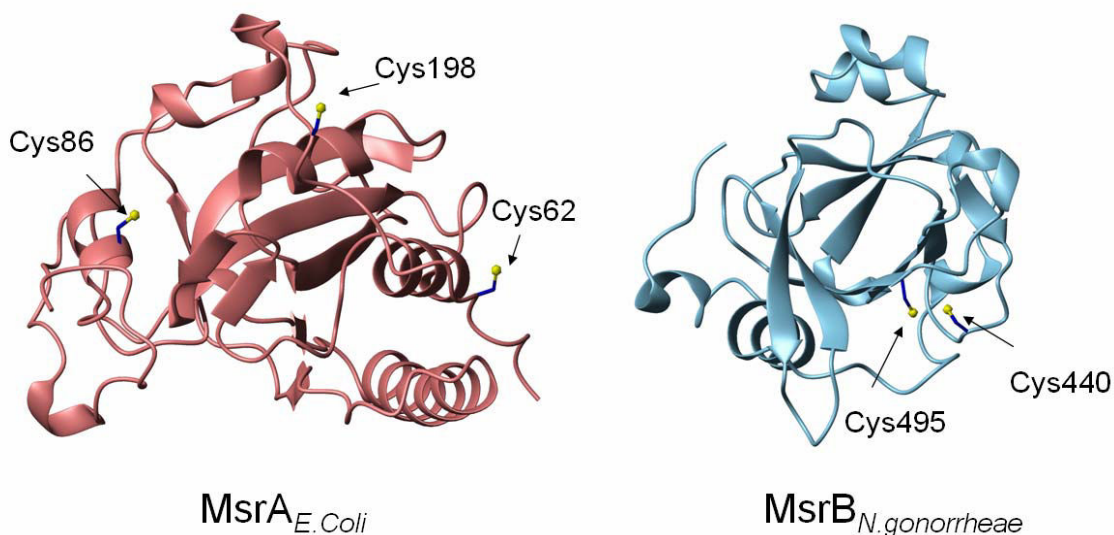


Figure 19 : Structures RX de la MsrA d'*E. coli* (résolue par Tête-Favier *et al.*, 2000) et du domaine MsrB de PIB de *N. gonorrhoeae* (Lowther *et al.*, 2002). Sont figurés les résidus cystéine. Les repliements de MsrA et MsrB sont effectivement très différents. Les numéros d'accès PDB sont les suivants : 1ff3 et 111d.

IV.3.4. Le domaine N-terminal de PilB

Singularisé à côté des deux autres séquences fonctionnelles MsrA et MsrB, le domaine N-terminal de la protéine PilB (NterPilB) possède un segment WCPLC correspondant à un centre disulfure rédox de type Trx avec un potentiel de -0,230 V. Il a été montré que NterPilB est capable de recycler l'activité réductase des domaines Msr isolés de PilB (Wu *et al.*, 2005) avec cependant une meilleure efficacité pour le domaine MsrB. Le mécanisme catalytique entre une Msr et NterPilB est identique à celui qui se met en place entre une Msr et Trx.

La structure de NterPilB de *Neisseria meningitidis* a été résolue par RX et a montré un repliement de type Trx et plus particulièrement de type DsbE avec une boucle additionnelle FLHE (Ranaivoson *et al.*, 2006) (Figure 20). Cette boucle, bien stabilisée par des liaisons hydrogène, est supposée importante vis-à-vis de la spécificité de substrat. En effet, il a été montré que NterPilB était capable de réduire efficacement le domaine MsrB oxydé de PilB alors que DsbE (plus proche homologue structural dont la topologie globale diverge essentiellement par l'absence de la boucle FLHE) ne le pouvait pas. Il reste toutefois des éléments à apporter pour répondre à la question du rôle de cette boucle vis-à-vis des partenaires de NterPilB.

Des études récentes *in vitro* ont aussi montré que NterPilB de *N. gonorrhoeae* était réduit par le domaine nDsbD d'*E. coli* (Brot *et al.*, 2006). Les séquences de NterPilB de *N. meningitidis* et de *N. gonorrhoeae* présentent un très fort taux de similarité puisque seuls 6 résidus (éloignés du site actif) sont différents. Les structures RX de ces deux protéines sont ainsi extrêmement proches.

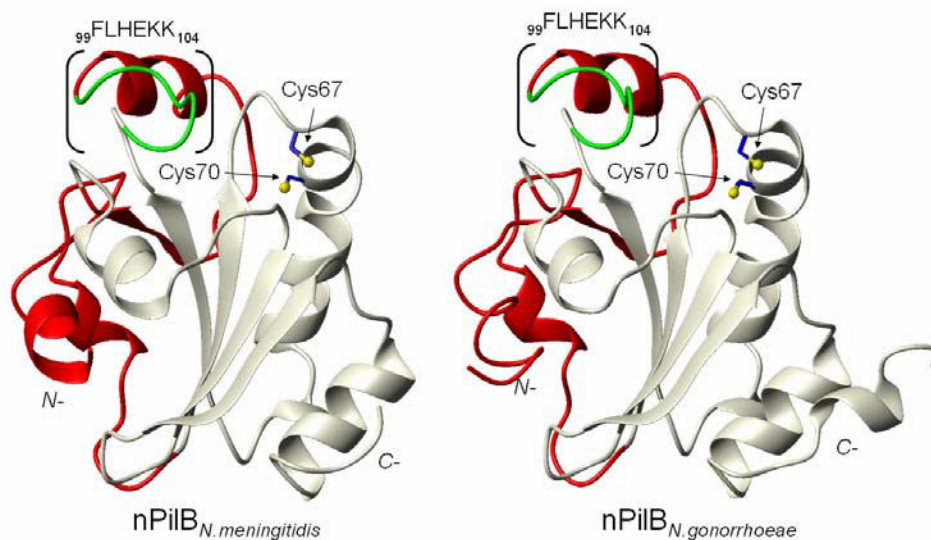


Figure 20 : Structures RX des domaines N-terminaux de PilB de *Neisseria meningitidis* et de *Neisseria gonorrhoeae*. Les extensions représentées en rouge sont spécifiques du repliement DsbE. La boucle FLHE supplémentaire du domaine NterPilB est indiquée entre parenthèses. Les numéros d'accès PDB sont les suivants : 2fy6 et 2h30.

Le mécanisme supposé pour la protéine PilB est le suivant : les protéines contenant des résidus MetSO sont pris en charge de façon stéréosélective par les domaines Msr A ou B réduits de PilB. Ces domaines cèdent leurs électrons à MetSO qui recouvre son état réduit Met. Ce processus engendre la

formation d'un pont disulfure intramoléculaire au sein de l'un des domaines Msr A ou B. Ce pont disulfure sera réduit par le domaine N-terminal de PilB sous forme réduite. A ce stade, demeurent quelques interrogations quant à la nature intra- ou inter-moléculaire de la réparation. En effet, l'intervention d'une deuxième protéine PilB est envisageable. Chacune des Msr recouvre, quoiqu'il en soit, sa propre activité réductrice et le domaine NterPilB oxydé reçoit des électrons provenant de nDsbD.

IV.4. Le domaine N-terminal de DsbD : aspects structuraux

Nous venons de voir que nDsbD était impliqué dans de nombreuses voies métaboliques. L'inspection des structures de ses partenaires aval (DsbC, DsbE et DsbG) et amont (cDsbD) démontre la particularité de nDsbD à n'interagir qu'avec des protéines de type Trx-like. Toutefois, il convient de remarquer que tous ces partenaires ne présentent pas des structures primaires, secondaires et tertiaires réellement identiques. Le repliement Trx étant qualifié de particulièrement rigide, il est donc justifié de penser que l'adaptabilité lors de l'interaction devrait majoritairement se faire au niveau de nDsbD.

IV.4.1. Structure de nDsbD d'*E. coli* à l'état non lié

Jusqu'à présent, seule l'espèce bactérienne *E. coli* a fait l'objet d'études structurales en ce qui concerne nDsbD. La structure de nDsbD d'*E. coli* est décrite comme appartenant à la famille des immunoglobulines (Goulding *et al.*, 2002) (Figure 21).

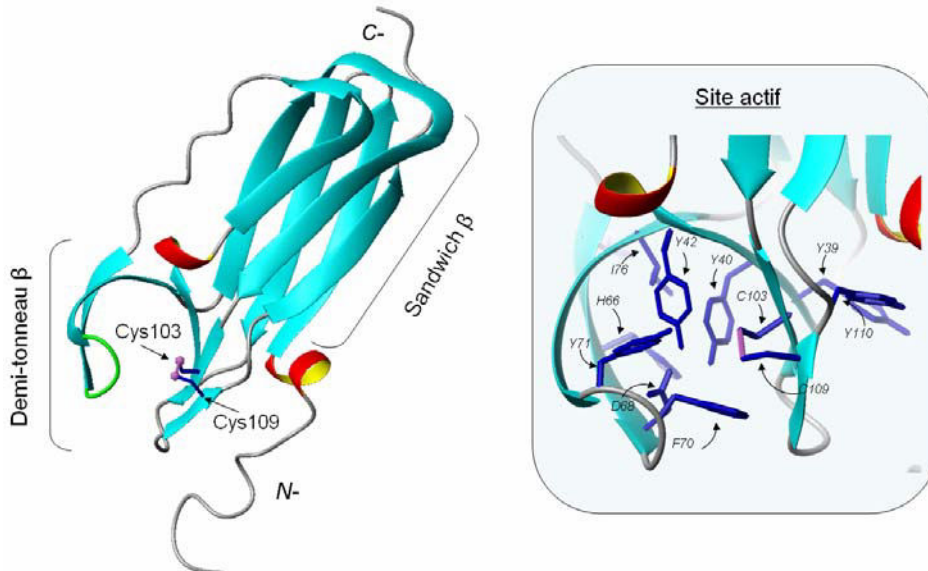


Figure 21 : Structure RX de la forme oxydée de nDsbD d'*E. coli*. La structure globale de la protéine est représentée à gauche : y figurent les résidus cystéine ; en vert est indiquée la région « couvercle ». Le site actif est représenté à droite : on peut y voir le cycle aromatique du résidu Phe70 qui vient encombrer l'entrée du demi-tonneau β et surplomber le pont S-S (en violet).

On y retrouve la structure de type sandwich β caractéristique, formée de la superposition de deux feuillets β (ici à 3 brins). Le site actif adopte la forme d'un demi-tonneau dit β et constitué de l'association de 5 feuillets β . Les deux cystéines permettant la formation d'un pont disulfure pointent vers l'intérieur de la

cavité créée par cette structure particulière. Le site actif est particulièrement encombré par les chaînes latérales de résidus aromatiques. Une région « couvercle » ou « cap-loop », formée par les résidus 68 à 72, vient obstruer, voire contrôler, l'entrée du demi-tonneau β . Une interaction de type S- π entre le cycle aromatique de Phe70 et le pont S~S permet de stabiliser cette conformation locale dans la structure RX.

Ce type de repliement est complètement inédit pour une disulfide réductase. Toutefois, si on se réfère à ce qui est observé dans les disulfide oxydoréductases de type Trx, un mécanisme d'action pour nDsbD faisant intervenir un transfert de protons *via* les résidus Asp68 et Tyr42 a pu être proposé (Figure 22).

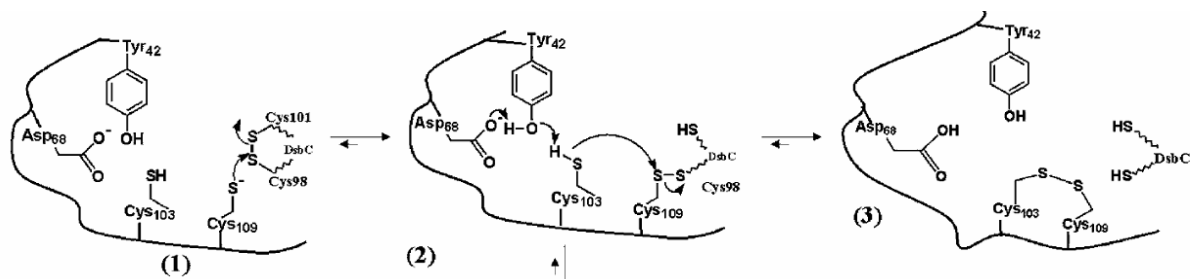


Figure 22 : Mécanisme possible de réduction de la protéine DsbC par nDsbD (d'après Goulding *et al.*, 2002).

IV.4.2. Les différents modes d'interaction de nDsbD sous forme de complexe

nDsbD est un sujet d'étude particulièrement intéressant pour l'analyse des interactions protéine-protéine puisque sa structure a été caractérisée *in vivo* dans les états non-lié et lié à des partenaires. Trois structures RX de complexes mixtes impliquant nDsbD_{*E.coli*} et un partenaire covalamment lié *via* un pont disulfure sont disponibles (Figure 23) :

- le complexe nDsbD-SS-cDsbD : il permet de caractériser l'interaction avec le partenaire amont de nDsbD (Rozhkava *et al.*, 2004).
- le complexe nDsbD-SS-DsbC : il permet de caractériser, d'un point de vue structural, une des premières étapes de la voie de formation des ponts S~S dans les protéines (Haebel *et al.*, 2002).
- le complexe nDsbD-SS-DsbE : il permet de caractériser, d'un point de vue structural, la première étape de la voie de biogenèse des cytochromes *c* (Stirnemann *et al.*, 2005).

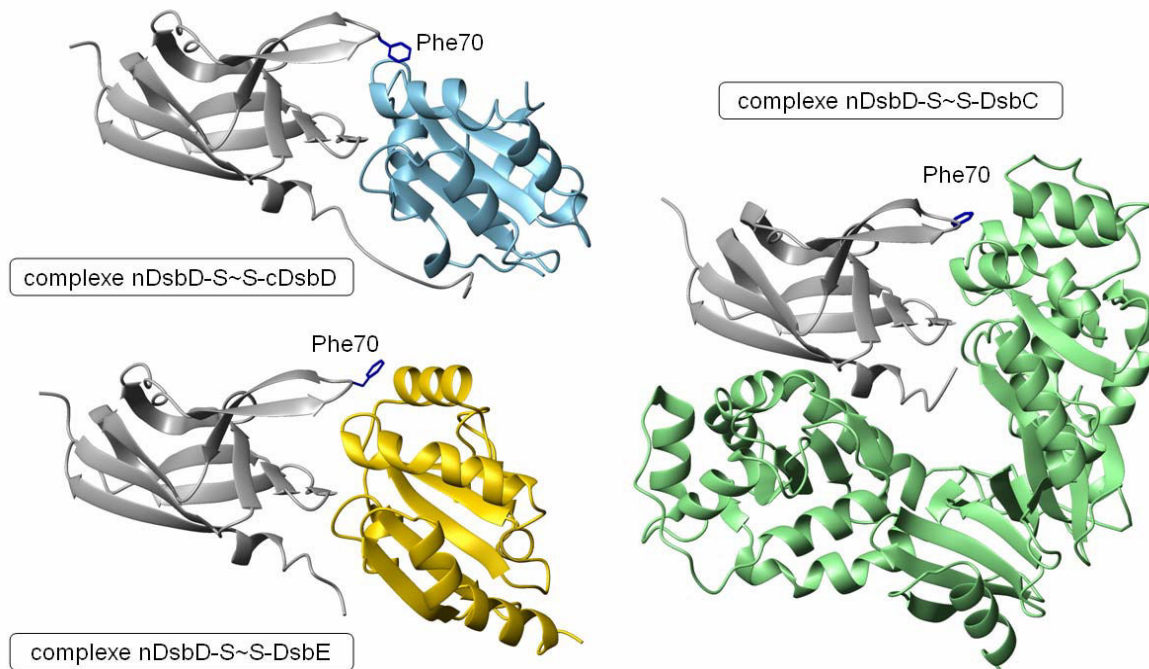


Figure 23 : Structures RX de nDsbD d'*E. coli* (gris) covalamment complexée avec cDsbD (bleu ciel), avec DsbC (vert) et avec DsbE (jaune). Le cycle aromatique du résidu Phe70 est représenté en bleu.

Suite à la formation du complexe avec DsbC, la région « couvercle » de nDsbD s'ouvre et l'homodimère DsbC adopte une conformation plus refermée (Figure 24). Comme il l'a été déjà mentionné, ce complexe possède deux interfaces de contact : (i) dans la première, Cys109 de nDsbD forme un pont disulfure avec Cys98 d'un des monomères de DsbC ; (ii) dans la deuxième, le site actif du second monomère de DsbC interagit de façon non-covalente avec la face formée par les brins $\beta 1$ et $\beta 12$ de nDsbD établissant ainsi un pont salin entre les protéines. La modélisation d'un complexe nDsbD-SS-DsbG sur les bases de la structure RX du complexe nDsbD-SS-DsbC et de la surface de contact de la zone des Cys montre que le sillon de DsbG est en principe assez large pour que l'homodimère DsbG accepte deux copies de nDsbD sans gêne stérique. De plus, les analyses indiquent qu'une deuxième surface de contact entre DsbG et nDsbD est improbable. Cependant, la réduction *in vivo* simultanée des deux monomères de DsbG par deux domaines nDsbD n'a pas été démontrée.

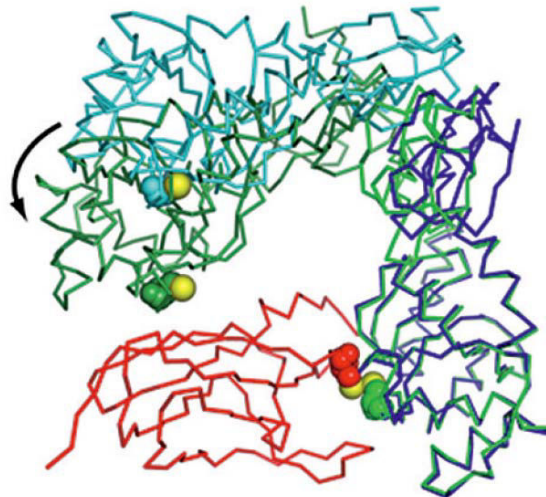


Figure 24 : Resserrement du sillon de l'homodimère DsbC (en bleu et en vert) lors de l'interaction avec nDsbD (en rouge) (d'après Stirnimann *et al.*, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2006)

Suite à la formation du complexe avec nDsbD (nDsbD-SS-cDsbD), cDsbD subit un changement conformationnel significatif (mais très localisé) consistant en une rotation d'environ 100° du groupement carbonyle de Thr529. Là aussi, la région « couvercle » s'ouvre et même plus largement que dans le complexe obtenu avec DsbC. En superposant ces deux complexes, on remarque que l'orientation de leurs repliements de type Trx diverge d'une vingtaine de degrés. Dans son complexe avec nDsbD, cDsbD ne partage qu'une seule surface de contact avec son partenaire, contrairement aux deux interfaces observées avec DsbC. Cette interface commune aux deux complexes possède une taille similaire de l'ordre de 1300 \AA^2 ; cependant la surface totale de contact entre nDsbD et l'homodimère DsbC est environ 1,5 fois plus grande du fait de la deuxième zone de contact entre les deux protéines. Ce constat implique une meilleure affinité de nDsbD envers cDsbD qu'envers DsbC. La réduction de nDsbD par cDsbD et DsbC sont toutefois toutes les deux très rapides avec des constantes de vitesse respectives de $1,1 \times 10^{-5}$ et $3,9 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Rozhkova *et al.*, 2004).

CcmG/DsbE est le troisième partenaire pour lequel une structure RX du complexe covalent avec nDsbD est disponible. nDsbD interagit avec CcmG/DsbE d'une façon comparable à cDsbD. L'orientation du repliement Trx est la même et la région « couvercle » de nDsbD s'ouvre d'une façon similaire lors de la formation du complexe covalent entre les deux protéines. Concernant cette zone particulière de nDsbD, il semblerait cependant que sa flexibilité soit plus importante dans le complexe nDsbD-SS-CcmG/DsbE au regard, entre autres, des données de densité électronique. Une caractéristique de ce complexe est l'engagement de la partie N-terminale de nDsbD, grâce à ses résidus Ser9 et Phe11, dans la surface d'interaction avec CcmG/DsbE. Ces résidus forment un réseau de liaisons hydrogène avec Tyr141 de CcmG/DsbE qui est hautement conservé à travers les espèces. De plus, le cycle phénolique de Tyr141 vient se loger dans une poche hydrophobe formée de résidus appartenant à nDsbD et CcmG/DsbE. Il est à remarquer que les protéines DsbC et cDsbD ne possèdent pas de tyrosine à cette position (mais

respectivement une serine et une leucine) et qu'elles n'interagissent pas avec la partie N-terminale de nDsbD.

IV.4.3. La fonction centrale de nDsbD

Dans les trois complexes évoqués dans les paragraphes précédents, environ 90% des résidus de nDsbD engagés dans l'interface entre les sites actifs sont invariants. Cette zone de contact, avec une superficie d'environ 1350 Å², est plutôt petite et ne fait intervenir qu'un nombre restreint d'interactions intermoléculaires.

L'adaptabilité de nDsbD à ces trois différentes cibles est le résultat, au minimum, de trois caractéristiques structurales (Figure 25) : (i) nDsbD possède une zone flexible en forme de couvercle surplombant les cystéines actives et assurant une conformation fermée en l'absence de ligand ; (ii) nDsbD est capable d'engendrer des interactions non-covalentes sur un de ses flancs dans le cas de son interaction avec DsbC ; (iii) la région N-terminale de nDsbD joue un rôle dans la reconnaissance de CcmG/DsbE avec la création d'un réseau de liaisons hydrogène intermoléculaires et d'interactions hydrophobes impliquant le résidu conservé Tyr141.

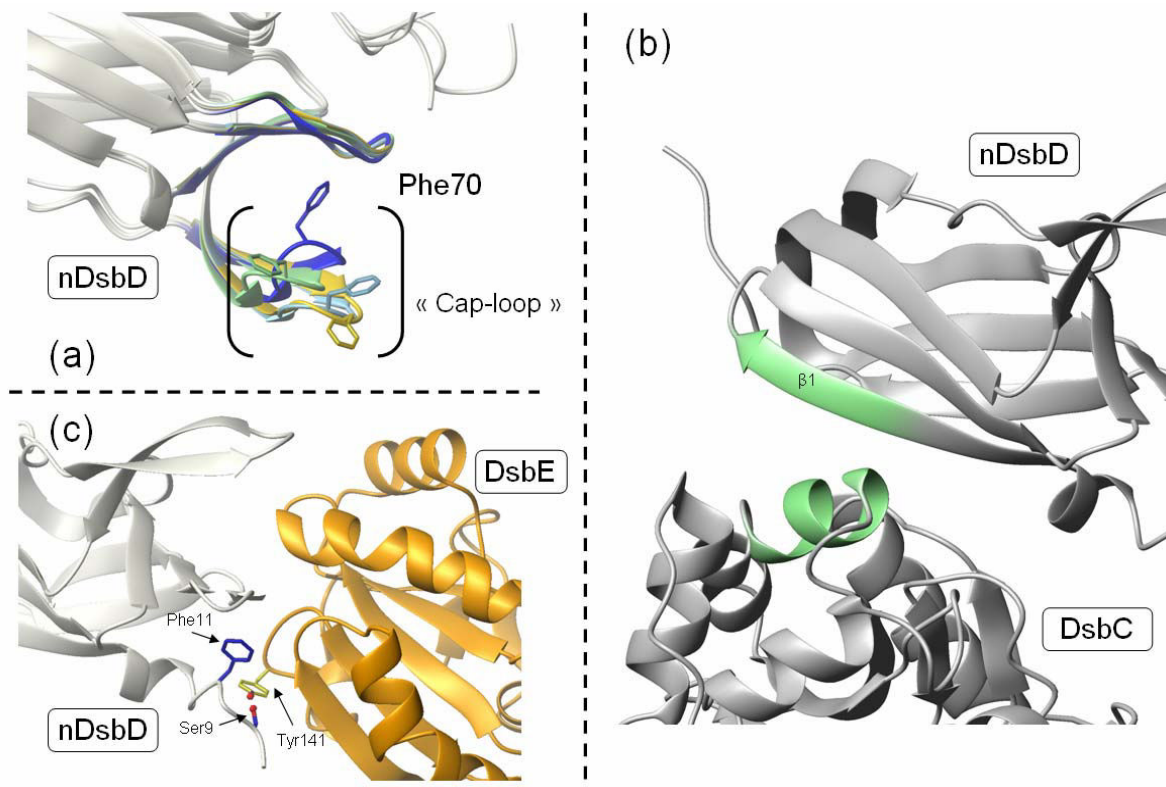


Figure 25 : (a) Représentation de la région « couvercle » ou « cap-loop » de nDsbD d'*E. coli* à l'état non lié (bleu foncé), à l'état covalentement complexée avec cDsbD (bleu ciel); avec DsbC (vert) et avec DsbE (jaune). Le cycle aromatique du résidu Phe70 y est représenté. (b) Mise en évidence de la seconde surface d'interaction entre le flanc de nDsbD et DsbC. (c) Mise en évidence des interactions entre la partie N-terminale de nDsbD et le résidu conservé Tyr141 de DsbE. Toutes ces structures ont été obtenues par RX.

Contrairement à nDsbD, deux des trois partenaires (cDsbD et CcmG/DsbE) ne subissent que des changements conformationnels mineurs lors de la formation du complexe covalent. Dans le cas du complexe impliquant DsbC, le changement conformationnel majeur concerne le rapprochement des deux sous-unités de cet homodimère mais le repliement Trx des monomères n'est lui aussi pas affecté.

Ces analyses structurales ont conduit à la proposition d'un modèle de fonctionnement de nDsbD impliquant des changements d'orientation significatifs de nDsbD (Stirnemann *et al.*, 2006). A partir des informations sur les orientations probables des complexes ancrés dans la membrane (nDsbD-SS-cDsbD et nDsbD-SS-DsbC), il a été proposé que nDsbD devrait changer, et de façon importante, son orientation spatiale en fonction du substrat à réduire. Lors de la formation du complexe nDsbD-SS-DsbC, nDsbD devrait avoir une orientation encore différente pour une interaction efficace avec les deux monomères de DsbC. Ces observations soulignent d'autant mieux le rôle de centre distributeur d'électrons de nDsbD dans le périplasma des bactéries gram négatives.

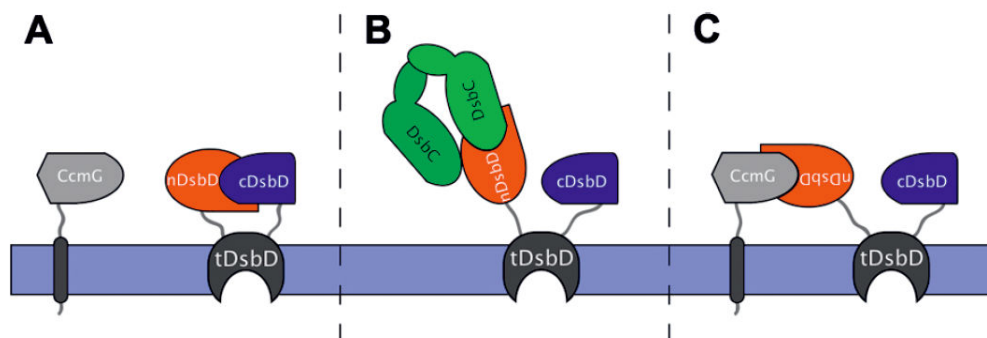


Figure 26 : Illustration schématique de diverses orientations de nDsbD selon son partenaire (Stirnemann *et al.*, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2006).

V. Conclusion et problématique

Comme nous venons de le voir, chez *Neisseria meningitidis*, nDsbD est responsable du maintien de l'état réduit de NterPilB, seul état capable de rendre leur activité aux domaines Msr oxydés. Plus généralement, nDsbD est considéré comme un centre de distribution des électrons permettant de fournir des électrons, non seulement au système de maturation des cytochromes *c* via DsbE ainsi qu'aux protéines chaperonnes DsbC et DsbG, mais aussi au système de réparation des protéines oxydées via son interaction avec PilB. Les protéines nDsbD et NterPilB sont donc au départ d'une voie métabolique importante et caractéristique des bactéries du genre *Neisseria*.

L'étude bibliographique qui précède nous montre : (i) que NterPilB de *N. meningitidis* possède une insertion caractéristique surplombant le site actif et suspectée d'intervenir dans sa sélectivité de substrat ; (ii) que le site actif de nDsbD d'*E. coli* est recouvert par une région « couvercle » capable de s'ouvrir lors son interaction avec les partenaires cDsbD, DsbC et DsbE. De plus, nous savons que les protéines appartenant à la famille structurale des Trx (comme c'est le cas pour NterPilB) sont globalement rigides et

ne présentent que peu de différences structurales selon leur état rédox. Toutefois de nombreuses questions restent posées quant aux mécanismes impliquant la reconnaissance de ses partenaires par nDsbD.

En effet, (i) la structure globale de nDsbD de *N. meningitidis* est-elle identique à celle de *E. coli*, seule espèce bactérienne pour laquelle des études structurales ont été entreprises ? (ii) la région « couvercle » de nDsbD est-elle alors présente et, si oui, démontre-t-elle des capacités d'ajustement conformationnel ? (iii) les structures de NterPilB sont-elles réellement identiques selon l'état rédox, la structure de la forme réduite étant la seule disponible actuellement (Ranaivoson *et al.*, 2006) ? (iv) la boucle FLHE, caractéristique de NterPilB, adopte-t-elle une conformation différente et/ou des capacités d'ajustement conformationnel selon l'état d'oxydation ? (v) un complexe mixte entre nDsbD et NterPilB présente-t-il des caractéristiques structurales différentes de celles déjà observées ? (vi) les propriétés dynamiques de chacun des partenaires sont-elles modifiées lors de la formation du complexe ?

Toutes ces questions, et notamment celles concernant la dynamique interne de ces protéines, demeurent car seules des études par diffraction aux RX ont été entreprises jusqu'à présent sur NterPilB et nDsbD. Cette technique ne permet pas d'accéder facilement et de façon fiable à la flexibilité des différents segments du squelette des protéines. Par contre, la résonance magnétique nucléaire est une technique de choix car elle permet de déterminer la structure en solution des biomolécules mais aussi d'estimer la dynamique interne de ces molécules. De plus, le développement des techniques de « Docking » permet de modéliser finement la structure de complexes de grande taille à partir de la structure de chacun des monomères et des contraintes RMN. Cela permet de ne plus limiter la RMN à l'étude de protéine de petite taille.

Le chapitre 2 suivant va traiter des différentes techniques RMN que nous avons mises à profit pour tenter de répondre aux questions posées ci-dessus.

Chapitre 2 : La résonance magnétique nucléaire appliquée aux protéines

La résonance magnétique nucléaire (ou RMN) est un procédé analytique en pleine évolution depuis plus de quarante ans. De nos jours, elle constitue une technique de pointe largement développée mais qui tire ses fondements au cours des siècles passés : le 18^{ème} siècle, avec Jean-Baptiste Fourier et sa fameuse transformée ; le 19^{ème} siècle, avec Maxwell et la découverte de l'électromagnétisme ou bien encore la première moitié du 20^{ème} siècle, avec Pauli et son principe d'incertitude. La première expérience RMN a été enregistrée en 1946, dégageant ainsi la voie de la nobélisation pour tous ses spécialistes. La technique demeurera dès lors en constante amélioration, avec la démultiplication des dimensions pour l'observation d'hétéronoyaux.

Les principaux avantages de la méthode (précision, reproductibilité, méthode non-destructive...) en ont fait un outil de choix dans plusieurs secteurs de la recherche scientifique comme la biologie structurale, la médecine ou la chimie. L'application la plus spectaculaire de cette technique demeure l'imagerie médicale (ou IRM), développée au début des années 1980, où l'utilisation des propriétés magnétiques des noyaux des atomes permet l'étude non-invasive des tissus mous du corps humain tels que le cerveau.

I. Les principes de la RMN et le phénomène de résonance

Cette partie n'a pas pour vocation d'expliquer en profondeur les principes théoriques de la RMN mais plutôt de donner un aperçu pratique de la méthode.

I.1. Les principes

Comme explicité ci-dessus, la RMN repose sur l'analyse des propriétés magnétiques des noyaux atomiques. Pour les noyaux, comme le proton, dont le nombre de spin est non-nul, il existe plusieurs niveaux d'énergie, avec un léger excès de population sur le niveau d'énergie le plus stable. Ce sont les transitions entre ces niveaux qui constituent le phénomène de résonance magnétique nucléaire. Pour observer un signal, il faut rompre l'équilibre entre les deux niveaux d'énergie. L'échantillon doit alors être soumis à un champ magnétique, produit par une source de radiation électromagnétique, appelée impulsion, perpendiculaire au champ B_0 très stable produit par l'aimant du spectromètre. L'aimantation globale sera transférée dans le plan xy, perpendiculaire à l'axe z et donc au champ B_0 . Dès que l'impulsion est terminée,

le moment magnétique « précesse » autour de B_0 et l'aimantation globale induit un courant électrique dans une bobine réceptrice. L'aimantation globale M revient alors à sa position initiale par un phénomène de relaxation. C'est pendant cette période de retour à l'équilibre que les données sont enregistrées par le spectromètre RMN. Les noyaux de la molécule étudiée vont « résonner » à différentes fréquences (dites fréquences de Larmor) dépendant, entre autres, de l'environnement dans lequel ils se trouvent. Le signal enregistré est appelé interférogramme (ou FID pour Free Induction Decay) qui est représenté par une sinusoïde amortie en fonction du temps. Ces signaux contiennent un grand nombre d'informations qui sont difficiles à interpréter dans l'espace temps. Une transformée de Fourier est alors appliquée sur l'interférogramme et permet d'obtenir un spectre RMN. Chaque noyau (comme par exemple ^1H , ^{13}C ou ^{15}N) possède une fréquence qui lui est propre et qui varie légèrement en fonction de son environnement (Figure 27). Il convient de déterminer la fréquence de chacun des noyaux pour en tirer les informations structurale et/ou dynamique de la molécule.

Pour plus de détails sur les principes fondamentaux de la RMN, il faut se rapporter, par exemple, au livre de John Cavanagh, « Protein NMR Spectroscopy : Principles and Practice (Academic press, 1996) ».

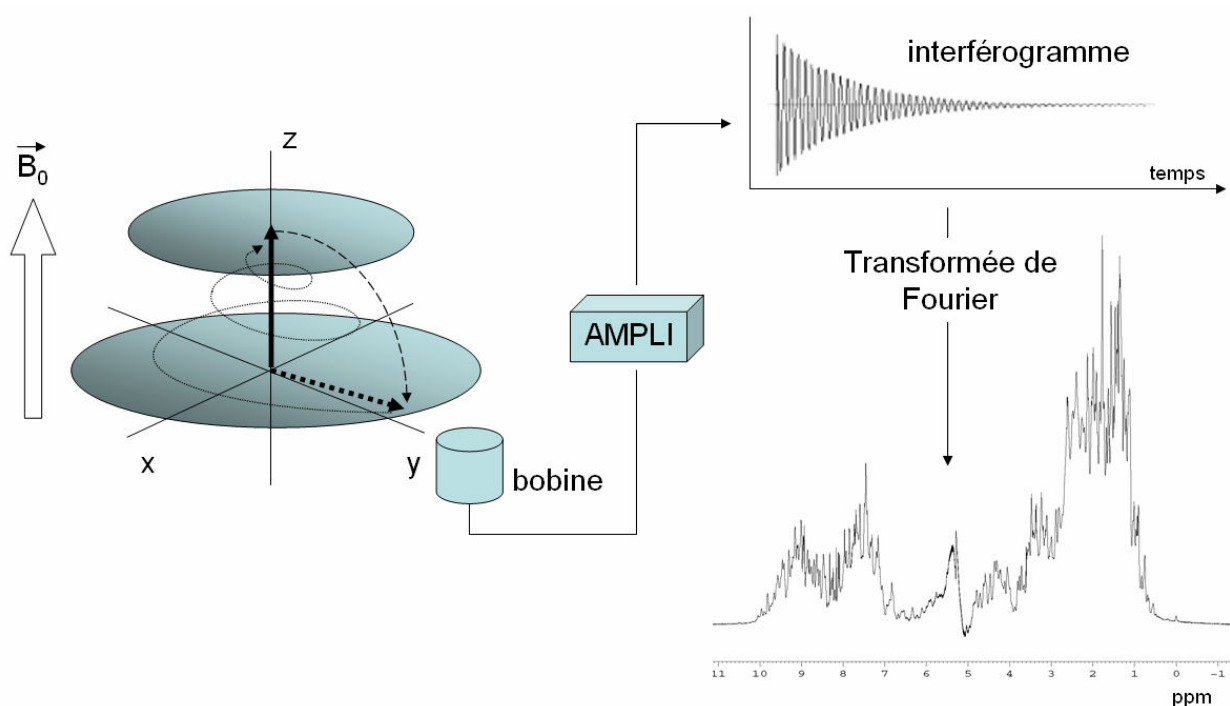


Figure 27 : Représentation schématique et simplifiée d'une expérience RMN. Une impulsion permet de transférer l'aimantation sur le plan de mesure xy. Le retour à l'équilibre du moment magnétique se fait par rotation autour de l'axe z parallèle au champ magnétique B_0 . Le phénomène de résonance est enregistré par une bobine réceptrice. L'interférogramme résultant subit une transformée de Fourier permettant de représenter une intensité non plus dans le domaine temporel mais dans le domaine fréquentiel. Le spectre unidimensionnel ^1H représenté ici est celui enregistré sur le mutant C103S du domaine N-terminal de la protéine DsbD de *Neisseria meningitidis*.

I.2. Application aux protéines

Les protéines sont des macromolécules nécessaires à tous les organismes vivants. Elles dérivent de l'information génétique portée par l'ADN et consistent en un arrangement tridimensionnel d'acides aminés. Elles remplissent des fonctions très diverses allant de la catalyse (enzymes) à la communication (hormones) en passant par le transport (hémoglobine). Les notions de structure et de fonction sont étroitement liées puisque c'est la nature chimique même et l'arrangement dans l'espace des résidus de la protéine qui lui confère son activité, le plus souvent spécifique. Toutefois, il a pu aussi être montré que certaines protéines tiraient leur activité de leur état « non structuré » (Santucci *et al.*, 2008). Il devient ainsi important de résoudre les structures tridimensionnelles des protéines afin de mieux comprendre leur rôle au sein d'un organisme. Appliquées à des bactéries pathogènes telles que celles du genre *Neisseria*, l'ensemble des données recueillies, et plus particulièrement celles d'ordre structural, permettent la conception de systèmes inhibiteurs basés sur le blocage spécifique des sites actifs des protéines.

Actuellement, l'étude des paramètres structuraux des protéines s'effectue majoritairement par des techniques de diffraction des rayons X (RX). Ce procédé, largement éprouvé pour des protéines de tailles importantes, requiert toutefois l'obtention d'un cristal protéique et implique de fait, la mise en condition de solvataion particulière de l'échantillon à étudier. *In vivo*, les protéines baignent dans le liquide physiologique ou sont enchâssées dans les membranes cellulaires. Les conditions permettant la formation d'un cristal (et la nature même du cristal) peuvent ainsi paraître bien éloignées des conditions physiologiques. C'est pourquoi de nouvelles méthodes d'investigation structurale en milieu liquide ont dû être développées. L'étude en solution par RMN des protéines entre, de nos jours, dans le champ des possibles mais il a fallu pour cela franchir de nombreuses barrières technologiques. Des avancées majeures ont alors permis d'accroître la résolution de la méthode et l'étude de protéines de plusieurs centaines de kDa (Fiaux *et al.*, 2002). De plus, de nombreux outils pour l'attribution des fréquences de résonance, le calcul des structures et l'analyse des données de relaxation des atomes d'azote et de carbone ont été (et sont encore) développés, accélérant et facilitant ainsi le travail des spectroscopistes.

II. Démarche pour l'étude structurale des protéines par RMN

La démarche RMN classique pour l'étude de la structure en solution des protéines est schématisée Figure 28. Elle fait intervenir différentes étapes allant de l'enregistrement des spectres à la validation des structures. Dans la méthode conventionnelle, chacune de ces étapes représente un point de passage obligatoire.

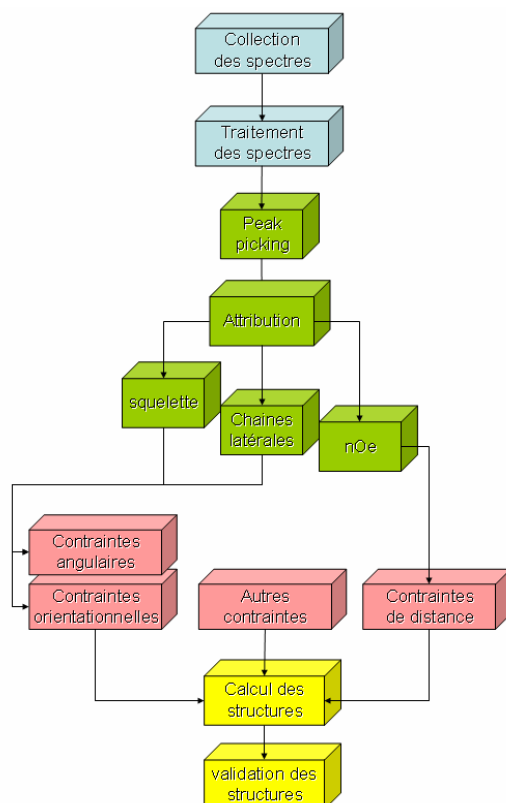


Figure 28 : Les différentes étapes de la démarche RMN : de l'enregistrement des spectres à la validation d'une structure tridimensionnelle.

II.1. Attribution séquentielle

L'attribution des fréquences de résonances des protons ainsi que des atomes de carbone et d'azote d'une protéine dite « marquée » est une démarche devenue désormais classique. Elle fait le plus couramment appel à une batterie d'expériences RMN, à deux et trois dimensions, enregistrées sur un échantillon (dont la concentration est de l'ordre de la centaine de μM) enrichi en isotope ^{13}C et/ou ^{15}N par des techniques de marquage, elles aussi devenues courantes aujourd'hui. De très nombreuses expériences ont été développées de façon à accéder aux fréquences de tous les noyaux, qu'ils appartiennent au squelette peptidique, aux chaînes latérales aliphatiques ou aromatiques. Ce sont aux travaux de Bax et Kay que l'on doit la mise au point de la plupart de ces séquences RMN. Une liste (non exhaustive) d'expériences 3D classiquement utilisées est donnée dans le Tableau 1.

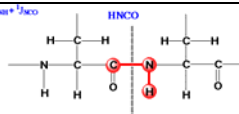
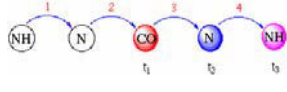
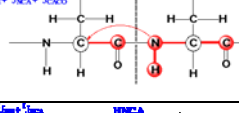
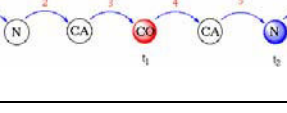

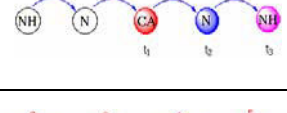
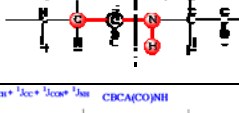
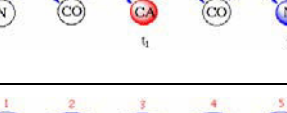
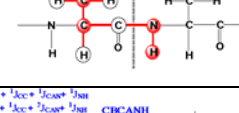


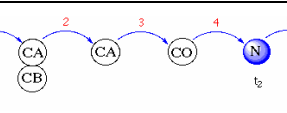
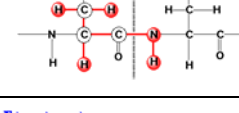
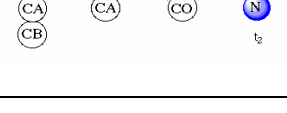

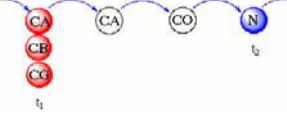
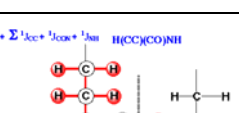
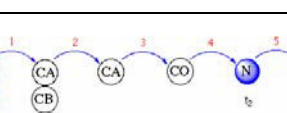
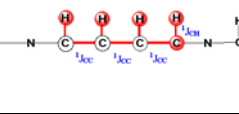
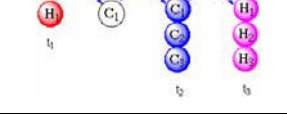

Expérience	Atomes concernés	Transfert d'aimantation
HNCO	$^1J_{NH} + ^2J_{CO}$ 	
HN(CA)CO	$^1J_{NH} + ^2J_{NC} + ^3J_{CO}$ 	
HNCA	$^1J_{NH} + ^2J_{NC}$ 	
HN(CO)CA	$^1J_{NH} + ^2J_{NC} + ^3J_{CO}$ 	
CBCA(CO)NH	$^1J_{NH} + ^2J_{NC} + ^3J_{CO} + ^4J_{CA}$ 	
CBCANH, HNCACB	$^1J_{NH} + ^2J_{NC} + ^3J_{CO} + ^4J_{CA}$ 	
HBHA(CO)NH	$^1J_{NH} + ^2J_{NC} + ^3J_{CO} + ^4J_{CA}$ 	
(H)CC(CO)NH- TOCSY	$^1J_{NH} + \sum ^2J_{NC} + ^3J_{CO} + ^4J_{CA}$ 	
H(CC)(CO)NH- TOCSY	$^1J_{NH} + \sum ^2J_{NC} + ^3J_{CO} + ^4J_{CA}$ 	
HCCH-TOCSY	$^1J_{CC} + ^2J_{CC}$ 	
$^{15}N/^{13}C$ NOESY-HSQC		

Tableau 1 : Quelques expériences RMN hétéronucléaires tridimensionnelles, actuellement utilisées en routine.

Les données recueillies permettent, dans un premier temps, l'attribution de la fréquence des noyaux du squelette peptidique (N, C', C^α, H^α et H^N) et, dans un deuxième temps, des chaînes latérales. Selon la concentration de l'échantillon, la puissance du spectromètre et la taille de la protéine, le temps total d'acquisition permettant d'attribuer de façon quasi-complète la totalité des noyaux d'une protéine varie d'une à plusieurs semaines. Le développement de nouvelles séquences d'impulsions plus sensibles, ou combinant par exemple les dimensions hétéroatomiques ¹⁵N et ¹³C, tend à minimiser le temps d'acquisition. L'exploitation des spectres est l'étape la plus longue et peut prendre plusieurs mois si elle n'est pas assistée par des systèmes d'attribution automatique.

Pour plus de précisions sur le sujet, il est conseillé de se rapporter à la revue de Whitehead *et al.*, 1997.

II.2. Résolution d'une structure tridimensionnelle en solution

Conventionnellement, l'attribution du squelette peptidique et des chaînes latérales est la condition préalable indispensable à la résolution de la structure tridimensionnelle en solution. Cette dernière consiste à rassembler, dans le cadre d'un protocole de modélisation moléculaire, des informations, géométriques, orientationnelles et de distances spatiales.

II.2.1. Les contraintes de distances spatiales

Les contraintes de distance sont les informations structurales les plus utilisées lors de l'étude conformationnelle d'une macromolécule par RMN. Ces contraintes dérivent de l'estimation des distances entre noyaux proches dans l'espace. La collecte d'un jeu de contraintes de distance, décrivant la position relative des noyaux de la molécule, les uns par rapport aux autres, et, en fin de compte, la structure tridimensionnelle de la molécule, est possible *via* l'exploitation d'expériences basées sur l'effet Overhauser nucléaire. Cette méthode spectroscopique s'appuie sur l'existence d'un couplage dipolaire (interaction dipôle-dipôle) entre deux spins spatialement proches. Cette interaction est due aux phénomènes de relaxation croisée et est appelée effet Overhauser nucléaire nOe (nuclear Overhauser effect). L'effet nOe, estimé par la relation :

$$\sigma_{ij} = \frac{\gamma^4 \hbar^2}{10 r_{ij}^6} \left(\tau_{app} - \frac{6\tau_{app}}{1 + 4\omega^2\tau_{app}^2} \right)$$

où r_{ij} est la distance entre les deux protons i et j ; τ_{app} est le temps de corrélation et σ le terme de relaxation croisée inversement proportionnel à r_{ij}^6 . Ainsi l'effet devient nul lorsque la distance entre deux protons est supérieure à 6 Å (Figure 29). Un spectre NOESY montre donc une corrélation pour chaque couple de noyaux distants de moins de 6 Å.



Figure 29 : Effet nOe entre deux protons distants de moins de 6 Å.

L'attribution des noyaux de la protéine, réalisée grâce aux expériences tridimensionnelles hétéronucléaires décrites précédemment, va permettre l'exploitation des spectres ^1H - ^{15}N et ^1H - ^{13}C NOESY-HSQC (Tableau 1) en distinguant les corrélations nOe soit au sein d'un même résidu, soit avec les noyaux d'un autre acide aminé du squelette peptidique (Clare *et al.*, 1991). La mesure de l'intensité de ces corrélations nOe permet, à partir d'un effet nOe de référence (pour une distance correspondante connue, comme celle entre les deux protons H_β d'un même résidu), de déterminer la distance entre les noyaux à l'origine de la corrélation. En pratique, on estime les distances en les classant en trois catégories de contraintes (pour négliger les erreurs intervenant lors de la mesure) : effet nOe fort ($1,5 < r < 3,5$ Å), effet moyen ($3,5 < r < 4,5$ Å) et effet faible ($4,5 < r < 6$ Å). Les contraintes intrarésiduelles sont reliées aux angles rotationnels φ , χ_1 , χ_2 ... d'un résidu et permettent de décrire la conformation du résidu (si tant est qu'il adopte une conformation privilégiée). Les contraintes dites séquentielles (entre résidus distants de moins de 4 résidus dans la séquence peptidique) permettent de décrire les éléments de structures secondaires tels que les hélices α , les brins β et les coudes. Enfin, les contraintes dites à longues distances (entre résidus éloignés dans la séquence peptidique mais spatialement proches) permettent d'orienter les éléments de structures secondaires les uns par rapport aux autres. Plus le jeu de contraintes sera important, meilleure sera la qualité de la structure tridimensionnelle déterminée.

II.2.2. Les contraintes angulaires

Dans le cas des peptides, la mesure de certaines constantes de couplage (telles que $^3J_{\text{HN},\text{H}\alpha}$ ou $^3J_{\text{H}\alpha,\text{H}\beta}$), permet, à partir des courbes de Karplus (Karplus, 1959 ; Cung *et al.*, 1974 ; Cung *et al.*, 1982), de déterminer les angles dièdres φ et χ_1 d'un résidu donné. En pratique, ces mesures s'effectuent simplement à partir du spectre ^1H à une dimension ou, avec moins de précision, à partir de spectres COSY phasés à double quantum (Marion *et al.*, 1983). L'accès aux angles dièdres est particulièrement efficace pour identifier les éléments de structures secondaires. Ils peuvent aussi être pris en compte lors des calculs de modélisation moléculaire.

Dans le cas des protéines, la mesure des constantes de couplage est compromise par le manque de résolution des spectres. Cependant, la fréquence de résonance des noyaux d'un résidu est dépendante de la conformation locale de ce résidu (Wishart et Sykes, 1994b). Il est donc possible de déterminer cette dernière en comparant le déplacement chimique de ses noyaux avec les valeurs standards mesurées dans des pelotes statistiques (chaînes peptidiques considérées comme ne possédant aucune conformation particulière) (Wishart *et al.*, 1991). Deux méthodes consensuelles permettent ainsi d'estimer les éléments

de structures secondaires d'une protéine : (i) l'index de déplacement chimique (Chemical Shift Index : CSI – Figure 30 – Wishart et Sykes, 1994a) ; (ii) le déplacement chimique secondaire (Secondary Chemical Shift : SCS). Un logiciel nommé TALOS (Cornilescu *et al.*, 1999a), fonctionnant par homologie de séquence et de déplacement chimique secondaire, permet, à partir des déplacements chimiques des noyaux $^1\text{H}^{\text{N}}$, $^{15}\text{N}^{\text{H}}$, $^1\text{H}^{\alpha}$, $^{13}\text{C}^{\alpha}$ et $^{13}\text{C}^{\beta}$ d'un résidu, de prédire les angles dièdres ϕ et ψ de ce résidu. Si les dix prédictions faites par TALOS pour un résidu sont en bon accord entre elles, ces valeurs peuvent alors être utilisées comme contraintes dans les protocoles de modélisation moléculaire.

```

#
#
#####
# Program...:          CSI (c)
# Version...:          2.0
# Location...:         University of Alberta
#                   Protein Engineering Network of
#                   Centres of Excellence
# Input.....:         /d/people/quinte98/lib/csi/SAMPLE/csi.ndsbd
# Date.....:          Thu Oct  4 10:02:35 2007
#####
#
#
#   A      HA      CA      CO      CB      Consensus
#
1   H      0 C      0 C      0 C      0 C      0 C
2   A      0 C      0 C      0 C      0 C      0 C
3   L      0 C      0 C      0 C      1 C      0 C
4   D      1 B      0 C      0 C      1 C      0 C
5   A      1 B      1 C      1 C      0 C      0 C
6   N      1 B      0 C      1 C      0 C      0 C
7   D      1 B      0 C      -1 C      1 B      1 B
8   L      1 B      -1 C      1 C      1 B      1 B
9   L      1 B      -1 C      -1 C      1 B      1 B
10  P      0 C      0 C      0 C      0 C      0 C
11  P      -1 C     0 C      0 C      0 C      0 C
12  E      1 C      1 C      1 C      -1 C     0 C
13  K      1 C      0 C      0 C      1 C      0 C
14  A      -1 C     1 C      -1 B     -1 C     0 C
15  F      1 B      -1 C     -1 B     1 B      1 B
16  V      1 B      -1 C     -1 B     1 B      1 B
17  P      0 B      0 C      0 B      0 B      1 B
18  E      1 B      0 C      -1 B     1 B      1 B
19  L      1 B      -1 C     -1 B     1 B      1 B
20  A      1 B      0 C      -1 B     1 B      1 B
21  V      1 B      0 C      -1 B     1 B      1 B
22  A      1 B      -1 C     0 C      1 B      1 B
23  D      1 B      1 C      1 C      0 C      0 C
    
```

Figure 30 : Exemple d'un fichier de sortie généré par le logiciel CSI 2.0. Les paramètres d'entrée correspondent aux déplacements chimiques des noyaux H^{α} , C^{α} , C^{β} et C^{γ} . Le résultat est exprimé dans la colonne « Consensus » (la lettre B correspond à un brin β , la lettre H correspond à une hélice et la lettre C correspond à l'absence de structure secondaire).

II.2.3. Les contraintes orientationnelles

Ce type de contraintes devient de plus en plus utile à mesure que la taille de la protéine augmente. En effet, dans le cas de grosses protéines (de plus de 20 kDa), l'exploitation des spectres NOESY tridimensionnels devient laborieuse et la perte d'information structurale qui en résulte peut être compensée par d'autres données. Bien entendu, ces contraintes orientationnelles peuvent être mesurées sur des protéines de taille raisonnable pour la RMN de façon à affiner au mieux les résultats structuraux. Le principe des contraintes orientationnelles repose sur la mesure d'un vecteur dans un repère lié à la molécule. Ce vecteur peut être défini par deux spins ($^{15}\text{N}-^1\text{H}$ ou $^{13}\text{C}-^1\text{H}$), dans le cas de la mesure des couplages dipolaires résiduels ou des paramètres de relaxation.

La mesure des couplages dipolaires résiduels se fait en milieu « orienté » dans lequel l'absence d'isotropie engendrée par une solution tamponnée classique permet l'apparition d'une contribution

résiduelle renseignant sur l'orientation des vecteurs internucléaires par rapport au champ magnétique B_0 . Le plus souvent, ce sont des cristaux liquides ou des phages qui apportent l'anisotropie au milieu. La mesure des couplages dipolaires résiduels est aussi possible sur des systèmes paramagnétiques où la présence d'un métal (fixé, de façon naturelle ou par l'intermédiaire d'une sonde, à la protéine) engendre une orientation privilégiée de la molécule le long du champ magnétique (Tolman, 2001). Ainsi, si la protéine adopte une orientation privilégiée, on pourra définir une orientation particulière et non moyennée des vecteurs entre les noyaux ^{15}N et ^1H des groupements amides du squelette protéique. Ces mesures sont applicables à d'autres vecteurs tels que ceux définis par les noyaux C' et C^α ou C' et H^N . L'orientation relative de ces vecteurs les uns par rapport aux autres renseigne sur la structure globale de l'objet étudié.

Les centres paramagnétiques mentionnés ci-dessus apportent aussi d'autres informations sur la structure de la molécule en solution (Bernini *et al.*, 2008). Ils permettent, *via* une cartographie des déplacements chimiques perturbés par la présence d'un métal, de définir une contrainte de distance à longue portée (inversement proportionnel à r^3 , r étant la distance interprotonique) ainsi qu'une contrainte orientationnelle entre les noyaux perturbés et le centre paramagnétique. De plus ils sont responsables de l'interaction « Curie-dipolaire » qui se manifeste par un couplage permettant d'aboutir à une contrainte angulaire (Delepierre *et al.*, 1999).

Le tenseur de diffusion rotationnel définit la géométrie globale de la protéine (Ryabov *et al.*, 2007). Sa détermination se fait par des mesures de relaxation sur les vecteurs $^{15}\text{N} - ^1\text{H}$ des groupements amides du squelette de la protéine. Il peut se décomposer, dans un repère orthogonal, selon trois axes principaux de normes différentes. Une protéine globulaire aura globalement trois axes de longueur identique alors qu'une protéine de forme allongée présentera une contribution axiale plus importante que les deux autres.

II.2.4. La modélisation moléculaire

Les différents types de contraintes énumérées ci-dessus décrivent la structure tridimensionnelle en solution de l'objet étudié. Leur exploitation passe par la mise en œuvre de protocoles de modélisation moléculaire.

Le principe de toute méthode de modélisation moléculaire est d'estimer l'énergie potentielle (E_{pot}) d'une molécule. Ceci est rendu possible grâce à un champ de forces qui décrit E_{pot} à partir des coordonnées cartésiennes de ses atomes, en prenant en compte les différents termes énergétiques (appelés potentiels) dus aux interactions interatomiques libres ou liées (longueurs de liaison, interactions électrostatiques, etc.) :

$$E_{\text{pot}} = E_{\text{liaison}} + E_{\text{angle}} + E_{\text{dièdre}} + E_{\text{non-liée}}$$

Une fois l'énergie potentielle d'une conformation moléculaire choisie *a priori* et calculée grâce au champ de force, cette conformation peut être optimisée, en utilisant différents algorithmes de mécanique ou de dynamique moléculaire. Le but est d'aboutir à une structure spatiale possédant l'énergie potentielle la

plus faible. Les contraintes expérimentales sont introduites dans ces méthodes sous forme de potentiels expérimentaux rajoutés aux potentiels théoriques du champ de force :

$$E_{\text{exp}} = E_{\text{noe}} + E_{\text{dièdre}} + E_{\text{RDC}}$$

L'objectif d'un protocole de modélisation moléculaire sous contraintes expérimentales est d'obtenir une structure 3D (ou un ensemble de structures) présentant l'énergie potentielle minimale et le plus en accord avec les contraintes expérimentales. Un tel protocole met à profit le recuit simulé, un algorithme de dynamique moléculaire. Cet algorithme permet d'explorer tout l'espace conformationnel de la molécule étudiée et de déterminer le nombre minimum de conformations tridimensionnelles différentes possibles. Son principe est de permettre au système moléculaire de franchir les barrières énergétiques, qui s'opposent à un changement conformationnel majeur, en lui apportant une énergie cinétique importante sous la forme d'une montée en température. Cette méthode permet de générer un ensemble de structures tridimensionnelles en accord avec les contraintes expérimentales et représentatives des différentes conformations qui peuvent être adoptées par la molécule étudiée. La qualité du résultat obtenu se détermine selon trois critères : (i) le rmsd (Root Mean Square Difference), qui traduit la variabilité de la position des atomes dans l'ensemble des structures : on considère qu'un rmsd inférieur à 1 est requis pour qualifier une structure de haute résolution, bien que ce critère puisse être peu judicieux lorsqu'une protéine possède des zones de flexibilité importante ; (ii) la compatibilité avec le diagramme de Ramachandran mais en gardant à l'esprit que, dans le cas de boucles, des valeurs peuvent être violées ; (iii) les violations des contraintes est le dernier critère et peut-être le plus important. En effet, moins les violations de contraintes sont importantes, plus les structures sont en accord avec les données expérimentales et donc représentatives de la structure 3D réelle.

II.3. Les avancées technologiques

II.3.1. L'appareillage

La puissance du champ magnétique est un paramètre capital intervenant dans la qualité d'un spectre, puisque la résolution d'un spectre RMN augmente linéairement avec B_0 et la sensibilité augmente selon $B_0^{3/2}$ (en effet, la différence d'énergie entre les deux orientations possibles des moments magnétiques dans le champ est proportionnelle à B_0). La technologie des supra-conducteurs permet aujourd'hui la conception de spectromètres d'une puissance égale à 22,3 T (ce qui correspond à une fréquence protonique de 950 MHz) dépassant de 10 fois la puissance maximale des appareils des années 1960. L'augmentation de la puissance du champ magnétique favorise l'étude de protéines de grande taille.

Outre l'aimant, la sonde du spectromètre joue un rôle central dans la mise en œuvre d'une expérience RMN. Elle permet l'émission des impulsions radiofréquences ainsi que la détection du mouvement de précession du vecteur d'aimantation. La performance d'une sonde va donc avoir une influence majeure sur le bon déroulement de la séquence d'impulsions, en termes de durée optimale et de spécificité des impulsions, mais aussi sur la sensibilité de la mesure. Des avancées techniques

considérables ont donc été accomplies dans ce domaine. On trouve, en effet, des sondes possédant des bobines, d'une part, spécifiques du carbone ^{13}C et/ou de l'azote ^{15}N , plutôt que des bobines à large bande moins performantes ; et d'autre part, douées d'une sensibilité et de performances sans cesse accrues. L'innovation la plus spectaculaire dans ce domaine est la cryosonde dont le principe est de refroidir l'électronique de la sonde (les bobines d'excitation/mesure mais aussi les pré-amplis) grâce à de l'hélium gazeux froid (à 20 K). Ceci a pour conséquence une diminution significative du bruit électronique. Ces sondes possèdent ainsi une sensibilité deux à trois fois plus importante que celle des sondes classiques (dites chaudes), ce qui rend possible l'étude de protéines à de faibles concentrations (de l'ordre de 100 μM).

II.3.2. Le marquage des protéines

La condition d'observation d'un signal RMN est une valeur non-nulle du spin du noyau à observer (comme pour le proton, par exemple). Jusqu'à présent, nous avons discuté d'expériences impliquant les noyaux ^{13}C et ^{15}N . Toutefois, la faible abondance naturelle de ces isotopes rend obligatoire le marquage des protéines pour maintenir des durées d'acquisition raisonnables. Les techniques de surexpression des protéines en milieu enrichi en sources carbonées et azotées, elles-mêmes marquées, permettent d'obtenir des échantillons uniformément marqués $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ et suffisamment concentrés pour être étudiés. Une approche différente consiste à effectuer un marquage partiel de la protéine en utilisant des sources azotées et carbonées non marquées avec un acide aminé (ou une combinaison d'acides aminés) marqué. Il en résulte une simplification des spectres sur lesquels ne vont apparaître que les résidus choisis. Ce choix peut être judicieux dans le cas de grosses protéines où le taux de recouvrement des corrélations internucléaires est important. En choisissant par exemple d'incorporer des valines marquées ^{13}C sur leurs chaînes latérales, on clarifie la zone des groupements méthyles où l'on observe fréquemment une superposition des signaux provenant de tous les résidus aliphatiques (valine mais aussi alanine, leucine, isoleucine). Cette stratégie est aussi applicable pour les groupements NH du squelette peptidique (Figure 31).

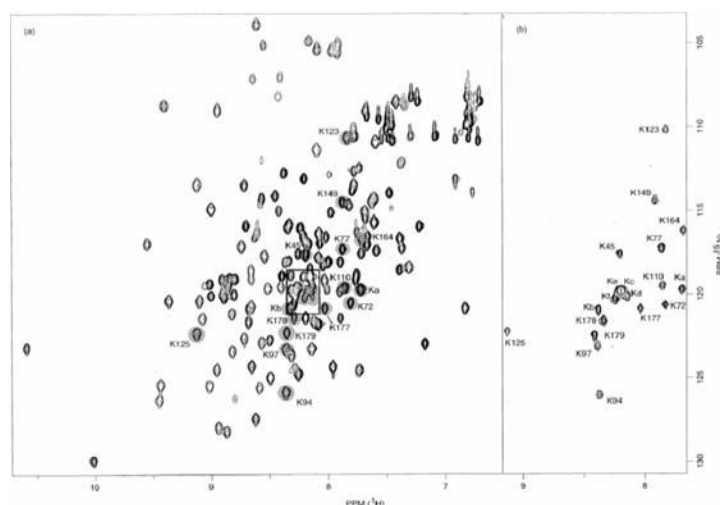


Figure 31 : Spectres HSQC ^1H - ^{15}N d'une protéine uniformément marquée ^{15}N (à droite) et d'une protéine incorporant des lysines marquées ^{15}N (à gauche). Le spectre de droite est simplifié et permet de distinguer correctement chaque résidu lysine

Dans certains cas, un triple marquage incluant le deutérium (^2H ou D) peut s'avérer nécessaire. La deutération consiste à remplacer l'ensemble (ou une partie) des protons d'une molécule par des deutériums dont le nombre de spin est égal à 1. Cette technique d'enrichissement isotopique n'apporte pas de noyaux supplémentaires à détecter mais permet de limiter les interactions dipolaires et contribue donc à diminuer la vitesse de relaxation transversale. Cela se traduit par des raies de résonance moins larges (Grzesiek *et al.*, 1993). En effet, en raison du rapport gyromagnétique du noyau deutérium plus faible que celui du proton, les interactions dipolaires entre les spins des noyaux ^2H et ceux des autres noyaux ^{13}C ou ^{15}N sont considérablement diminuées. On observe, de plus, une diminution de la diffusion de spin, ces deux facteurs contribuant à une amélioration de la qualité des spectres. Cette technique est généralement mise à profit pour l'étude de protéines de grandes tailles (supérieures à 20 kDa). On procède à un enrichissement isotopique grâce à une production bactérienne dans D_2O au lieu de H_2O , puis on réalise un échange des deutériums des liaisons peptidiques par des protons en solubilisant, dans H_2O , un échantillon deutéré préalablement lyophilisé. Un tel échantillon, dont les protons non labiles sont totalement deutérés, permet d'effectuer la plupart des expériences tridimensionnelles hétéronucléaires (un grand nombre de ces expériences ayant été adaptées aux échantillons deutérés par implantation d'impulsions de découplage deutérium) avec un gain de sensibilité et de résolution appréciable, mais ne permet pas d'aboutir à une structure tridimensionnelle, cette dernière nécessitant la collecte d'un grand nombre d'effets $n\text{Oe } ^1\text{H}-^1\text{H}$. Un bon compromis à la perdeutération (deutération totale) est la deutération à 50 – 75 % qui permet de compenser la perte de sensibilité due à la diminution du nombre de protons (LeMaster, 1988), la collecte d'effets $n\text{Oe}$ restant limitée.

II.3.3. Les outils d'analyse des données RMN

L'intérêt croissant que porte la communauté scientifique à la RMN a favorisé le développement d'outils dédiés à l'analyse des données recueillies. Des logiciels sous licence ou libres de droit sont de nos jours simples d'accès sur le réseau internet. De plus, les puissances de calcul offertes par les ordinateurs actuels permettent, à partir de systèmes d'exploitations sophistiqués et gratuits (comme Linux, Mandriva, Centos, ou Ubuntu), de travailler rapidement et à moindre coût, sonnant ainsi le glas des vieilles stations dédiées au calcul. Le champ de développement de ces outils informatiques est très vaste et s'étend du traitement des interférogrammes à, par exemple, la résolution de structure *ab initio* ou à la modélisation de complexes protéine-protéine.

La tendance actuelle est à l'automatisation de la démarche de façon à aboutir à une structure RMN de qualité avec une intervention humaine minimale. De nouveaux logiciels cherchent à regrouper les grands blocs qui définissent la démarche RMN en une seule étape sûre et robuste. Durant mes trois années de thèse, j'ai pu suivre l'évolution de logiciels facilitant mon travail et rendus de plus en plus conviviaux (notamment grâce à l'utilisation d'interfaces graphiques). De plus, de nombreux tutoriaux sont dispensés à travers le monde et permettent aux utilisateurs et aux concepteurs de se rencontrer. Cette partie a pour but de mentionner, et de façon non-exhaustive, quelques-uns des nombreux programmes utilisés par les spectroscopistes RMN.

II.3.3.1. Le traitement des données spectrales brutes

Le traitement des données brutes à la sortie du spectromètre est une étape importante puisqu'elle influe sur la lisibilité du spectre à analyser. Outre la transformée de Fourier (appliquée à chacune des dimensions d'acquisition), les logiciels de travail tel que Xwinnmr, Topspin, Felix (sous licence payante) ou NMRPipe (Delaglio *et al.*, 1995, licence académique gratuite) permettent d'appliquer des corrections mathématiques multiparamétriques aux interférogrammes. Il en résulte une correction de la phase, une meilleure élimination des pics du solvant (l'eau, la plupart du temps), un affinement des raies, une amélioration du rapport signal sur bruit, etc ...

II.3.3.2. L'analyse spectrale

Les spectres doivent ensuite être exploités avec un logiciel spécifique au travail d'attribution. De nombreux programmes existent et le choix de l'un ou l'autre est laissé libre à l'utilisateur. Ainsi, et pour n'en citer que quelques-uns, les logiciels gratuits CARA (Keller, 2004), NMRviewJ (Johnson, 2004) ou Sparky3 (Goddard et Kneller, 2004) sont capables d'importer des spectres déconvolués par la transformée de Fourier. Commence alors le travail dit de « peak picking » ou de « pointage » des corrélations sur le spectre. Cette étape, d'abord fastidieuse, a été simplifiée par l'implantation de modules de « peak picking » automatique chargés de repérer et de marquer les maxima locaux sur les spectres (Autolink – Masse et Keller, 2005). Toutefois, il leur est souvent difficile de résoudre les superpositions de corrélations et la position précise d'un maximum reste dépendante du traitement mathématique appliqué à l'interférogramme. En effet, si ce dernier est correctement lissé, il en résulte un pic en forme de cloche. Par contre, l'absence de traitement particulier peut écrêter le sommet du pic et générer un décalage dans la position du maximum, voire la détection apparente de deux maxima (Figure 32).

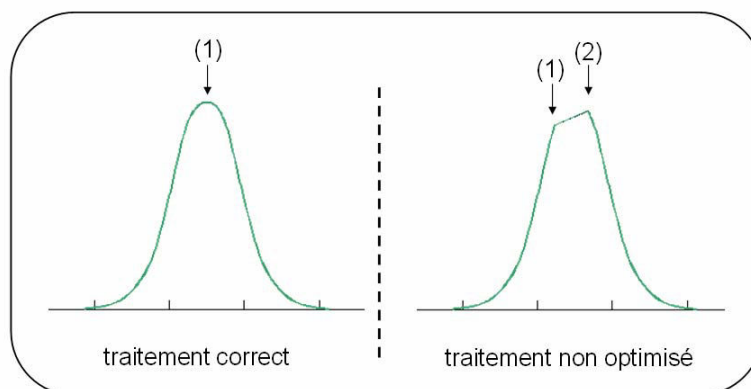


Figure 32 : Détection automatique de deux maxima sur un pic « écrêté ». Le pic de gauche ne laisse pas d'ambiguïté quant à la position de son maximum ; le pic de droite va le plus souvent générer la détection de deux maxima lors de son analyse automatique ou d'un maximum décalé.

Il demeure aussi un problème de format des fichiers décrivant la position des pics sur le spectre. En effet, à chaque logiciel d'attribution correspond souvent une syntaxe particulière. L'absence de

nomenclature commune rend difficile le passage d'un programme à un autre. Cela complique l'utilisation combinée des logiciels (par exemple, le module de traitement des données de relaxation par NMRviewJ n'est pas capable de prendre en charge les fichiers de peak picking générés par CARA). Dans ce sens, des équipes ont développé des programmes dédiés à la conversion des formats de fichiers, comme par exemple CCPN converter. Le projet CCPN cherche d'ailleurs à rendre consensuel le formatage des données RMN auprès de la communauté des spectroscopistes (Fogh *et al.*, 2002).

Il est à noter que les logiciels d'attribution actuels sont multitâches et permettent aussi, par exemple, de déterminer la valeur de l'intensité d'un pic. Cette possibilité est un plus pour l'exploitation des spectres NOESY puisque l'intensité des corrélations nOe est inversement proportionnelle à la racine sixième de la distance qui sépare deux protons. Le rangement classique, et auparavant visuel, des intensités des corrélations en trois classes (forte, moyenne et faible) peut être remplacé par des valeurs plus fines, augmentant ainsi la précision du jeu de contraintes de distance. Il faut toutefois prendre garde à la méthode d'intégration utilisée par les différents logiciels. Leur divergence peut conduire à des résultats différents (à titre personnel, je conseillerais, pour ce type d'analyse, l'utilisation de NMRviewJ qui laisse la méthode d'intégration au choix de l'utilisateur).

II.3.3.3. La détermination des contraintes angulaires et orientationnelles

La définition du jeu de contraintes angulaires peut, elle aussi, être soumise à des variations selon le programme utilisé. Ainsi la méthode CSI et le programme TALOS (mentionnés précédemment) peuvent conduire à quelques différences dans la prédiction des structures secondaires et donc dans les valeurs d'angles dièdres adoptés par les résidus dans la protéine. Toutefois, il suffit de travailler sur le résultat consensuel fourni par les deux logiciels pour atténuer ces différences.

Les contraintes orientationnelles par rapport à un tenseur de diffusion rotationnelle sont obtenues par des programmes de traitement des données de relaxation. Cette méthode passe par l'évaluation des vitesses de relaxation longitudinale (T_1) et transversale (T_2) des vecteurs constitués par les noyaux ^{15}N et ^1H des groupements amide du squelette peptidique. La qualité de cette estimation est fonction d'une part, de l'équation de lissage des données expérimentales, et d'autre part, de l'estimation de l'erreur expérimentale. Il existe plusieurs modèles pour la détermination de T_1 et T_2 . Ils sont généralement basés sur une fonction exponentielle décroissante pouvant inclure un facteur correctif. Le logiciel NMRviewJ permet d'extraire à partir des données spectrales, les valeurs de T_1 et T_2 pour chaque résidu avec un taux d'erreur calculé automatiquement ou fixé par l'utilisateur. Les composantes principales et les orientations des axes principaux du tenseur de diffusion, calculées par le logiciel TENSOR2 à partir des couples T_1/T_2 , sont grandement influencées par le taux d'erreur sur le calcul de T_1 et T_2 . Il convient alors, pour une bonne estimation du tenseur, de ne pas dépasser un taux d'erreur moyen, calculé sur l'ensemble des couples T_1/T_2 , de 5%. D'autres programmes disponibles gratuitement permettent d'obtenir ces données comme par exemple DYNAMICS, RELAXFIT et ROTDIF (Walker *et al.*, 2004 ; Fushman *et al.*, 1997), développés en langage MATLAB (sous licence payante). De plus, il existe des logiciels, tels que HydroNMR, qui

permettent, à partir d'une structure connue, d'estimer la valeur et l'orientation théoriques des tenseurs de diffusion (Garcia de la Torre *et al.*, 2000).

II.3.3.4. Le calcul des structures issues des traitements RMN

Les différents jeux de contraintes sont pris en charge par les logiciels de modélisation moléculaire. Il en existe plusieurs et parmi les plus familiers, on trouve DYANA/CYANA (Guntert *et al.*, 2004), AMBER (Case *et al.*, 2005) (tous deux sous licences payantes), CNS (Brunger *et al.*, 2007) et X-PLOR (Badger *et al.*, 1999) (disponibles gratuitement). Ces programmes se distinguent par les champs de force utilisés et par leur temps de calcul. A titre personnel, j'ai préféré utiliser CYANA en raison de sa vitesse d'exécution sur un système linux classique et de la simplicité de syntaxe des fichiers de contraintes. Toutefois, l'étape d'affinement des structures dans l'eau, incluse dans CNS et X-PLOR, peut être d'un intérêt particulier.

II.3.3.5. La validation de structure

Il existe pourtant de nombreux outils permettant de vérifier la qualité des structures générées par les logiciels de modélisation moléculaire. Pour n'en citer que quelques uns, on trouve PROCHECK-NMR (Laskowski *et al.*, 1996), ProSA (Widerstein *et al.*, 2007), WHAT IF (Vriend *et al.*, 1990) ou HARMONY (Pugalethi *et al.*, 2006). Ces logiciels vont vérifier par exemple le nombre de contraintes violées ou la position des angles dièdres sur le diagramme de Ramachandran. Ils attribuent un score final attestant de la qualité de la structure. Par exemple, la valeur du « G-score » de PROCHECK-NMR est un indice qui fournit une mesure de la conformité des propriétés stéréochimiques d'un résidu. L'évaluation de la qualité des structures RMN est cependant une pratique qui semble manquer encore de fiabilité. Des tests sur les logiciels cités ci-dessus ont montré des divergences importantes dans les résultats finaux.

II.3.3.6. L'automatisation de la démarche RMN

II.3.3.6.1. Automatisation de l'attribution des résonances

Les logiciels d'attribution automatique du squelette peptidique sont désormais nombreux et puissants. On trouve par exemple AutoAssign (Zimmerman *et al.*, 1997), CAMRA (Gronwald *et al.*, 1998) ou GARANT (Bartels *et al.*, 1996) et certains sont implantés dans les logiciels d'analyse spectrale (comme Autolink sous CARA ou Autoassign sous Sparky). Pour plus de fiabilité dans les résultats, il convient d'utiliser un jeu de plusieurs spectres même si, selon le logiciel, un minimum de 3 spectres peut convenir (Autolink peut théoriquement fonctionner avec un spectre HNCA, un spectre NOESY-HSQC et un spectre HSQC). La plupart intègre, pour plus d'efficacité, les statistiques des déplacements chimiques particulières à chaque résidu. Cependant il convient toujours de vérifier visuellement les résultats. L'attribution automatique des chaînes latérales semble plus difficile malgré quelques résultats probants obtenus par l'utilisation conjointe de GARANT et AUTOPSY (Koradi *et al.*, 1998). Cela est lié au nombre d'expériences plutôt restreint dont dispose le spectroscopiste pour l'attribution spécifique des chaînes latérales. De plus la

perte d'information inhérente à l'expérience HCCH-TOCSY complique la tâche. Une solution consiste à travailler avec plusieurs spectres HCCH-TOCSY enregistrés avec des temps de mélange différents.

La qualité de la table d'attribution est essentielle pour l'exploitation ultérieure des spectres NOESY. Elle peut être évaluée grâce aux statistiques de déplacements chimiques disponibles gratuitement sur le site internet de la Biological Magnetic Resonance Data Bank.

II.3.3.6.2. Automatisation du calcul des structures RMN et calcul *ab initio*

Il existe plusieurs logiciels pour l'attribution automatique des spectres NOESY, comme par exemple, NOAH/DIAMOD (Xu *et al.*, 1999), ARIA (Linge *et al.*, 2003), AutoStructure (Huang *et al.*, 2005) ou ATNOS/CANDID (Herrman *et al.*, 2002) (tous gratuits). Ces programmes sont couplés à des programmes de modélisation moléculaire, comme CYANA, X-PLOR ou CNS, et peuvent utiliser une démarche itérative qui consiste à éliminer progressivement les corrélations nOe violées. Il convient, là aussi, de multiplier le nombre de spectres NOESY bi- ou tridimensionnel pour de meilleurs résultats. Pour ma part, j'ai pu utiliser ARIA et ATNOS/CANDID, avec une préférence pour ce dernier. Avec un traitement correct des spectres (bonne élimination de la contribution du solvant, des artefacts et après affinement correct des raies), des résultats de bonne qualité sont obtenus avec un temps de calcul de quelques heures.

Tous ces logiciels sont encore activement développés par plusieurs laboratoires. A titre d'exemple, les algorithmes MATCH et ASCAN (Fiorito *et al.*, 2008) seront prochainement implantés dans ATNOS/CANDID. Cela permettra l'automatisation des étapes d'attribution du squelette, des chaînes latérales et des corrélations NOE, et à laquelle sera couplé un calcul itératif de la structure. Seul le processus d'acquisition et de traitement des données brutes devrait être à la charge de l'utilisateur.

Une nouvelle approche se développe actuellement et concerne la détermination *ab initio* des structures de protéines. Le principe de base est simple et réside dans le fait que la structure tertiaire d'une protéine est déterminée par sa séquence en acides aminés. Des logiciels, tels que ROSETTA (Simons *et al.*, 1999) ou HOMA (Bhattacharya *et al.*, 2008), se chargent de lire et de segmenter en fragments de petites tailles la séquence de la protéine. Le programme recherche ensuite, grâce aux bases de données structurales, la structure la plus probable pour ces fragments de quelques résidus. La structure finale consiste schématiquement en un assemblage de ces fragments. ROSETTA est capable de prendre en compte des jeux de contraintes déterminées par RMN.

II.4. Etude d'un complexe protéine-protéine

Comme nous venons de le constater, la résolution tridimensionnelle d'une structure, quelle que soit la méthode utilisée (RX ou RMN), tend à devenir une démarche « presse-bouton » (Des techniques permettant l'obtention de structure RMN sans passer par les étapes d'attribution classiques décrites précédemment sont maintenant en cours de développement - Atkinson *et al.*, 2002). De nombreuses

structures de protéines sont publiées chaque année. Cependant, c'est l'étude des mécanismes d'interactions des protéines entre elles et leurs conséquences qui vont représenter de vrais enjeux biologiques. L'approche dite par « Docking » (ou arrimage) est en pleine voie d'expansion actuellement. L'obtention de modèles d'interaction entre deux protéines va donc devenir nécessaire. Les modèles obtenus seront d'autant meilleurs s'ils sont corrélés à des données expérimentales. Il existe plusieurs moyens de « cartographier » les surfaces d'interaction entre les deux partenaires.

II.4.1. Cartographie basée sur la perturbation des déplacements chimiques

C'est la technique la plus utilisée pour cartographier, *i.e.* identifier les constituants de l'interface résultant de l'interaction entre une protéine et son ligand. Le récepteur est totalement marqué ^{15}N et le ligand, non marqué, est utilisé pour les titrations. Les perturbations des déplacements chimiques du récepteur sont visualisées en suivant les différents spectres HSQC ^1H - ^{15}N effectués à diverses concentrations du ligand. Les déplacements chimiques des noyaux ^1H et ^{15}N du récepteur sont très sensibles à leur environnement chimique local. De faibles changements au niveau de l'environnement immédiat de ces atomes lors de la titration par le ligand peuvent être détectés et utilisés pour identifier la surface de contact avec la protéine (Nietlispach *et al.*, 2004). Les atomes des résidus qui ne participent pas à l'interaction ne verront pas leurs déplacements chimiques perturbés (sauf dans le cas où la fixation du ligand entraîne des réarrangements conformationnels additionnels hors du site de fixation). Remarquons à ce stade que, grâce à la grande sensibilité de l'expérience HSQC ^1H - ^{15}N , les mesures peuvent être entreprises à des concentrations de l'ordre du micromolaire pour le récepteur. Cela peut s'avérer pratique dans le cas d'études de relation structure-activité pour lesquelles l'obtention d'une concentration importante en protéine est difficile à obtenir (Shuker *et al.*, 1996).

Une réattribution est nécessaire pour estimer la différence entre les déplacements chimiques des formes libre et complexée. La cartographie issue de la perturbation des déplacements chimiques permet de visualiser la zone d'interaction mais ne permet pas de caractériser les interactions au niveau atomique (Zuiderweg *et al.*, 2002).

II.4.2. Transfert d'aimantation

L'interface entre deux partenaires peut être caractérisée en utilisant la méthode de transfert d'aimantation. Suivant le même procédé que le transfert nOe, on irradie les protons d'un ligand non marqué de telle façon que l'aimantation soit alors transférée vers certains noyaux de la protéine marquée (^{15}N par exemple) se trouvant au niveau du site d'interaction (Figure 33). Cette étude peut être réalisée, par exemple, au moyen d'une expérience HSQC ^1H - ^{15}N .

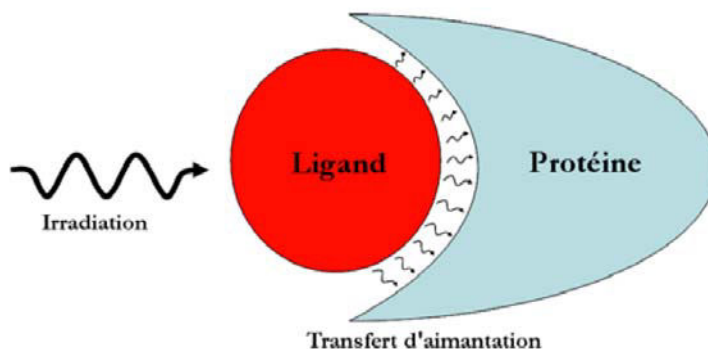


Figure 33 : Représentation schématique de la méthode de transfert d'aimantation

Le résidu appartenant au récepteur et dont la corrélation $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ varie en intensité, devrait se situer très près de l'interface (Nakanishi *et al.*, 2002). L'expérience est répétée plusieurs fois en faisant varier l'intensité de saturation *via* la durée d'irradiation. Elle nécessite au minimum que (i) l'un des deux partenaires soit enrichi ^{15}N et (ii) l'autre possède des protons proches de l'interface dont les fréquences propres ne se superposent pas avec celles des protons de son partenaire. Un moyen alternatif est de deutérer le partenaire recevant le transfert d'aimantation, ce qui permet d'irradier l'autre partenaire sur tout l'intervalle de fréquences des protons aliphatiques. La deutération permet également de diminuer la diffusion de spins et d'augmenter ainsi la sensibilité. L'attribution des noyaux ^{15}N et H^{N} de la protéine marquée doit également être connue ainsi que sa structure tridimensionnelle. Cette méthode est plus précise pour la caractérisation du site actif que la cartographie basée sur le changement observé des déplacements chimiques des noyaux perturbés car le transfert d'aimantation ne tient pas compte des fluctuations conformationnelles probables liées à la fixation du ligand à son récepteur.

II.4.3. Echange de protons amidiques

Une autre technique mise en œuvre est celle utilisant le phénomène d'échange des protons amidiques par le deutérium provenant du solvant D_2O (Englander *et al.*, 1997). L'échange des protons amidiques par des deutérons s'effectue à des vitesses différentes (de la minute à plusieurs mois), et en particulier, suivant leur accessibilité au solvant. Dans le cas des études d'interaction, on peut supposer que les protons amidiques présents à l'interface seront moins accessibles au solvant. Plusieurs expériences HSQC $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ à des temps chronologiquement différents permettent de connaître les protons amidiques qui s'échangent le plus lentement et donc qui sont susceptibles d'être en interaction avec le ligand. Afin de ne prendre en compte que les H^{N} à l'interface, et ainsi exclure les H^{N} enfouis au cœur de la protéine, l'expérience est également effectuée en absence du ligand. Dans le cas de ces expériences, il est préférable que le ligand soit une autre macromolécule (protéine, ADN ou ARN) et que le complexe soit très stable. Le cas le plus simple est l'interaction anticorps-antigène. Par cette méthode, les épitopes de la protéine Der p 2 d'acariens ont pu être identifiés par des mesures d'échange protonique en présence et absence d'un anticorps monoclonal (Mueller *et al.*, 2001). Par contre, certaines expériences montrent qu'une grande partie de la protéine voit son accessibilité au solvant modifiée lors de la fixation d'un ligand (Engen *et al.*, 1997). C'est principalement le cas lorsqu'il y a un réarrangement conformationnel dû à la

fixation du ligand. Dans certains cas, il est également possible que les conditions d'accessibilité au solvant ne se situent pas seulement au niveau de l'interface (Arumugam *et al.*, 1998).

II.4.4. Les expériences de Noesy filtrées

L'obtention d'informations non ambiguës sur les interactions nécessite l'utilisation de l'effet nOe. La mesure des distances interprotoniques intermoléculaires permet d'obtenir avec précision la structure du complexe au niveau de l'interface. En pratique, la difficulté réside dans la distinction entre les deux types de nOe observés : les nOe intramoléculaires et intermoléculaires. Ainsi, pour l'étude des interactions entre une protéine et un substrat, il est nécessaire de supprimer tous les signaux appartenant à la protéine afin d'attribuer les corrélations propres au ligand. Pour remédier à tous ces problèmes, l'utilisation des expériences de NOESY éditée (Fesik *et al.*, 1988) et NOESY filtrée (Otting *et al.*, 1990) permet de séparer (sans ambiguïté) les nOe intramoléculaires des nOe intermoléculaires dans le complexe.

Ces expériences sont particulièrement utiles lors de l'étude de deux macromolécules. Pour cela, les deux partenaires ne doivent pas avoir le même marquage isotopique. Par exemple, un des partenaires n'est pas marqué (^{14}N et ^{12}C) alors que l'autre est marqué avec au moins un isotope (^{15}N et/ou ^{13}C) (Figure 34). Il est également possible d'utiliser un isotope pour le premier partenaire (^{15}N) différent de celui du deuxième partenaire (^{13}C).

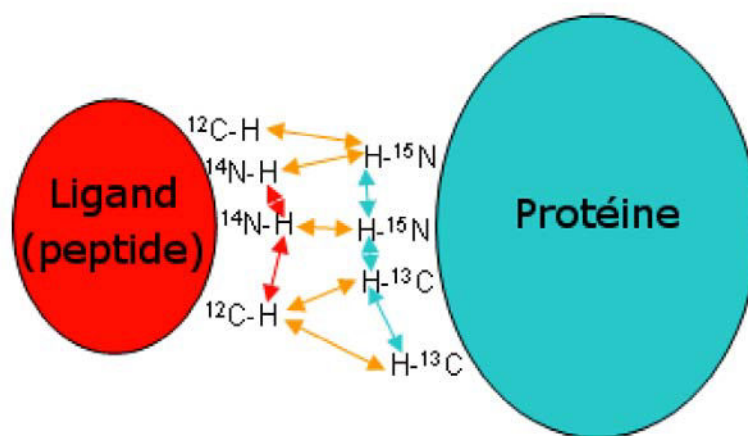


Figure 34 : Représentation schématique des corrélations intramoléculaires (rouge et bleu) et intermoléculaires (orange) pouvant être discriminées par l'utilisation des expériences NOESY éditée/filtrée.

L'interprétation des données est identique à celle issue d'un spectre NOESY habituel où l'intensité des pics est inversement proportionnelle à la puissance 6^{ème} de la distance r entre les deux protons (r^{-6}). Cette méthode est seulement applicable dans le cas d'une forte interaction entre les deux partenaires et permet de définir un jeu de contraintes de distances intermoléculaires non-ambiguës. Elle a été largement utilisée pour les études d'interaction entre des protéines marquées et une séquence d'acides nucléiques, comme c'est le cas entre le répresseur protéique *lac* et l'opérateur ADN *lac* (Spronk *et al.*, 1999), mais également pour résoudre des complexes protéine-protéine (Zwahlen *et al.*, 1997).

II.4.5. Autres méthodes

La mesure des couplages dipolaires résiduels (RDC) (Clare *et al.*, 2000) ou l'utilisation de sondes paramagnétiques (Wang *et al.*, 1998) permettent de définir une orientation globale d'un domaine par rapport à l'autre dans le cas d'un complexe protéine-protéine.

II.4.6. Les logiciels

Certains logiciels de docking sont capables d'utiliser les contraintes apportées par les spectres RMN, limitant ainsi le champ des possibilités d'interaction entre les deux macromolécules. Par exemple, les variations de déplacements chimiques observées à partir d'une expérience HSQC ^1H - ^{15}N peuvent être utilisées pour générer des contraintes intermoléculaires ambiguës (*i.e.* n'impliquant pas des noyaux précis de deux résidus mais l'ensemble des noyaux de ces résidus). Dans le cas du logiciel HADDOCK2.0 (de Vries *et al.*, 2007), les données RMN peuvent être incluses pour prédire la structure d'un complexe entre 2 (jusqu'à 6) partenaires (Figure 35). Pour chaque interface choisie aléatoirement entre les molécules, une minimisation de l'énergie, en conservant la structure des protéines rigide, est calculée ; ensuite, un recuit simulé est effectué pour autoriser le mouvement du squelette et des chaînes latérales et optimiser l'interaction. Afin d'explorer toutes les possibilités d'interaction, le calcul est répété de nombreuses fois en modifiant la position des deux macromolécules l'une envers l'autre. Une analyse par lot est ensuite nécessaire pour prédire le meilleur modèle d'interaction. Le point fort du logiciel HADDOCK provient de l'analyse statistique des résultats obtenus. Une approche similaire, incluant en plus des valeurs de RDC et/ou de paramètres de relaxation, permet d'injecter des informations sur l'orientation relative des deux protéines. Dans tous les cas, les contraintes de distance nOe non-ambiguës peuvent être ajoutées afin de diminuer le nombre de faux positifs et conduire à une meilleure résolution finale.

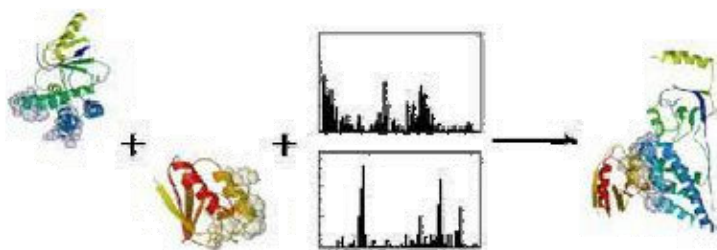


Figure 35 : Représentation schématique du fonctionnement de Haddock2.0. Deux structures servent de base à la modélisation d'un complexe en s'appuyant sur des données expérimentales telles que les variations des déplacements chimiques des groupements ^1H - ^{15}N induites par la formation de ce complexe.

Il existe d'autres logiciels de docking comme MOLFIT (Berchanski *et al.*, 2007) ou AUTODOCK (Osterberg *et al.*, 2002), mais aussi la possibilité d'utiliser de nombreux serveurs internet pour estimer un modèle de complexe. On citera par exemple GRAMM-X (qui permet de définir les résidus à l'interface : Tovchigrechko *et al.*, 2006) ou ClusPro (Comeau *et al.*, 2005).

III. Détermination de la dynamique des protéines par RMN

Les protéines, comme tous les édifices macromoléculaires en solution, sont animées de mouvements. Ces derniers couvrent une large gamme de fréquences et d'amplitudes, des plus rapides (vibrations des liaisons et oscillations angulaires de l'ordre de la picoseconde) aux plus lents (échange conformationnel ou chimique de l'ordre de la seconde à l'heure). La dynamique de ces biomolécules est souvent associée à leur activité (Figure 36). En effet, dans le cas des protéines, les éléments de structures secondaires sont rigides alors que les boucles, qui composent généralement le site actif ou les zones impliquées dans l'activité, présentent des mouvements pouvant générer l'adaptabilité conformationnelle nécessaire à la reconnaissance et à l'interaction avec le substrat ou un partenaire. Mesurer et comprendre la dynamique d'une protéine permet de mieux aborder sa logique fonctionnelle et ses propriétés de reconnaissance ou d'interaction.

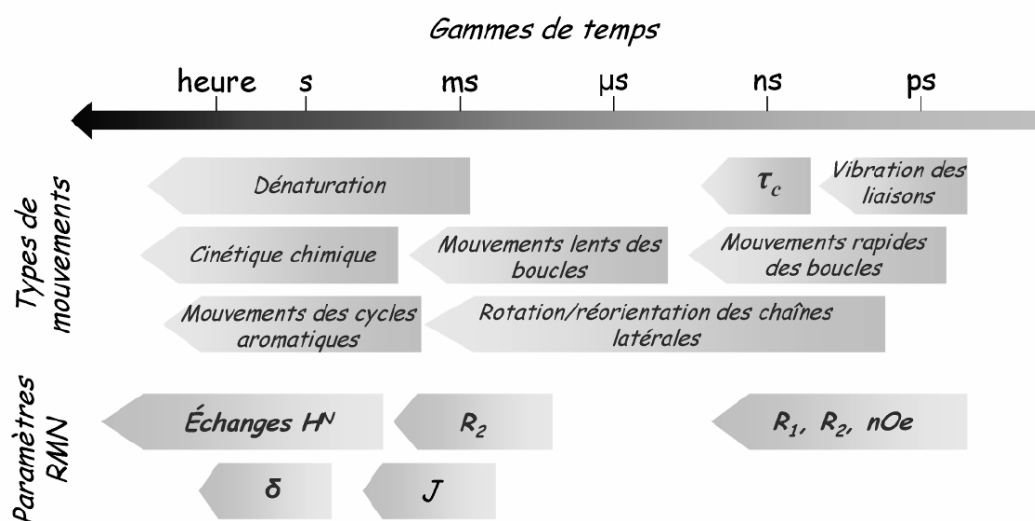


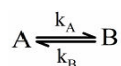
Figure 36 : Gamme de temps des mouvements et des phénomènes dynamiques pour les biomolécules. Sont aussi indiqués les paramètres RMN les caractérisant.

La RMN est un outil particulièrement efficace pour l'étude des phénomènes dynamiques puisqu'elle permet la mesure des paramètres sensibles aux différents types de mouvements moléculaires. L'observation des phénomènes les plus rapides nécessite la mesure des vitesses de relaxation (R_1 et R_2) alors que les phénomènes les plus lents sont visibles directement sur le spectre RMN, en particulier dans le cas des échanges lents.

III.1. Phénomène d'échange

Qu'il s'agisse d'échanges chimique ou conformationnel, ces phénomènes peuvent être particulièrement lents puisqu'ils ont lieu sur une gamme de temps allant de la milliseconde à la seconde, voire l'heure (Wang *et al.*, 2003). Dans le cadre de la RMN, ces phénomènes d'échange peuvent être aisément formalisés. En effet, pour une situation où un noyau s'échange entre deux environnements

chimiques distincts (états) A et B, correspondant à deux fréquences de résonance du noyau : ν_A et ν_B et dont la différence de fréquence est $\Delta\nu$, l'échange est gouverné par les équations suivantes :



On peut définir le temps moyen de résidence dans chaque état τ_A et τ_B , avec :

$$k_A = \frac{1}{\tau_A} \text{ et } k_B = \frac{1}{\tau_B}$$

La vitesse d'échange k_{ex} est définie par :

$$k_{ex} = k_A + k_B = \frac{1}{\tau_{ex}}$$

Les populations relatives P_A et P_B des états A et B sont alors définies par :

$$P_A = \frac{k_B}{k_{ex}} \text{ et } P_B = \frac{k_A}{k_{ex}}$$

Il existe ainsi plusieurs régimes d'échange suivant les valeurs de k_{ex} et de $\Delta\nu$ (Figure 37)

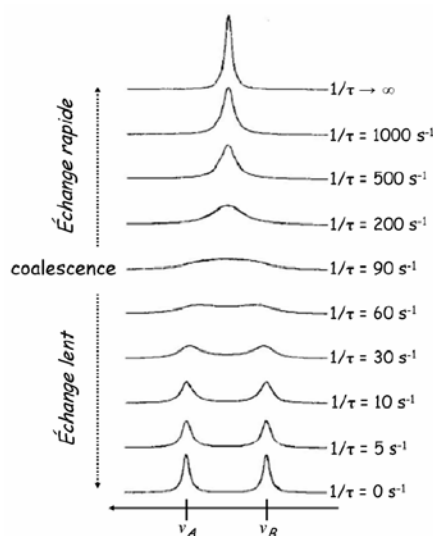


Figure 37 : Spectres 1D protoniques théoriques d'un phénomène d'échange entre deux états A et B en fonction de la vitesse d'échange k_{ex} , pour $P_A=P_B$ et $\Delta\nu=20\text{Hz}$, (d'après Canet et al., 2002).

L'échange lent se traduit par deux raies de résonance distinctes aux fréquences ν_A et ν_B . Il caractérise deux populations individuelles et quantifiables de façon relative. L'isomérisation de type *cis/trans* de la liaison amide Xxx-Pro en est une bonne illustration. L'évolution vers un échange rapide conduit à la coalescence de ces deux raies et à l'affinement progressif d'une raie unique ne permettant plus de distinguer des populations propres. Toutefois, l'aire globale fournie par les 2 signaux, que ce soit à l'état fusionné ou à l'état individualisé, reste constante quel que soit le régime de l'échange.

Les phénomènes d'échange lent sont rarement observés dans les protéines ; les phénomènes d'échange intermédiaire sont, par essence, difficilement observables mais sont généralement responsables

des lacunes d'attribution lors de l'étude d'une protéine ; les phénomènes d'échange rapide sont eux accessibles à partir de la mesure des vitesses de relaxation.

III.2. Les mécanismes de relaxation de spin

III.2.1. Principes de la relaxation de spin

De façon générale, un ensemble de spins nucléaires placés dans un champ magnétique B_0 subit une aimantation longitudinale macroscopique alignée selon la direction de ce champ. Toute aimantation située dans un plan perpendiculaire à B_0 est dite transversale.

La relaxation en RMN est un terme général qui désigne tous les phénomènes ramenant l'aimantation à son état d'équilibre après avoir été préalablement perturbée. Ce retour est gouverné par des champs magnétiques locaux et fluctuants qui prennent naissance au niveau de chaque spin de l'échantillon. Ces champs résultent des diverses interactions affectant les spins et sont modulés par les mouvements moléculaires. Deux types d'interactions sont principalement responsables des phénomènes de relaxation : les interactions dipolaires et l'anisotropie de déplacement chimique. Ces mécanismes de relaxation modifient, au cours du temps, le champ magnétique subi par un spin, et sont à l'origine des paramètres de relaxation que nous avons utilisés, à savoir T_1 , T_2 et NOE.

A l'équilibre, l'aimantation nucléaire se trouve suivant l'axe z du repère tournant, dont la direction coïncide avec celle du champ magnétique statique B_0 . Toute séquence utilisée en RMN consiste en l'application d'impulsions qui amènent les spins hors de leur position d'équilibre. Le processus d'auto-relaxation, responsable du retour à l'équilibre thermodynamique de l'aimantation, s'effectue selon (i) le temps de relaxation longitudinale T_1 qui caractérise la reconstruction de l'aimantation suivant l'axe d'application du champ magnétique z et (ii) le temps de relaxation T_2 qui caractérise la disparition de l'aimantation du plan de mesure xy . Les vitesses de relaxation longitudinale R_1 et transversale R_2 sont respectivement égales aux rapports $1/T_1$ et $1/T_2$.

Les vitesses de relaxation R_1 et R_2 d'un noyau X sont gouvernées par les mouvements internes de la liaison $^1\text{H-X}$ mais aussi par le mouvement global de la protéine. La relaxation transversale R_2 est principalement dominée par les mouvements lents, en particulier les mouvements de réorientation globale de la molécule, qui n'induisent pas de transition, mais font décroître la cohérence entre les spins en faisant varier, de façon aléatoire, leur fréquence de résonance. De plus, R_2 comprend une composante due à l'échange R_2^{ech} définie telle que :

$$R_2^{\text{obs}} = R_2 + R_2^{\text{ech}}$$

La relaxation longitudinale R_1 est, elle, sensible aux mouvements de fréquence intermédiaire.

Le phénomène de relaxation croisé est à l'origine de l'effet nOe. Il témoigne du couplage entre deux aimantations. En l'absence d'échange chimique, la vitesse de relaxation croisée σ_{AX} tire son origine de l'interaction dipolaire entre les noyaux A et X, modulée par les mouvements moléculaires. Cette contribution présente un intérêt non négligeable dans le sens où elle varie en fonction de la proximité spatiale des deux noyaux considérés et plus précisément selon un rapport $1/r_{AX}^6$. Lorsque la distance entre les deux spins est connue et constante, comme c'est le cas entre ^1H et ^{15}N d'un groupe amide secondaire ($\sim 1,02 \text{ \AA}$), l'effet nOe hétéronucléaire ne dépend plus que du temps de corrélation effectif entre les deux spins, c'est-à-dire de l'amplitude de leur mouvement. L'effet nOe hétéronucléaire est donc la combinaison des vitesses de relaxation longitudinale et de relaxation croisée $R_N(\text{H}_2 \leftrightarrow \text{N}_z)$; il est très sensible aux mouvements rapides.

III.2.2. Les expériences RMN

Les vitesses de relaxation sont mesurables grâce à l'enregistrement d'une série d'expériences bidimensionnelles hétéronucléaires de type HSQC. La vitesse de relaxation transversale est mesurée grâce à une expérience basée sur la séquence CPMG (Carr et Purcell, 1954 ; Meiboom et Gill, 1958) appliquée durant un délai t variable.

Il existe différentes méthodes pour mesurer la vitesse de relaxation longitudinale. Leur principe est de laisser se relaxer l'aimantation des noyaux ^{15}N , selon l'axe z , durant un délai t variable. La mesure de l'intensité $I(t)$ des corrélations de chaque expérience en fonction de t obéit à une fonction monoexponentielle décroissante :

$$I(t) = I_0 \cdot \exp(-Rt)$$

La mesure du paramètre nOe ^1H - ^{15}N nécessite deux expériences de mesure des effets nOe hétéronucléaires : dans l'une, le proton subit une saturation ; dans l'autre, on effectue une saturation hors résonance pour compenser d'éventuels effets d'échauffement. Le paramètre nOe ^1H - ^{15}N est calculé en appliquant l'équation :

$$nOe = \frac{I}{I_0}$$

où I et I_0 représentent respectivement l'intensité des pics de corrélation avec et sans saturation. Plus la liaison H-N est rigide, moins la perturbation des noyaux ^1H affectera la relaxation des spins ^{15}N et plus le paramètre nOe sera proche de 1.

Toutes ces expériences permettent d'accéder aux valeurs de R_1 , R_2 et nOe ^1H - ^{15}N pour chaque fonction amide secondaire du squelette peptidique.

III.2.3. Le formalisme de Lipari et Szabo

D'une manière générale, l'expression mathématique des paramètres de relaxation (R_1 , R_2 et ρ) est une combinaison linéaire de densités spectrales, lesquelles rendent compte de l'efficacité du phénomène de relaxation. Ces densités spectrales sont associées *via* la transformée de Fourier aux fonctions de corrélation décrivant le mouvement réorientationnel. Dans le cas des noyaux ^{15}N du squelette protéique, les équations standards des paramètres de relaxation (R_1 , R_2 et ρ) sont définies par 7 paramètres (équations non détaillées ici). Pratiquement, une caractérisation de ces 7 paramètres par trois mesures est impossible. Cependant, une image de la dynamique peut être obtenue en supposant constants la longueur de la liaison N-H ($\sim 1,02 \text{ \AA}$) et les ^{15}N CSA (-160 ou -170 ppm ; CSA pour chemical shift anisotropy ou anisotropie des déplacements chimiques) et en utilisant différentes paramétrisations pour $J(\omega)$. Pour cette dernière approche, le modèle de Lipari-Szabo est le plus utilisé du fait du nombre limité de paramètres à ajuster (Lipari et Szabo, 1982).

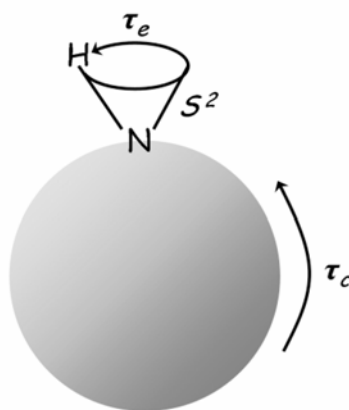


Figure 38 : Représentation des mouvements dans le modèle de Lipari et Szabo

Son principe est de considérer que les vecteurs NH d'une macromolécule sont soumis à deux types de mouvements indépendants, puisqu'ayant lieu à des échelles de temps différentes : (i) le mouvement lent de rotation de la molécule dans son ensemble décrit par le temps de corrélation global τ_c (de l'ordre de la nanoseconde) ; (ii) les mouvements internes locaux, qui sont rapides (dans la gamme des temps de la pico à la nanoseconde) décrits par le paramètre d'ordre S^2 , compris entre 0 et 1, représentant la restriction de mouvement d'un vecteur NH (une valeur de 1 représente un mouvement complètement restreint, une valeur de 0 un mouvement non restreint) et le temps de corrélation local τ_e qui représente la vitesse de ces mouvements (Figure 38). Une contribution d'échange à la vitesse de relaxation transversale R_2^{ech} , traduisant les mouvements les plus lents (dans la gamme des temps de la micro à la milliseconde), peut aussi être extrapolée.

Le formalisme de Lipari et Szabo a été étendu par Clore et ses collaborateurs (Clore *et al.*, 1990). Ce nouveau modèle considère que les mouvements internes se déroulent sur deux échelles de temps différentes. Il comporte ainsi 5 paramètres : τ_c , S_f^2 et τ_f , qui décrivent les mouvements internes rapides et enfin S_s^2 et τ_s , qui décrivent les mouvements internes lents. Ce modèle étendu est plus difficile à mettre en œuvre puisqu'il nécessite d'extrapoler 5 variables à partir de 3 valeurs expérimentales. Une solution à cette

difficulté est de mesurer les valeurs des vitesses de relaxation et du paramètre nOe à aux moins deux valeurs différentes du champ magnétique.

Quel que soit le modèle utilisé, il est nécessaire de déterminer préalablement le temps de corrélation global τ_C . La valeur de τ_C est accessible à partir du rapport R_2/R_1 à condition que : (i) τ_C soit supérieur à 1 ns ; (ii) le temps de corrélation interne soit supérieur à 100 ps ; (iii) les valeurs de R_2 ne soient pas trop surestimées à cause de la contribution d'échange R_2^{ech} (Kay *et al.*, 1989). Les vecteurs NH remplissant ces conditions sont ceux des résidus faisant partie de structures secondaires. Pour ces vecteurs rigides, S^2 et τ_i sont négligeables et le rapport R_2/R_1 ne dépend plus que du temps de corrélation global.

Les valeurs des vitesses de relaxation et du paramètre nOe , interprétées grâce au formalisme de Lipari et Szabo, permettent d'aboutir au temps de corrélation global ainsi qu'aux paramètres S^2 , τ_i et éventuellement R_2^{ech} pour chaque vecteur NH de la protéine. Cette approche permet de décrire les phénomènes dynamiques dont est animée la protéine et éventuellement de les corréler avec ses fonctions et propriétés.

IV. Conclusion

La RMN est une technique en constante évolution. Comme nous venons de le voir, elle permet d'accéder à la structure et à la dynamique des protéines, et ce, grâce à une multitude d'outils constamment développés. Elle offre un large domaine d'application analytique aussi bien en phase liquide qu'en phase solide. Dans le domaine de l'étude des biomolécules, les innovations récentes, aussi bien en terme de matériel (spectromètres, sondes) que de méthodes (techniques multidimensionnelles hétéronucléaires, génie génétique), ont permis d'augmenter la taille limite des objets pouvant être étudiés. Au delà de l'étude structurale, la RMN fournit désormais une variété de méthodes permettant d'observer la dynamique des biomolécules en solution, mais aussi d'étudier, aussi bien qualitativement que quantitativement, les interactions intra- et inter-moléculaires et de mesurer des constantes physicochimiques (constante de diffusion, K_D , pKa , etc...). Le champ d'application de cette technique expérimentale semble presque illimité.

Chapitre 3 : Objectifs des travaux

L'étude des domaines N-terminaux des protéines DsbD (nDsbD) et PilB (NterPilB) se révèle intéressante à plus d'un titre. Leurs implications dans la prévention du stress oxydant et, par conséquent, dans de nombreuses pathologies, en font des sujets d'étude particulièrement sensibles et susceptibles d'applications thérapeutiques dans le domaine des maladies dégénératives et, indirectement, dans le domaine du vieillissement.

Comme cela a été dit précédemment, de nombreuses questions subsistent quant au mécanisme d'interaction entre ces deux protéines. Les études biostructurales fines entreprises jusqu'alors sur ces protéines n'ont fait appel qu'aux techniques de diffraction des RX. Les études structurale et dynamique par RMN (plus proches des conditions physiologiques) apportent-elles alors de nouveaux éléments de réponse quant à l'implication de la boucle FLHE caractéristique de NterPilB dans la spécificité de substrat ? Le domaine nDsbD de *Neisseria meningitidis* présente-t-il des caractéristiques structurale et dynamique propre à son genre bactérien ? L'interaction entre NterPilB et nDsbD peut-elle s'apparenter à celle observée jusqu'à présent pour les autres partenaires de nDsbD ?

Pour répondre à ces questions, la résonance magnétique nucléaire est, aujourd'hui, la méthode idéale puisqu'elle permet la détermination de structures en solution ainsi que les études dynamiques et fonctionnelles de protéines. Nous nous proposons de déterminer les propriétés structurales, dynamiques et fonctionnelles en solution (i) de nDsbD sous une forme réduite, (ii) de NterPilB sous ses formes réduite et oxydée et (iii) d'un complexe mixte entre NterPilB et nDsbD. Nous allons tenter de découvrir si le site actif de nDsbD de *N. meningitidis* est lui aussi protégé par un couvercle capable d'ajuster sa conformation lors de son interaction avec NterPilB et si la boucle FLHE de NterPilB est discriminante pour son interaction avec nDsbD.

Pour réaliser cette étude, le laboratoire dispose d'un accès à un spectromètre RMN Bruker DRX 600 MHz équipé d'une cryosonde TCI. L'étude du complexe mixte entre NterPilB et nDsbD a nécessité l'accès au spectromètre 800 MHz de Gif/Yvette (ce service de RMN étant sous la direction du Dr. Eric Guittet). Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe d'enzymologie moléculaire, dirigée par le Professeur Guy Branlant du laboratoire Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire (MAEM, UMR CNRS-UHP 7567). La totalité des échantillons protéiques utilisés lors de cette étude ont été produits et préparés par Fabrice Neiers et Laure Selme.

Chapitre 4 : Références bibliographiques

Andersen, C. L., Matthey-Dupraz, A., Missiakas, D. & Raina, S. (1997). A new *Escherichia coli* gene, *dsbG*, encodes a periplasmic protein involved in disulphide bond formation, required for recycling DsbA/DsbB and DsbC redox proteins. *Mol Microbiol* 26, 121-32.

Arumugam, S., Hemme, C. L., Yoshida, N., Suzuki, K., Nagase, H., Berjanskii, M., Wu, B. & Van Doren, S. R. (1998). TIMP-1 contact sites and perturbations of stromelysin 1 mapped by NMR and a paramagnetic surface probe. *Biochemistry* 37, 9650-7.

Atkinson, R. A. & Saudek, V. (2002). The direct determination of protein structure by NMR without assignment. *FEBS Lett* 510, 1-4.

Bader, M., Muse, W., Ballou, D. P., Gassner, C. & Bardwell, J. C. (1999). Oxidative protein folding is driven by the electron transport system. *Cell* 98, 217-27.

Bader, M. W., Hiniker, A., Regeimbal, J., Goldstone, D., Haebel, P. W., Riemer, J., Metcalf, P. & Bardwell, J. C. (2001). Turning a disulfide isomerase into an oxidase: DsbC mutants that imitate DsbA. *Embo J* 20, 1555-62.

Bader, M. W., Xie, T., Yu, C. A. & Bardwell, J. C. (2000). Disulfide bonds are generated by quinone reduction. *J Biol Chem* 275, 26082-8.

Badger, J., Kumar, R. A., Yip, P. & Szalma, S. (1999). New features and enhancements in the X-PLOR computer program. *Proteins* 35, 25-33.

Bardwell, J. C., McGovern, K. & Beckwith, J. (1991). Identification of a protein required for disulfide bond formation *in vivo*. *Cell* 67, 581-9.

Bartels, C., Billeter, M., Güntert, P. & Wüthrich, K. (1996). Automated Sequence-specific Assignment of Homologous Proteins using the program GARANT. *J Biomol NMR* 7, 207-213.

Berchanski, A. & Lapidot, A. (2007). Prediction of HIV-1 entry inhibitors neomycin-arginine conjugates interaction with the CD4-gp120 binding site by molecular modeling and multistep docking procedure. *Biochim Biophys Acta* 1768, 2107-19.

Bernini, A., Venditti, V., Spiga, O., Ciutti, A., Prischi, F., Consonni, R., Zetta, L., Arosio, I., Fusi, P., Guagliardi, A. & Niccolai, N. (2008). NMR studies on the surface accessibility of the archaeal protein Sso7d by using TEMPOL and Gd(III)(DTPA-BMA) as paramagnetic probes. *Biophys Chem*.

Bhattacharya, A., Wunderlich, Z., Monleon, D., Tejero, R. & Montelione, G. T. (2008). Assessing model accuracy using the homology modeling automatically software. *Proteins* 70, 105-18.

Bjornstedt, M., Xue, J., Huang, W., Akesson, B. & Holmgren, A. (1994). The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 269, 29382-4.

- Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Van Dorsselear, A. & Branlant, G. (2000). A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 275, 35908-13.
- Boschi-Muller, S., Olry, A., Antoine, M. & Branlant, G. (2005). The enzymology and biochemistry of methionine sulfoxide reductases. *Biochim Biophys Acta* 1703, 231-8.
- Brot, N., Collet, J. F., Johnson, L. C., Jonsson, T. J., Weissbach, H. & Lowther, W. T. (2006). The thioredoxin domain of *Neisseria gonorrhoeae* PilB can use electrons from DsbD to reduce downstream methionine sulfoxide reductases. *J Biol Chem* 281, 32668-75.
- Brunger, A. T. (2007). Version 1.2 of the Crystallography and NMR system. *Nat Protoc* 2, 2728-33.
- Canet, D., Boubel, D. & Canet Soulas, E. (2002). *La RMN : concepts, méthodes et applications*, 2nde édition, Dunod, Paris.
- Carr, H. & Purcell, E. M. (1954). Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments. *Phys Rev* 94, 630-638.
- Carroll, K. S., Gao, H., Chen, H., Leary, J. A. & Bertozzi, C. R. (2005). Investigation of the iron-sulfur cluster in *Mycobacterium tuberculosis* APS reductase: implications for substrate binding and catalysis. *Biochemistry* 44, 14647-57.
- Case, D. A., Cheatham, T. E., 3rd, Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K. M., Jr., Onufriev, A., Simmerling, C., Wang, B. & Woods, R. J. (2005). The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem* 26, 1668-88.
- Chartron, J., Shiau, C., Stout, C. D. & Carroll, K. S. (2007). 3'-Phosphoadenosine-5'-phosphosulfate reductase in complex with thioredoxin: a structural snapshot in the catalytic cycle. *Biochemistry* 46, 3942-51.
- Chen, J., Song, J. L., Zhang, S., Wang, Y., Cui, D. F. & Wang, C. C. (1999). Chaperone activity of DsbC. *J Biol Chem* 274, 19601-5.
- Chivers, P. T., Prehoda, K. E., Volkman, B. F., Kim, B. M., Markley, J. L. & Raines, R. T. (1997). Microscopic pKa values of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry* 36, 14985-91.
- Cho, S. H. & Beckwith, J. (2006). Mutations of the membrane-bound disulfide reductase DsbD that block electron transfer steps from cytoplasm to periplasm in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188, 5066-76.
- Cho, S. H., Porat, A., Ye, J. & Beckwith, J. (2007). Redox-active cysteines of a membrane electron transporter DsbD show dual compartment accessibility. *Embo J* 26, 3509-20.
- Chung, J., Chen, T. & Missiakas, D. (2000). Transfer of electrons across the cytoplasmic membrane by DsbD, a membrane protein involved in thiol-disulfide exchange and protein folding in the bacterial periplasm. *Mol Microbiol* 35, 1099-109.
- Ciorba, M. A., Heinemann, S. H., Weissbach, H., Brot, N. & Hoshi, T. (1997). Modulation of potassium channel function by methionine oxidation and reduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9932-7.
- Clore, G. M. (2000). Accurate and rapid docking of protein-protein complexes on the basis of intermolecular nuclear overhauser enhancement data and dipolar couplings by rigid body minimization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9021-5.
- Clore, G. M., Driscoll, P. C., Wingfield, P. T. & Gronenborn, A. M. (1990). Analysis of the backbone dynamics of interleukin-1 beta using two-dimensional inverse detected heteronuclear ^{15}N - ^1H NMR spectroscopy. *Biochemistry* 29, 7387-401.
- Clore, G. M. & Gronenborn, A. M. (1991). Structures of larger proteins in solution: three- and four-dimensional heteronuclear NMR spectroscopy. *Science* 252, 1390-9.

- Colbert, C. L., Wu, Q., Erbel, P. J., Gardner, K. H. & Deisenhofer, J. (2006). Mechanism of substrate specificity in *Bacillus subtilis* ResA, a thioredoxin-like protein involved in cytochrome *c* maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4410-5.
- Comeau, S. R. & Camacho, C. J. (2005). Predicting oligomeric assemblies: N-mers a primer. *J Struct Biol* 150, 233-44.
- Cornilescu, G., Delaglio, F. & Bax, A. (1999). Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J Biomol NMR* 13, 289-302.
- Cross, R., Aish, J., Paston, S. J., Poole, R. K. & Moir, J. W. (2000). Cytochrome *c'* from *Rhodobacter capsulatus* confers increased resistance to nitric oxide. *J Bacteriol* 182, 1442-7.
- Cross, R., Lloyd, D., Poole, R. K. & Moir, J. W. (2001). Enzymatic removal of nitric oxide catalyzed by cytochrome *c'* in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* 183, 3050-4.
- Cung, M. T., Marraud, M. & Neel, J. (1974). Experimental calibration of a Karplus relationship in order to study the conformations of peptides by nuclear magnetic resonance. *Macromolecules* 7, 606-13.
- Cung, M. T. & Marraud, M. (1982). Conformational dependence of the vicinal proton coupling constant for the C α -C β bond in peptides. *Biopolymers* 21, 953-967.
- Darby, N. J., Kemmink, J. & Creighton, T. E. (1996). Identifying and characterizing a structural domain of protein disulfide isomerase. *Biochemistry* 35, 10517-28.
- Darby, N. J., Raina, S. & Creighton, T. E. (1998). Contributions of substrate binding to the catalytic activity of DsbC. *Biochemistry* 37, 783-91.
- de Vries, S. J., van Dijk, A. D., Krzeminski, M., van Dijk, M., Thureau, A., Hsu, V., Wassenaar, T. & Bonvin, A. M. (2007). HADDOCK versus HADDOCK: new features and performance of HADDOCK2.0 on the CAPRI targets. *Proteins* 69, 726-33.
- Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J. & Bax, A. (1995). NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* 6, 277-93.
- Delepierre, M., Prochnicka-Chalufour, A., Boisbouvier, J. & Possani, L. D. (1999). Pi7, an orphan peptide from the scorpion *Pandinus imperator*: a ^1H -NMR analysis using a nano-NMR Probe. *Biochemistry* 38, 16756-65.
- Edeling, M. A., Guddat, L. W., Fabianek, R. A., Thony-Meyer, L. & Martin, J. L. (2002). Structure of CcmG/DsbE at 1.14 Å resolution: high-fidelity reducing activity in an indiscriminately oxidizing environment. *Structure* 10, 973-9.
- Engen, J. R., Gmeiner, W. H., Smithgall, T. E. & Smith, D. L. (1999). Hydrogen exchange shows peptide binding stabilizes motions in Hck SH2. *Biochemistry* 38, 8926-35.
- Englander, S. W., Mayne, L., Bai, Y. & Sosnick, T. R. (1997). Hydrogen exchange: the modern legacy of Linderstrom-Lang. *Protein Sci* 6, 1101-9.
- Fesik, S. W., Luly, J. R., Erickson, J. W. & Abad-Zapatero, C. (1988). Isotope-edited proton NMR study on the structure of a pepsin/inhibitor complex. *Biochemistry* 27, 8297-301.
- Fiaux, J., Bertelsen, E. B., Horwich, A. L. & Wuthrich, K. (2002). NMR analysis of a 900K GroEL GroES complex. *Nature* 418, 207-11.

- Fiorito, F., Herrmann, T., Damberger, F. F. & Wuthrich, K. (2008). Automated amino acid side-chain NMR assignment of proteins using (^{13}C) - and (^{15}N) -resolved 3D $[(^1\text{H}), (^1\text{H})]$ -NOESY. *J Biomol NMR*.
- Fogh, R., Ionides, J., Ulrich, E., Boucher, W., Vranken, W., Linge, J. P., Habeck, M., Rieping, W., Bhat, T. N., Westbrook, J., Henrick, K., Gilliland, G., Berman, H., Thornton, J., Nilges, M., Markley, J. & Laue, E. (2002). The CCPN project: an interim report on a data model for the NMR community. *Nat Struct Biol* 9, 416-8.
- Friguet, B. (2006). Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. *FEBS Lett* 580, 2910-6.
- Fushman, D., Cahill, S. & Cowburn, D. (1997). The main-chain dynamics of the dynamin pleckstrin homology (PH) domain in solution: analysis of ^{15}N relaxation with monomer/dimer equilibration. *J Mol Biol* 266, 173-94.
- Garcia de la Torre, J., Huertas, M. L. & Carrasco, B. (2000). HYDRONMR: prediction of NMR relaxation of globular proteins from atomic-level structures and hydrodynamic calculations. *J Magn Reson* 147, 138-46.
- Gitlin, G., Tsarbopoulos, A., Patel, S. T., Sydor, W., Pramanik, B. N., Jacobs, S., Westreich, L., Mittelman, S. & Bausch, J. N. (1996). Isolation and characterization of a monomethioninesulfoxide variant of interferon alpha-2b. *Pharm Res* 13, 762-9.
- Goldstone, D., Haebel, P. W., Katzen, F., Bader, M. W., Bardwell, J. C., Beckwith, J. & Metcalf, P. (2001). DsbC activation by the N-terminal domain of DsbD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9551-6.
- Gordon, E. H., Page, M. D., Willis, A. C. & Ferguson, S. J. (2000). *Escherichia coli* DipZ: anatomy of a transmembrane protein disulphide reductase in which three pairs of cysteine residues, one in each of three domains, contribute differentially to function. *Mol Microbiol* 35, 1360-74.
- Goulding, C. W., Sawaya, M. R., Parseghian, A., Lim, V., Eisenberg, D. & Missiakas, D. (2002). Thiol-disulfide exchange in an immunoglobulin-like fold: structure of the N-terminal domain of DsbD. *Biochemistry* 41, 6920-7.
- Grauschopf, U., Fritz, A. & Glockshuber, R. (2003). Mechanism of the electron transfer catalyst DsbB from *Escherichia coli*. *Embo J* 22, 3503-13.
- Grauschopf, U., Winther, J. R., Korber, P., Zander, T., Dallinger, P. & Bardwell, J. C. (1995). Why is DsbA such an oxidizing disulfide catalyst? *Cell* 83, 947-55.
- Gronwald, W., Willard, L., Jellard, T., Boyko, R. F., Rajarathnam, K., Wishart, D. S., Sonnichsen, F. D. & Sykes, B. D. (1998). CAMRA: chemical shift based computer aided protein NMR assignments. *J Biomol NMR* 12, 395-405.
- Grzesiek, S. & Bax, A. (1993). Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -enriched proteins. *J Biomol NMR* 3, 185-204.
- Guntert, P. (2004). Automated NMR structure calculation with CYANA. *Methods Mol Biol* 278, 353-78.
- Haebel, P. W., Goldstone, D., Katzen, F., Beckwith, J. & Metcalf, P. (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, 4774-84.
- Harman, D. (1981). The aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7124-8.
- Heras, B., Edeling, M. A., Schirra, H. J., Raina, S. & Martin, J. L. (2004). Crystal structures of the DsbG disulfide isomerase reveal an unstable disulfide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8876-81.

- Herrmann, T., Guntert, P. & Wuthrich, K. (2002). Protein NMR structure determination with automated NOE-identification in the NOESY spectra using the new software ATNOS. *J Biomol NMR* 24, 171-89.
- Hiniker, A. & Bardwell, J. C. (2003). Disulfide bond isomerization in prokaryotes. *Biochemistry* 42, 1179-85.
- Hiniker, A., Vertommen, D., Bardwell, J. C. & Collet, J. F. (2006). Evidence for conformational changes within DsbD: possible role for membrane-embedded proline residues. *J Bacteriol* 188, 7317-20.
- Holmgren, A., Soderberg, B. O., Eklund, H. & Branden, C. I. (1975). Three-dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 2305-9.
- Horne, J., d'Auvergne, E. J., Coles, M., Velkov, T., Chin, Y., Charman, W. N., Pranker, R., Gooley, P. R. & Scanlon, M. J. (2007). Probing the flexibility of the DsbA oxidoreductase from *Vibrio cholerae*--a ^{15}N - ^1H heteronuclear NMR relaxation analysis of oxidized and reduced forms of DsbA. *J Mol Biol* 371, 703-16.
- Huang, Y. J., Moseley, H. N., Baran, M. C., Arrowsmith, C., Powers, R., Tejero, R., Szyperski, T. & Montelione, G. T. (2005). An integrated platform for automated analysis of protein NMR structures. *Methods Enzymol* 394, 111-41.
- Huston, W. M., Lowe, E. C., Butler, C. S. & Moir, J. W. (2005). Purification and characterization of cytochrome *c'* from *Neisseria meningitidis*. *Biochem Soc Trans* 33, 187-9.
- Jander, G., Martin, N. L. & Beckwith, J. (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, 5121-7.
- Jeng, M. F., Campbell, A. P., Begley, T., Holmgren, A., Case, D. A., Wright, P. E. & Dyson, H. J. (1994). High-resolution solution structures of oxidized and reduced *Escherichia coli* thioredoxin. *Structure* 2, 853-68.
- Johnson, B. A. (2004). Using NMRView to visualize and analyze the NMR spectra of macromolecules. *Methods Mol Biol* 278, 313-52.
- Kadokura, H., Katzen, F. & Beckwith, J. (2003). Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu Rev Biochem* 72, 111-35.
- Karplus, M. & Grant, D. M. (1959). A Criterion for Orbital Hybridization and Charge Distribution in Chemical Bonds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 45, 1269-73.
- Katzen, F. & Beckwith, J. (2000). Transmembrane electron transfer by the membrane protein DsbD occurs *via* a disulfide bond cascade. *Cell* 103, 769-79.
- Katzen, F. & Beckwith, J. (2003). Role and location of the unusual redox-active cysteines in the hydrophobic domain of the transmembrane electron transporter DsbD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10471-6.
- Kay, L. E., Torchia, D. A. & Bax, A. (1989). Backbone dynamics of proteins as studied by ^{15}N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy: application to staphylococcal nuclease. *Biochemistry* 28, 8972-9.
- Keller. (2004). Optimizing the process of nuclear magnetic resonance spectrum analysis and computer aided resonance assignment. PhD thesis. Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland.
- Kemmink, J., Darby, N. J., Dijkstra, K., Nilges, M. & Creighton, T. E. (1996). Structure determination of the N-terminal thioredoxin-like domain of protein disulfide isomerase using multidimensional heteronuclear $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ NMR spectroscopy. *Biochemistry* 35, 7684-91.
- Kemmink, J., Darby, N. J., Dijkstra, K., Nilges, M. & Creighton, T. E. (1997). The folding catalyst protein disulfide isomerase is constructed of active and inactive thioredoxin modules. *Curr Biol* 7, 239-45.

- Kim, J. H., Kim, S. J., Jeong, D. G., Son, J. H. & Ryu, S. E. (2003). Crystal structure of DsbDgamma reveals the mechanism of redox potential shift and substrate specificity(1). *FEBS Lett* 543, 164-9.
- Kishigami, S., Akiyama, Y. & Ito, K. (1995). Redox states of DsbA in the periplasm of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 364, 55-8.
- Koradi, R., Billeter, M., Engeli, M., Guntert, P. & Wuthrich, K. (1998). Automated peak picking and peak integration in macromolecular NMR spectra using AUTOPSY. *J Magn Reson* 135, 288-97.
- Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R. & Thornton, J. M. (1996). AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol NMR* 8, 477-86.
- Laurent, T. C., Moore, E. C. & Reichard, P. (1964). Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides. Iv. Isolation and Characterization of Thioredoxin, the Hydrogen Donor from *Escherichia coli* B. *J Biol Chem* 239, 3436-44.
- LeMaster, D. M. (1988). Protein NMR resonance assignment by isotropic mixing experiments on random fractionally deuterated samples. *FEBS Lett* 233, 326-30.
- Lennon, B. W., Williams, C. H., Jr. & Ludwig, M. L. (2000). Twists in catalysis: alternating conformations of *Escherichia coli* thioredoxin reductase. *Science* 289, 1190-4.
- Li, Y., Hu, Y., Zhang, X., Xu, H., Lescop, E., Xia, B. & Jin, C. (2007). Conformational fluctuations coupled to the thiol-disulfide transfer between thioredoxin and arsenate reductase in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 282, 11078-83.
- Linge, J. P., Habeck, M., Rieping, W. & Nilges, M. (2003). ARIA: automated NOE assignment and NMR structure calculation. *Bioinformatics* 19, 315-6.
- Lipari, G. & Szabo, A. (1982). Model-free approach to the interpretation of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity. *J Am Chem Soc* 104, 4546.
- Lipari, G. & Szabo, A. (1982). Model-free approach of nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results. *J Am Chem Soc* 104, 4559-4570.
- Marion, D. & Wüthrich, K. (1983). Application of phase sensitive two-dimensional correlated spectroscopy (COSY) for measurements of ^1H - ^1H spin-spin coupling constants in proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 113, 967-974.
- Martin, J. L. (1995). Thioredoxin--a fold for all reasons. *Structure* 3, 245-50.
- Martin, J. L., Bardwell, J. C. & Kuriyan, J. (1993). Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation *in vivo*. *Nature* 365, 464-8.
- Masse, J. E. & Keller, R. (2005). AutoLink: automated sequential resonance assignment of biopolymers from NMR data by relative-hypothesis-prioritization-based simulated logic. *J Magn Reson* 174, 133-51.
- Mavridou, D. A., Stevens, J. M., Ferguson, S. J. & Redfield, C. (2007). Active-site properties of the oxidized and reduced C-terminal domain of DsbD obtained by NMR spectroscopy. *J Mol Biol* 370, 643-58.
- McCarthy, A. A., Haebel, P. W., Torronen, A., Rybin, V., Baker, E. N. & Metcalf, P. (2000). Crystal structure of the protein disulfide bond isomerase, DsbC, from *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol* 7, 196-9.
- Meiboom, S. & Gill, D. (1958). Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. *Review of Scientific Instruments* 29, 688-691.

- Messens, J. & Collet, J. F. (2006). Pathways of disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 1050-62.
- Messens, J. & Silver, S. (2006). Arsenate reduction: thiol cascade chemistry with convergent evolution. *J Mol Biol* 362, 1-17.
- Missiakas, D., Schwager, F. & Raina, S. (1995). Identification and characterization of a new disulfide isomerase-like protein (DsbD) in *Escherichia coli*. *Embo J* 14, 3415-24.
- Mueller, G. A., Smith, A. M., Chapman, M. D., Rule, G. S. & Benjamin, D. C. (2001). Hydrogen exchange nuclear magnetic resonance spectroscopy mapping of antibody epitopes on the house dust mite allergen Der p 2. *J Biol Chem* 276, 9359-65.
- Nakamoto, H. & Bardwell, J. C. (2004). Catalysis of disulfide bond formation and isomerization in the *Escherichia coli* periplasm. *Biochim Biophys Acta* 1694, 111-9.
- Nakamura, H., Matsuda, M., Furuke, K., Kitaoka, Y., Iwata, S., Toda, K., Inamoto, T., Yamaoka, Y., Ozawa, K. & Yodoi, J. (1994). Adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin protects endothelial F-2 cell injury caused by activated neutrophils or hydrogen peroxide. *Immunol Lett* 42, 75-80.
- Nakanishi, T., Miyazawa, M., Sakakura, M., Terasawa, H., Takahashi, H. & Shimada, I. (2002). Determination of the interface of a large protein complex by transferred cross-saturation measurements. *J Mol Biol* 318, 245-9.
- Netto, L. E. & Stadtman, E. R. (1996). The iron-catalyzed oxidation of dithiothreitol is a biphasic process: hydrogen peroxide is involved in the initiation of a free radical chain of reactions. *Arch Biochem Biophys* 333, 233-42.
- Nietlispach, D., Mott, H. R., Stott, K. M., Nielsen, P. R., Thiru, A. & Laue, E. D. (2004). Structure determination of protein complexes by NMR. *Methods Mol Biol* 278, 255-88.
- Oblong, J. E., Chantler, E. L., Gallegos, A., Kirkpatrick, D. L., Chen, T., Marshall, N. & Powis, G. (1994). Reversible inhibition of human thioredoxin reductase activity by cytotoxic alkyl 2-imidazolyl disulfide analogues. *Cancer Chemother Pharmacol* 34, 434-438.
- Olry, A., Boschi-Muller, S., Marraud, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselaar, A. & Branlant, G. (2002). Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of PILB, a probable virulence factor from *Neisseria meningitidis*. *J Biol Chem* 277, 12016-22.
- Osterberg, F., Morris, G. M., Sanner, M. F., Olson, A. J. & Goodsell, D. S. (2002). Automated docking to multiple target structures: incorporation of protein mobility and structural water heterogeneity in AutoDock. *Proteins* 46, 34-40.
- Otting, G. & Wuthrich, K. (1990). Heteronuclear filters in two-dimensional [¹H,¹H]-NMR spectroscopy: combined use with isotope labelling for studies of macromolecular conformation and intermolecular interactions. *Q Rev Biophys* 23, 39-96.
- Ouyang, N., Gao, Y. G., Hu, H. Y. & Xia, Z. X. (2006). Crystal structures of *E. coli* CcmG and its mutants reveal key roles of the N-terminal beta-sheet and the fingerprint region. *Proteins* 65, 1021-31.
- Pedrajas, J. R., Miranda-Vizuet, A., Javanmardy, N., Gustafsson, J. A. & Spyrou, G. (2000). Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. *J Biol Chem* 275, 16296-301.
- Pugalethi, G., Shameer, K., Srinivasan, N. & Sowdhamini, R. (2006). HARMONY: a server for the assessment of protein structures. *Nucleic Acids Res* 34, W231-4.
- Qin, J., Clore, G. M., Kennedy, W. M., Huth, J. R. & Gronenborn, A. M. (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, 289-97.

- 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* 4, 613-20.
- Ranaivoson, F. M., Kauffmann, B., Neiers, F., Wu, J., Boschi-Muller, S., Panjikar, S., Aubry, A., Branlant, G. & Favier, F. (2006). The X-ray structure of the N-terminal domain of PILB from *Neisseria meningitidis* reveals a thioredoxin-fold. *J Mol Biol* 358, 443-54.
- Regeimbal, J., Gleiter, S., Trumpower, B. L., Yu, C. A., Diwakar, M., Ballou, D. P. & Bardwell, J. C. (2003). Disulfide bond formation involves a quinhydrone-type charge-transfer complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13779-84.
- Rietsch, A., Bessette, P., Georgiou, G. & Beckwith, J. (1997). Reduction of the periplasmic disulfide bond isomerase, DsbC, occurs by passage of electrons from cytoplasmic thioredoxin. *J Bacteriol* 179, 6602-8.
- Rozhkova, A. & Glockshuber, R. (2008). Thermodynamic aspects of DsbD-mediated electron transport. *J Mol Biol* 380, 783-8.
- Rozhkova, A., Stimimann, C. U., Frei, P., Grauschopf, U., Brunisholz, R., Grutter, M. G., Capitani, G. & Glockshuber, R. (2004). Structural basis and kinetics of inter- and intramolecular disulfide exchange in the redox catalyst DsbD. *Embo J* 23, 1709-19.
- Ryabov, Y. & Fushman, D. (2007). Structural assembly of multidomain proteins and protein complexes guided by the overall rotational diffusion tensor. *J Am Chem Soc* 129, 7894-902.
- Santucci, R., Sinibaldi, F. & Fiorucci, L. (2008) Protein folding, unfolding and misfolding: role played by intermediate States. *Mini Rev Med Chem*. 2008 8(1), 57-62.
- Schoneich, C. (2005). Methionine oxidation by reactive oxygen species: reaction mechanisms and relevance to Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1703, 111-9.
- Seib, K. L., Tseng, H. J., McEwan, A. G., Apicella, M. A. & Jennings, M. P. (2004). Defenses against oxidative stress in *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*: distinctive systems for different lifestyles. *J Infect Dis* 190, 136-47.
- Seib, K. L., Wu, H. J., Kidd, S. P., Apicella, M. A., Jennings, M. P. & McEwan, A. G. (2006). Defenses against oxidative stress in *Neisseria gonorrhoeae*: a system tailored for a challenging environment. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 344-61.
- Seo, M. S., Kang, S. W., Kim, K., Baines, I. C., Lee, T. H. & Rhee, S. G. (2000). Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *J Biol Chem* 275, 20346-54.
- Sevier, C. S. & Kaiser, C. A. (2002). Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 836-47.
- Shao, F., Bader, M. W., Jakob, U. & Bardwell, J. C. (2000). DsbG, a protein disulfide isomerase with chaperone activity. *J Biol Chem* 275, 13349-52.
- Shuker, S. B., Hajduk, P. J., Meadows, R. P. & Fesik, S. W. (1996). Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science* 274, 1531-4.
- Simons, K. T., Bonneau, R., Ruczinski, I. & Baker, D. (1999). *Ab initio* protein structure prediction of CASP III targets using ROSETTA. *Proteins Suppl* 3, 171-6.
- Skaar, E. P., Tobiason, D. M., Quick, J., Judd, R. C., Weissbach, H., Etienne, F., Brot, N. & Seifert, H. S. (2002). The outer membrane localization of the *Neisseria gonorrhoeae* MsrA/B is involved in survival against reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10108-13.

- Spronk, C. A., Bonvin, A. M., Radha, P. K., Melacini, G., Boelens, R. & Kaptein, R. (1999). The solution structure of Lac repressor headpiece 62 complexed to a symmetrical lac operator. *Structure* 7, 1483-92.
- Stevanin, T. M., Moir, J. W. & Read, R. C. (2005). Nitric oxide detoxification systems enhance survival of *Neisseria meningitidis* in human macrophages and in nasopharyngeal mucosa. *Infect Immun* 73, 3322-9.
- Stewart, E. J., Katzen, F. & Beckwith, J. (1999). Six conserved cysteines of the membrane protein DsbD are required for the transfer of electrons from the cytoplasm to the periplasm of *Escherichia coli*. *Embo J* 18, 5963-71.
- Stimimann, C. U., Grutter, M. G., Glockshuber, R. & Capitani, G. (2006). nDsbD: a redox interaction hub in the *Escherichia coli* periplasm. *Cell Mol Life Sci* 63, 1642-8.
- Stimimann, C. U., Rozhkova, A., Grauschopf, U., Bockmann, R. A., Glockshuber, R., Capitani, G. & Grutter, M. G. (2006). High-resolution structures of *Escherichia coli* cDsbD in different redox states: A combined crystallographic, biochemical and computational study. *J Mol Biol* 358, 829-45.
- Stimimann, C. U., Rozhkova, A., Grauschopf, U., Grutter, M. G., Glockshuber, R. & Capitani, G. (2005). Structural basis and kinetics of DsbD-dependent cytochrome *c* maturation. *Structure* 13, 985-93.
- Sun, X. X. & Wang, C. C. (2000). The N-terminal sequence (residues 1-65) is essential for dimerization, activities, and peptide binding of *Escherichia coli* DsbC. *J Biol Chem* 275, 22743-9.
- Taha, M. K., Morand, P. C., Pereira, Y., Eugene, E., Giorgini, D., Larribe, M. & Nassif, X. (1998). Pilus-mediated adhesion of *Neisseria meningitidis*: the essential role of cell contact-dependent transcriptional upregulation of the PilC1 protein. *Mol Microbiol* 28, 1153-63.
- Tan, J. T. & Bardwell, J. C. (2004). Key players involved in bacterial disulfide-bond formation. *ChemBiochem* 5, 1479-87.
- Tolman, J. R., Al-Hashimi, H. M., Kay, L. E. & Prestegard, J. H. (2001). Structural and dynamic analysis of residual dipolar coupling data for proteins. *J Am Chem Soc* 123, 1416-24.
- Tovchigrechko, A. & Vakser, I. A. (2006). GRAMM-X public web server for protein-protein docking. *Nucleic Acids Res* 34, W310-4.
- Ueno, M., Masutani, H., Arai, R. J., Yamauchi, A., Hirota, K., Sakai, T., Inamoto, T., Yamaoka, Y., Yodoi, J. & Nikaido, T. (1999). Thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation. *J Biol Chem* 274, 35809-15.
- Vriend, G. (1990). WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J Mol Graph* 8, 52-6, 29.
- Wakasugi, N., Tagaya, Y., Wakasugi, H., Mitsui, A., Maeda, M., Yodoi, J. & Tursz, T. (1990). Adult T-cell leukemia-derived factor/thioredoxin, produced by both human T-lymphotropic virus type I- and Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes, acts as an autocrine growth factor and synergizes with interleukin 1 and interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8282-6.
- Walker, O., Varadan, R. & Fushman, D. (2004). Efficient and accurate determination of the overall rotational diffusion tensor of a molecule from ¹⁵N relaxation data using computer program ROTDIF. *J Magn Reson* 168, 336-45.
- Wang, C., Rance, M. & Palmer, A. G., 3rd. (2003). Mapping chemical exchange in proteins with MW > 50 kD. *J Am Chem Soc* 125, 8968-9.
- Wang, H., Kurochkin, A. V., Pang, Y., Hu, W., Flynn, G. C. & Zuiderweg, E. R. (1998). NMR solution structure of the 21 kDa chaperone protein DnaK substrate binding domain: a preview of chaperone-protein interaction. *Biochemistry* 37, 7929-40.

- Weichsel, A., Gasdaska, J. R., Powis, G. & Montfort, W. R. (1996). Crystal structures of reduced, oxidized, and mutated human thioredoxins: evidence for a regulatory homodimer. *Structure* 4, 735-51.
- Whitehead, B., Craven, C. J. & Waltho, J. P. (1997). Double and triple resonance NMR methods for protein assignment. *Methods Mol Biol* 60, 29-52.
- Wiederstein, M. & Sippl, M. J. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res* 35, W407-10.
- Wishart, D. S., Sykes, B. D. & Richards, F. M. (1991). Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure. *J Mol Biol* 222, 311-33.
- Wishart, D. S. & Sykes, B. D. (1994a). Chemical shifts as a tool for structure determination. *Methods Enzymol* 239, 363-92.
- Wishart, D. S. & Sykes, B. D. (1994b). The ^{13}C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ^{13}C chemical-shift data. *J Biomol NMR* 4, 171-80.
- Wu, H. J., Seib, K. L., Edwards, J. L., Apicella, M. A., McEwan, A. G. & Jennings, M. P. (2005). Azurin of pathogenic *Neisseria* spp. is involved in defense against hydrogen peroxide and survival within cervical epithelial cells. *Infect Immun* 73, 8444-8.
- Wu, J., Neiers, F., Boschi-Muller, S. & Branlant, G. (2005). The N-terminal domain of PILB from *Neisseria meningitidis* is a disulfide reductase that can recycle methionine sulfoxide reductases. *J Biol Chem* 280, 12344-50.
- Wunderlich, M. & Glockshuber, R. (1993). *In vivo* control of redox potential during protein folding catalyzed by bacterial protein disulfide-isomerase (DsbA). *J Biol Chem* 268, 24547-50.
- Xie, T., Yu, L., Bader, M. W., Bardwell, J. C. & Yu, C. A. (2002). Identification of the ubiquinone-binding domain in the disulfide catalyst disulfide bond protein B. *J Biol Chem* 277, 1649-52.
- Xu, Y., Wu, J., Gorenstein, D. & Braun, W. (1999). Automated 2D NOESY assignment and structure calculation of Crambin(S22/I25) with the self-correcting distance geometry based NOAH/DIAMOD programs. *J Magn Reson* 136, 76-85.
- 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, 5083-92.
- Zimmerman, D. E., Kulikowski, C. A., Huang, Y., Feng, W., Tashiro, M., Shimotakahara, S., Chien, C., Powers, R. & Montelione, G. T. (1997). Automated analysis of protein NMR assignments using methods from artificial intelligence. *J Mol Biol* 269, 592-610.
- Zuiderweg, E. R. (2002). Mapping protein-protein interactions in solution by NMR spectroscopy. *Biochemistry* 41, 1-7.
- Zwahlen, C., Legault, P., Vincent, S. J. F., Greenblatt, J., Konrat, R. & Kay, L. E. (1997). Methods for measurement of intermolecular NOEs by multinuclear NMR spectroscopy: Application to a bacteriophage N-Peptide/boxB RNA Complex *J Am Chem Soc* 119, 6711 - 6721.

- Partie 2 -

Résultats expérimentaux

Chapitre 1 : Etude structurale et dynamique du mutant C103S du domaine N-terminal de la protéine DsbD de *Neisseria meningitidis*

I. Introduction

La protéine DsbD est essentielle pour le transport des électrons du cytoplasme vers le périplasme des bactéries gram négatives. On peut y considérer trois domaines, le domaine N-terminal (nDsbD) faisant l'objet de ce chapitre. Il se situe dans le périplasme et se charge de distribuer les électrons provenant de la Trx cytoplasmique, *via* les domaines transmembranaire et C-terminal, à ses partenaires périplasmiques : DsbC, DsbE et DsbG, ces protéines possédant toutes un repliement de type Trx avec sa signature caractéristique CXXC, motif capable de générer un pont disulfure. La protéine nDsbD présente un repliement de type immunoglobuline (Ig) et contient deux cystéines permettant un échange de ponts disulfure avec ses partenaires biologiques. Contrairement aux autres disulfide réductases, les cystéines de nDsbD ne sont pas organisées en un motif CXXC mais en un motif CX₅C. Des études structurales précédentes concernant le domaine nDsbD seul ou sous la forme d'un complexe mixte ont montré la présence d'une boucle appelée « cap-loop » jouant un rôle de couvercle capable de protéger les cystéines réactives à l'état non complexé et de s'ouvrir lors de la formation du complexe transitoire avec le substrat.

Comme décrit dans la Partie 1- chapitre 1, la protéine DsbD est capable d'interagir, *via* son domaine N-terminal, avec le domaine NterPilB et ainsi, d'intervenir, grâce à l'apport d'électrons, dans le processus de réparation des méthionines oxydées sous leur forme sulfoxyde.

L'étude RMN de nDsbD a été motivée par, (i) la résolution d'une structure tridimensionnelle, pour le genre *Neisseria*, (ii) l'étude de la dynamique interne de la protéine et (iii) l'obtention de paramètres structuraux et dynamiques servant de base pour la modélisation d'un complexe entre NterPilB et nDsbD. Seule nDsbD d' *E. coli* (nDsbD_{*E.coli*}) a été étudiée jusqu'à présent par l'unique méthode de diffraction RX. Nous avons voulu savoir si les structures secondaires et 3D de l'enzyme étaient conservées selon l'espèce bactérienne et lors de sa mise en solution aqueuse.

Nous avons cherché à déterminer les paramètres dynamiques et structuraux de la « cap-loop » de nDsbD de façon à mieux comprendre son mécanisme. Pour ce faire, nous avons utilisé le mutant C103S du domaine N-terminal de DsbD de *Neisseria meningitidis*. Il représente la forme réduite de la protéine dans

laquelle la cystéine de recyclage (Cys103) a été remplacée par une sérine (nDsbD_{C103S}). Ce mutant sera celui utilisé pour former le complexe mixte avec NterPILB.

II. Attribution séquentielle du mutant nDsbD_{C103S}

L'étude structurale et dynamique de la protéine nécessite l'attribution séquentielle du squelette peptidique et des chaînes latérales. Celle-ci se fait grâce à l'exploitation de spectres tridimensionnels hétéronucléaires. Cette première étape permet d'obtenir les fréquences de résonance de l'ensemble (ou presque) des noyaux de la protéine et constitue un préalable indispensable à l'exploitation des spectres NOESY édités (nécessaires pour la résolution de la structure tridimensionnelle) ainsi qu'au traitement des expériences de mesure des vitesses de relaxation des noyaux ¹⁵N.

II.1. Etudes préliminaires

Le domaine nDsbD_{C103S} est une protéine de 128 résidus dont l'examen de la structure primaire révèle qu'elle ne possède que 2 cystéines (Cys103 et Cys109), celles impliquées dans le processus catalytique. De plus, elle renferme par deux fois un motif Pro-Pro. Les résidus proline sont relativement difficiles à caractériser avec les expériences RMN classiques. L'enchaînement de ces résidus en complique l'attribution car l'accès aux fréquences de résonances des noyaux H^α, C^α et C^β pour la première des deux prolines est difficile. Toutefois la séquence de nDsbD_{C103S}, en l'absence d'autres segments répétitifs, laisse prévoir un travail d'attribution relativement simple.

L'étude des structures secondaires de nDsbD_{E.coli} suggère un bon taux de structuration de la protéine puisque plus de 60% des résidus de la protéine prennent part à des structures secondaires régulières. De plus, la longueur moyenne des boucles est de 3,8 résidus. Il convient de savoir si ces résultats peuvent être extrapolés à nDsbD_{C103S}.

II.2. Premiers spectres

Les échantillons de nDsbD_{C103S} marqués ont été préparés à une concentration de 1mM, à pH 7,0 (20 mM de KH₂PO₃), en présence de 50 mM de dithiothréitol pour empêcher l'oxydation des groupes thiol de l'enzyme ; tous les spectres ont été enregistrés à 600 MHz et à une température de 298 K. Les spectres unidimensionnel ¹H et bidimensionnel HSQC ¹H-¹⁵N, en raison de la dispersion des signaux, suggèrent un bon taux de structuration. Le taux de recouvrement des pics relatifs à chacun des couples ¹H^N et ¹⁵N^H des liaisons peptidiques sur le spectre HSQC est ainsi faible (Figure 39).

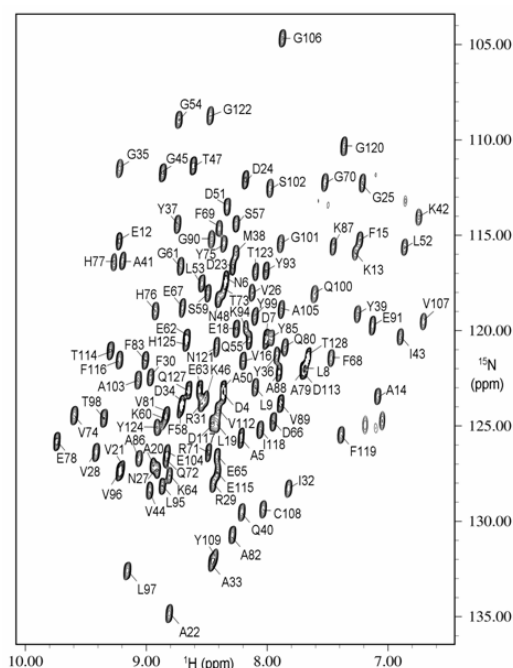


Figure 39 : Spectre HSQC ^1H - ^{15}N du mutant C103S de nDsbD de *Neisseria meningitidis*

II.3. Résultats

L'attribution séquentielle des fréquences de résonance de nDsbD_{C103S} a fait l'objet d'une publication. Elle fait référence aux méthodes utilisées et notamment à la production des échantillons isotopiquement enrichis ainsi qu'aux expériences RMN utilisées. Cette publication relate les faits marquants suivants :

- 1- Plus de 96% des atomes du squelette peptidique ont pu être attribués ainsi que la grande majorité des protons des chaînes latérales. Cela constitue autant d'informations pour la résolution de la structure 3D.
- 2- La liste des déplacements chimiques a été déposée sur le site de la BMRB (BioMagResBank) sous le code d'entrée 15627.
- 3- Un alignement entre les séquences de nDsbD_{C103S} et de nDsbD_{E.coli} montre que, même si celles-ci divergent, la plupart des résidus du site actif sont conservés (notamment les résidus des segments 37-42, 67-72 et 99-112). Toutefois, l'évaluation des structures secondaires par le logiciel CSI conduit à la prédiction de 9 brins β et pointe ainsi les différences structurales possibles entre nDsbD_{E.coli} et nDsbD_{C103S}.

II.4. Publication

Pour plus de détails, il convient de se reporter à la publication de Quinternet *et al.* (*Biomolecular NMR assignments*, 2007) disponible dans son intégralité ci-après.

^1H , ^{13}C , and ^{15}N resonance assignment of the C103S mutant of the N-terminal domain of DsbD from *Neisseria meningitidis*

Marc Quinternet · Laure Selme · Chrystel Beaufile · Pascale Tsan ·
Christophe Jacob · Sandrine Boschi-Muller · Marie-Christine Averlant-Petit ·
Guy Branlant · Manh-Thong Cung

Received: 20 February 2008 / Accepted: 31 March 2008
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

Abstract We report the nearly complete ^1H , ^{13}C , and ^{15}N resonance assignments of the C103S mutant of the N-terminal domain of DsbD from *Neisseria meningitidis*. Secondary structure determination using CSI method leads to the prediction of nine β -sheet parts.

Keywords N-terminal domain of DsbD · *Neisseria meningitidis* · Mutant

Biological context

The *Escherichia coli* DsbD is a transmembrane protein enabling an electron transfer from the cytoplasmic thioredoxin to periplasmic proteins, such as DsbC, DsbG, and CcmG involved in disulfide bond isomerization of periplasmic proteins (Nakamoto and Bardwell 2004) and in cytochrome c maturation pathway (Reid et al. 2001). The *E. coli* DsbD is composed of three domains: a transmembrane domain (TMD), a periplasmic Trx-like C-terminal domain (cDsbD), and a periplasmic Immunoglobulin-like N-terminal domain (nDsbD). It has been suggested that electrons could be initially transferred from TMD to cDsbD, then from cDsbD to nDsbD. These three domains

contain two cysteines needed for electron transport (Rozhkova et al. 2004). The nDsbD domain is in charge to reduce its periplasmic partners, all of them belonging to the Trx-like superfamily.

Recently, it has been suggested that *E. coli* nDsbD could interact with the Trx-like N-terminal domain of PilB from *Neisseria gonorrhoeae* to reduce downstream methionine sulfoxide reductase domains of PilB (Brot et al. 2006). The crystal structures from *E. coli* nDsbD (Goulding et al. 2002) and cDsbD (Stirnemann et al. 2006) have been reported. Moreover, NMR studies on the C-terminal domain of the DsbD protein have been performed in order to characterize its active-site properties (Mavridou et al. 2007). We now report the nearly complete ^1H , ^{13}C , and ^{15}N assignment of the C103S mutant of nDsbD from *Neisseria meningitidis* (nDsbD_{C103S}, 128 residues). This work aims at providing NMR investigations on the N-terminal domain of the DsbD protein and at enlarging to *Neisseria* genus the range of structural studies on DsbD, so far limited to *E. coli*. Assignment is a prerequisite to obtain the solution structure and to access protein dynamics. Then, the knowledge of all these parameters should permit to identify the structural and dynamic factors involved in the recognition between nDsbD and its various Trx-like partners in *Neisseria* genus.

M. Quinternet · C. Beaufile · P. Tsan · M.-C. Averlant-Petit ·
M.-T. Cung (✉)
Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire,
UMR 7568 CNRS-INPL, Nancy-Université, 1 rue Grandville,
B.P. 20451, 54001 Nancy Cedex, France
e-mail: Manh-Thong.Cung@ensic.inpl-nancy.fr

L. Selme · C. Jacob · S. Boschi-Muller · G. Branlant
Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, UMR 7567
CNRS-UHP, Nancy-Université, Bld des Aiguillettes, B.P. 239,
54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

Methods and experiments

The *E. coli* strain used for nDsbD_{C103S} (Δ_{19-146}) production was C41-DE3 transformed with pETnDsbD_{C103S} plasmid, obtained by cloning the corresponding fragment of the nDsbD open reading frame synthesized by PCR (sequences of oligonucleotides not shown) using *N. meningitidis* 8013 genomic DNA, kindly provided by

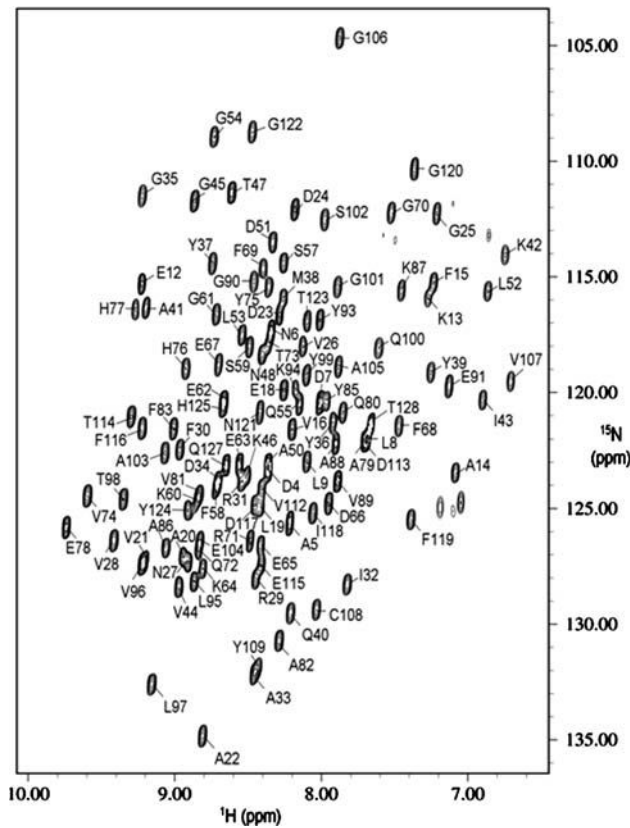


Fig. 1 2D ^1H - ^{15}N TROSY spectrum of $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -labeled C103S mutant of the N-terminal domain of DsbD from *N. meningitidis* recorded at 600 MHz, 298 K, pH 7.0

Dr X. Nassif (INSERM U570, Paris) between the *Nde*I and the *Sac*I sites of the pET20b plasmid. $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -labeled sample was prepared by growing cells in a minimal media with $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ as the sole nitrogen source and with ^{13}C -labeled glucose as the only carbon source. The nDsbD_{C103S} production was induced at an OD₆₀₀ of 0.6 by addition of 1 mM IPTG and harvested after 16 h for the $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ protein by centrifugation, resuspended in minimal volume of buffer A (50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8.0) with 20 mM DTT, and sonicated. After fractionated precipitation at 40% and 70% ammonium sulfate saturation, the contaminated proteins were removed by exclusion size chromatography on ACA54 gel (IBF) in buffer A. Purified fractions were then pooled and successively applied to a Q-Sepharose column and a Phenyl-Sepharose column connected to a fast protein liquid chromatography system (Amersham Biosciences). The sample purity and molecular mass were checked by SDS-PAGE and electrospray mass spectrometry, respectively. The protein was isolated by gel filtration on Econo-Pac 10 DG Column (Bio-Rad laboratory) equilibrated with 10 mM phosphate buffer, pH 7.0.

The NMR sample contained 0.5 mM $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ protein concentration (90% H₂O, 10% D₂O) in 20 mM phosphate buffer at pH 7.0. All spectra were acquired at 298 K on a Bruker DRX 600 MHz spectrometer equipped with a TCI cryoprobe. Spectra were processed using the program XWINNMR (Bruker) and analyzed with the programs

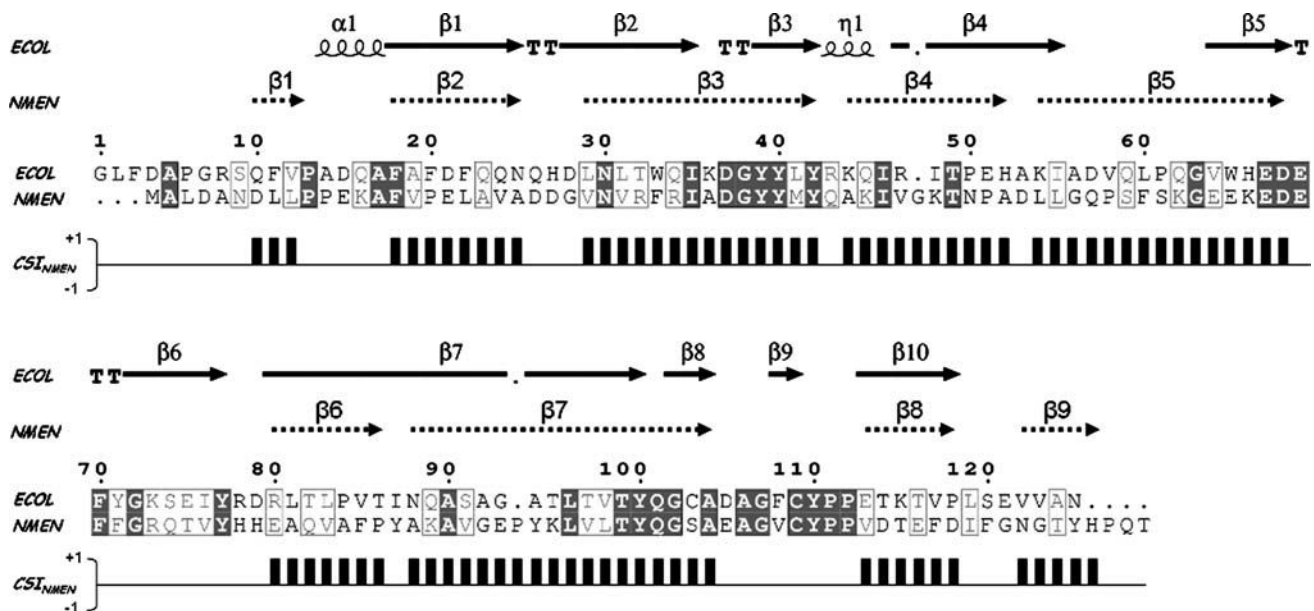


Fig. 2 Sequence alignment between *E. coli* nDsbD and *N. meningitidis* nDsbD_{C103S} using Clustal W program (Thompson et al. 1994). Perfect amino acid matching is figured in dark boxes. β -strands for *E. coli* nDsbD and predicted β -strands for *N. meningitidis* nDsbD_{C103S} are

represented using filled and dashed arrows respectively. Bar graphs of the consensus CSI for nDsbD_{C103S} are represented below the amino acid sequence and were calculated using the CSI program version 2.0. Figure was prepared with help of ESPrnt (Gouet et al. 1999)

CARA (Keller 2004). Backbone amide ¹H^N, ¹⁵N, ¹³C^α, ¹H^α, ¹³C^γ, and side chain ¹H, ¹³C resonances were assigned using ¹H-¹⁵N HSQC, HNCO, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, CBCA(CO)NH, and HNHA experiments. HNHB, HCCH-TOCSY, and ¹H-¹⁵N- and ¹H-¹³C-3D HSQC-NOESY spectra were also performed for side chain assignments.

Torsion angles (ϕ, ψ) and secondary structure prediction are based on H^N, H^α, N, C^α, C^β, and C^γ chemical shifts using the TALOS and the CSI programs (Cornilescu et al. 1999; Wishart and Sykes 1994).

Extent of assignments and data deposition

The ¹H-¹⁵N TROSY spectrum for the nDsbD_{C103S} is shown in Fig. 1. More than 96% of backbone H^N, N, C^α, H^α, and C^γ nuclei have been assigned (i.e., 115/118 ¹⁵N-H^N sites, 124/128 C^α, 134/139 H^α, 122/128 C^γ). Proton and carbon chemical shift data for the side chain groups were determined using a combination of 3D spectra. Considering the overall side-chains carbon atoms of nDsbD_{C103S} but excluding carboxyl and guanidinium groups, ~79% of the carbon atoms were assigned (i.e., 113/117 C^β, 72/100 C^γ, 64/76 C^δ, 30/46 C^ε, 4/17 C^ζ). Considering the overall side-chains proton atoms but excluding amino, alcohol, and guanidinium groups, ~88% of the proton atoms were assigned (i.e., 217/228 H^β, 168/184 H^γ, 113/134 H^δ, 36/55 H^ε, and 4/8 H^ζ). The chemical shifts of nDsbD_{C103S} were deposited in the BioMagResBank under the accession number 15627 (<http://www.bmrb.wisc.edu>).

Alignment between *E. coli* and *N. meningitidis* nDsbDs amino acids sequences shows that many residues around the active cysteines are conserved (Fig. 2). The evaluation of the obtained H^α, C^γ, C^α, and C^β chemical shifts by the CSI program leads to the prediction of nine β-sheet segments [β 1 (D8-L10), β 2 (F16-A23), β 3 (V27-Y40), β 4 (A42-A51), β 5 (L53-D67), β 6 (E79-P85), β 7 (A87-A104), β 8 (V113-D118), and β 9 (N122-H126)] suggesting however, that structural differences exist between the *E. coli* nDsbD and the *N. meningitidis* nDsbD_{C103S}. The numbering of amino acid residues is based on the numbering of *E. coli* nDsbD.

Acknowledgments This research was supported by the CNRS, the Ministère Délégué à la Recherche (ACI BCMS047), Nancy-Université with Université Henri Poincaré University and INPL, the Conseil Régional de la Lorraine, the IFR 111 Bioingénierie and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC-No 4393). Access to the Bruker DRX 600 NMR facilities of the Service Commun de Biophysicochimie des Interactions Moléculaires, Nancy I was deeply appreciated.

References

- Brot N, Collet JF, Johnson LC, Jönsson TJ, Weissbach H, Lowther WT (2006) The thioredoxin domain of *Neisseria gonorrhoeae* PilB can use electrons from DsbD to reduce downstream methionine sulfoxide reductases. *J Biol Chem* 281:32668–32675
- Cornilescu G, Delaglio F, Bax A (1999) Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J Biomol NMR* 13:289–302
- Goet P, Courcelle E, Stuart DI, Metz F (1999) ESPript: multiple sequence alignments in Postscript. *Bioinformatics* 15:305–308
- Goulding CW, Sawaya MR, Parseghian A, Lim V, Eisenberg D, Missiakas D (2002) Thiol-disulfide exchange in an immunoglobulin-like fold: structure of the N-terminal domain of DsbD. *Biochemistry* 41:6920–6927
- Keller R (2004) Optimizing the process of nuclear magnetic resonance spectrum analysis and computer aided resonance assignment, Ph.D. Thesis, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland
- Mavridou DAI, Stevens JM, Ferguson SJ, Redfield C (2007) Active-site properties of the oxidized and reduced C-terminal domain of DsbD obtained by NMR spectroscopy. *J Mol Biol* 370:643–658
- Nakamoto H, Bardwell JC (2004) Catalysis of disulfide bond formation and isomerization in the *Escherichia coli* periplasm. *Biochim Biophys Acta* 1694:111–119
- Reid E, Cole J, Eaves DJ (2001) The *Escherichia coli* CcmG protein fulfils a specific role in cytochrome c assembly. *Biochem J* 355:51–58
- Rozhkova A, Stirnimann CU, Frei P, Grauschopf U, Brunisholz R, Grütter MG, Capitani G, Glockshuber R (2004) Structural basis and kinetics of inter- and intramolecular disulfide exchange in the redox catalyst DsbD. *EMBO J* 23:1709–1719
- Stirnimann CU, Rozhkova A, Grauschopf U, Boeckmann RA, Glockshuber R, Capitani G, Gruetter MG (2006) High-resolution structures of *Escherichia coli* cDsbD in different redox states: A combined crystallographic, biochemical and computational study. *J Mol Biol* 358:829–845
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (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* 22:4673–4680
- Wishart DS, Sykes BD (1994) The ¹³C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ¹³C chemical-shift data. *J Biomol NMR* 4:171–180

III. Etude de la structure 3D en solution et de la dynamique interne du mutant C103S du domaine N-terminal de DsbD de *Neisseria meningitidis*.

L'étude de la structure 3D et de la dynamique du squelette de nDsbD_{C103S} en solution a fait l'objet d'une publication dans le journal *Biochemistry* (Quinternet *et al.*, 2008). L'ensemble du texte est disponible ci-après. Les principaux résultats et conclusions de cet article sont résumés ci-dessous.

III.1. Etude de la structure en solution

III.1.1. Méthodes utilisées pour le calcul des structures

Les structures obtenues dérivent de l'attribution des spectres NOESY-HSQC (obtenue initialement de façon automatique par le logiciel ATNOS/CANDID puis révisée visuellement), des prévisions des valeurs d'angles (obtenues grâce au logiciel TALOS), et d'un ensemble de liaisons hydrogène (obtenue grâce à des expériences d'échange ¹H/²H et d'effet de température, ainsi qu'à l'expérience RMN spécifique « long range HNC0 »). Toutes ces contraintes ont été prises en compte par le logiciel de recuit simulé CYANA. Les meilleures structures ont été ensuite sélectionnées et affinées par le logiciel DISCOVER. C'est ainsi qu'une famille de 20 structures représentatives a été obtenue puis validée par PROCHECK-NMR et WHAT IF avant d'être déposée sur le site internet de la PDB (Protein Data Bank) sous le code d'entrée 2k0r.

III.1.2. Analyse de la structure en solution de nDsbD_{C103S} obtenue par RMN.

Le cœur de l'enzyme est constitué de deux parties :

- la première est un sandwich β formé de 2 feuillets de 3 et 5 brins respectivement ;
- la deuxième est un feuillet β structuré en un demi-tonneau β. C'est dans cette cavité particulièrement hydrophobe et encombrée qu'est localisé le site actif.

L'analyse du potentiel électrostatique de nDsbD_{C103S} met en évidence deux zones chargées négativement, l'une située à l'arrière du demi-tonneau β et l'autre, à l'avant du sandwich β (Figure 40).

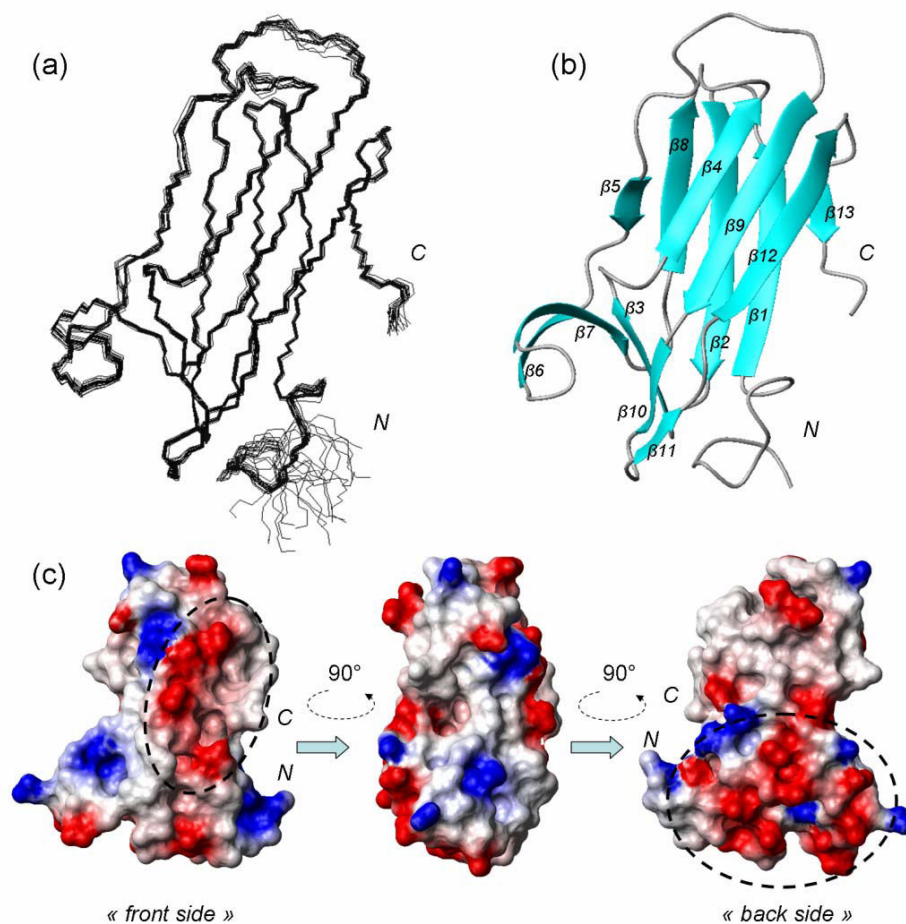


Figure 40 : Représentation de l'ensemble des 20 meilleures structures, en solution, de nDsbD_{C103S} (a). Les éléments de structures secondaires sont figurés sur la structure moyenne (b). Le potentiel électrostatique de nDsbD_{C103S} est représenté selon différentes orientations de la structure moyenne de nDsbD_{C103S} (c). Les zones chargées négativement sont colorées en rouge, les zones chargées positivement, en bleu, et les zones neutres, en blanc.

III.2. Analyse de la dynamique interne de nDsbD_{C103S}.

L'analyse des mouvements internes de nDsbD_{C103S} est basée sur l'étude de la fonction de densité spectrale et sur les modèles de Lipari et Szabo (grâce au logiciel Tensor2).

Il en résulte une flexibilité importante non seulement dans les parties N- et C-terminales (comme habituellement observée dans les protéines) mais aussi dans les segments Lys89-Glu93 et Phe120-Gly123 qui forment des boucles dans une zone située à l'opposé du site actif. De plus, des mouvements, à diverses échelles de temps, sont localisés au niveau de la région des brins $\beta 6$ et $\beta 7$ qui surplombent les résidus Ser103 et Cys109. Ils définissent cette zone comme ayant une mobilité particulière (Figure 41).

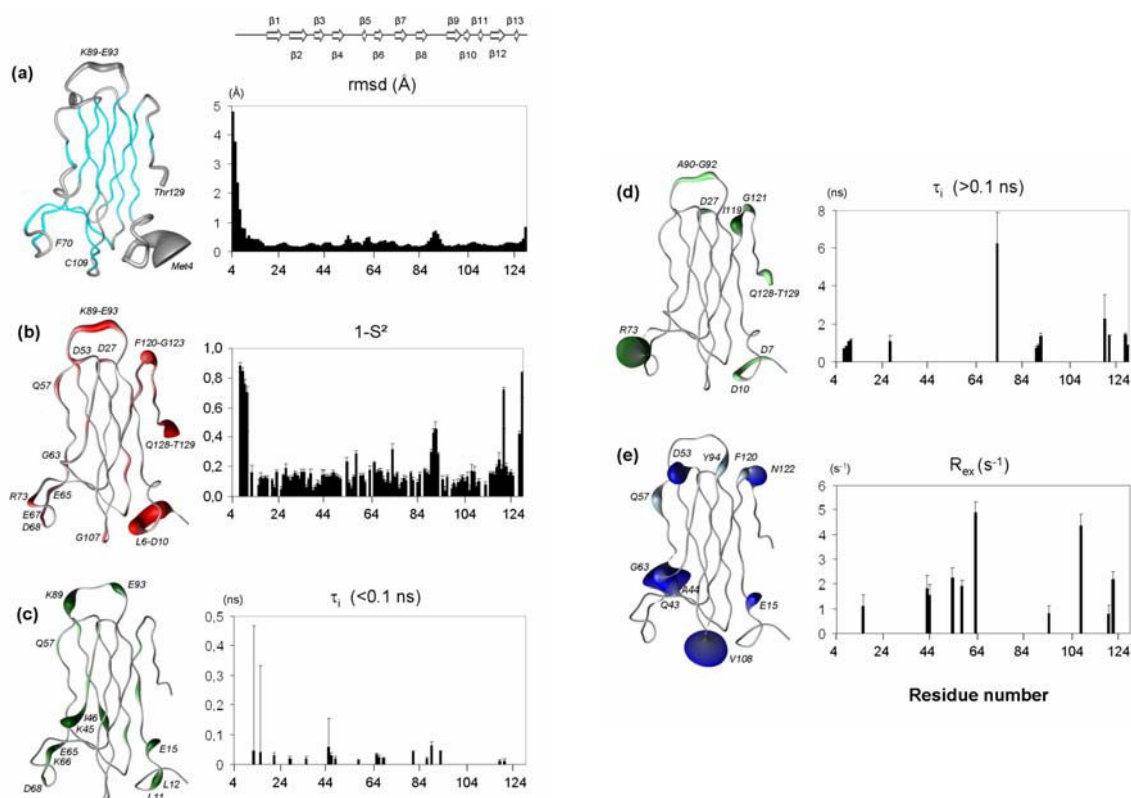


Figure 41 : Représentation des paramètres dynamiques sur la structure moyenne de nDsbD_{C103S}. Représentation du RMSD (a), du paramètre S² (b), du paramètre T_i fast (c), du paramètre T_i slow (d), et du paramètre d'échange R_{ex} (e).

III.3. Discussion

Selon les serveurs web DALI et VAST, nDsbD_{C103S} fait partie de la superfamille structurale des immunoglobulines, caractérisée par la présence d'un motif sandwich β . Le meilleur homologue structural de nDsbD_{C103S} est nDsbD_{E.coli} dont la structure de la forme oxydée (pont disulfure Cys103~Cys109), résolue par diffraction RX, est disponible sur le site de la PDB. La comparaison globale entre ces deux protéines laisse apparaître :

- des changements mineurs : l'analyse des angles dièdres met en évidence une plus faible distorsion du sandwich β dans le cas de nDsbD_{C103S}. De plus, chez nDsbD_{C103S}, la longueur de certains brins β est réduite d'un résidu et l'hélice 3₁₀ est absente, cette dernière ne pouvant être stabilisée, peut-être en raison des mouvements observés dans cette région.

- des changements majeurs : l'expérience RMN « long-range HNC0 » a mis en évidence la présence d'un brin β supplémentaire (brin β 5) ainsi que la réorientation complète du brin β 13 tout le long du brin β 1. La flexibilité du segment Phe120-Gly123 est supposée participer à cette réorientation.

Comme il a été dit précédemment, le site actif est en forme de demi-tonneau β dont la cavité est encombrée. Les résidus Ser103 et Cys109 sont recouverts par les brins β 6 et β 7. Ces brins sont reliés par une boucle appelée « cap-loop » et le cycle aromatique du résidu Phe70, présent dans cette zone inter-brin, contrôle l'entrée de la cavité. Cet arrangement structural est le même pour la forme oxydée de nDsbD_{E.coli}.

Notre mutant mime l'état réduit de la protéine, ce qui signifie que, dans chacun des états rédox de la protéine, le couvercle que forme la « cap-loop » est en position fermée. Cependant, dans la structure en solution de nDsbD_{C103S}, le cycle aromatique du résidu Phe71 se positionne différemment de son équivalent Tyr71 de nDsbD_{E.coli}. Cette petite variation dans la séquence des deux protéines implique une modification conformationnelle importante qui conduit à un élargissement notable du sillon de la cavité du site actif. Cette caractéristique structurale peut remettre en cause l'implication directe, telle qu'elle a été proposée pour nDsbD_{E.coli}, du groupement carboxyle du résidu conservé Asp68 dans le mécanisme catalytique. En effet, chez *Neisseria meningitidis*, Asp68 semble trop éloigné du groupement hydroxyle du résidu relais Tyr42 pour fournir une assistance à l'arrachement du proton de Cys103.

Les propriétés dynamiques du site actif ont été analysées avec attention puisque la flexibilité de cette région, de par son encombrement, peut être considérée comme une condition préalable pour un bon fonctionnement de l'enzyme. La mobilité concerne notamment les résidus Gly63, Glu65, Lys66, Glu67, Asp68 et Arg73 situés dans la région formée par les brins β_6 et β_7 . Le résidu Phe70 ne présente pas de terme dynamique remarquable ce qui est en accord avec son rôle de protection des résidus du site actif dans l'état non lié de la protéine. Une certaine mobilité est aussi mise en évidence dans le coude Gln43-Ile46. Tous ces mouvements peuvent faciliter l'adaptation du substrat lors de son étape de fixation. Les structures de complexes covalents impliquant nDsbD_{E.coli} et ses partenaires périplasmiques montrent en effet le réarrangement spatial de cette zone et notamment l'ouverture de la « cap-loop ». Nous proposons ainsi que ce soit ces propriétés dynamiques qui dirigent l'ouverture de la région « couvercle » et non pas la rupture de l'interaction de type S- π qui existe entre Phe70 et le pont disulfure de nDsbD_{E.coli} (puisque cette interaction n'existe pas dans la structure en solution de nDsbD_{C103S}). Comme le réarrangement conformationnel de nDsbD est comparable dans chacun des trois complexes résolus par diffraction des RX (et impliquant des partenaires périplasmiques aussi bien en amont qu'en aval des voies dans lesquelles est impliquée nDsbD), nous proposons que les propriétés dynamiques de la forme oxydée de nDsbD de *Neisseria meningitidis* soient similaires à celle de sa forme réduite (ou de sa représentante nDsbD_{C103S}). Ainsi, quel que soit l'état rédox de la protéine, l'ouverture de la « cap-loop » doit nécessairement être imposée par l'interaction avec un partenaire spécifique. Ces changements conformationnels doivent être d'une envergure telle que le pKa de Cys109 (d'une valeur de 8,5 pour l'état non lié de la protéine) soit abaissé significativement, condition nécessaire pour lui permettre de réaliser une attaque nucléophile.

L'analyse structurale et dynamique fine de nDsbD_{C103S} a permis de mettre en évidence d'autres zones d'intérêt que celle du site actif :

- la face externe du brin β_{12} de nDsbD_{C103S} présente un potentiel électrostatique négatif. Elle coïncide, d'après la structure RX d'un complexe covalent entre nDsbD_{E.coli} et DsbC, avec la surface d'interaction du second monomère de DsbC. La légère flexibilité observée tout le long de ce brin pourrait aider à le proposer comme une zone potentielle d'interaction de nDsbD de *Neisseria meningitidis* avec un partenaire biologique.

- la partie opposée au site actif est particulièrement riche en mouvements. Contrairement à ce qui est observé dans nDsbD_{E.coli}, cette région ne forme pas de feuillet β mais des boucles et ce, sans

ambiguïté. Flexibilité et rmsd semblent liées à cet endroit, notamment pour la boucle Ala88-Pro93bis. Cette dernière est constituée principalement de résidus hydrophobes et nous pensons qu'elle possède ainsi les caractéristiques d'adaptabilité nécessaires à une fonction de reconnaissance du domaine transmembranaire de DsbD de *Neisseria meningitidis*.

III.4. Publication

Pour plus de détails sur l'analyse structurale et dynamique par RMN de nDsbD_{C103S}, l'article de *Biochemistry* est disponible dans sa totalité ci-après.

Solution Structure and Backbone Dynamics of the Cysteine 103 to Serine Mutant of the N-Terminal Domain of DsbD from *Neisseria meningitidis*^{†,‡}

Marc Quinternet,[§] Pascale Tsan,[§] Laure Selme,^{||} Chrystel Beaufiles,[§] Christophe Jacob,^{||} Sandrine Boschi-Muller,^{||} Marie-Christine Averlant-Petit,[§] Guy Branlant,^{*,||} and Manh-Thong Cung^{*,§}

Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire, UMR 7568 CNRS-INPL, Nancy Université, 1 rue Grandville, B.P. 20451, 54001 Nancy cedex, France, and Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, UMR 7567 CNRS-UHP, Nancy Université, Faculté des Sciences et Techniques, Bld des Aiguillettes, B.P. 239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Received July 17, 2008; Revised Manuscript Received September 22, 2008

ABSTRACT: The DsbD protein is essential for electron transfer from the cytoplasm to the periplasm of Gram-negative bacteria. Its N-terminal domain dispatches electrons coming from cytoplasmic thioredoxin (Trx), *via* its central transmembrane and C-terminal domains, to its periplasmic partners: DsbC, DsbE/CcmG, and DsbG. Previous structural studies described the latter proteins as Trx-like folds possessing a characteristic C-X-X-C motif able to generate a disulfide bond upon oxidation. The *Escherichia coli* nDsbD displays an immunoglobulin-like fold in which two cysteine residues (Cys103 and Cys109) allow a disulfide bond exchange with its biological partners. We have determined the structure in solution and the backbone dynamics of the C103S mutant of the N-terminal domain of DsbD from *Neisseria meningitidis*. Our results highlight significant structural changes concerning the β -sheets and the local topology of the active site compared with the oxidized form of the *E. coli* nDsbD. The structure reveals a “cap loop” covering the active site, similar to the oxidized *E. coli* nDsbD X-ray structure. However, regions featuring enhanced mobility were observed both near to and distant from the active site, revealing a capacity of structural adjustments in the active site and in putative interaction areas with nDsbD biological partners. Results are discussed in terms of functional consequences.

The DsbD¹ protein is a transmembrane transporter of two electrons from the cytoplasm to the periplasm of Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli*. DsbD is composed of three domains, all possessing two essential cysteine residues: the C- and the N-terminal domains (cDsbD and nDsbD) lie in the periplasm, whereas the third central transmembrane domain (tDsbD) is embedded in the inner membrane (1–6). The mechanism by which the electrons

are transferred is composed of three steps involving each of the three domains: electrons are first transferred (i) from the cytoplasmic thioredoxin (Trx) to tDsbD, (ii) then from tDsbD to cDsbD, and (iii) finally from cDsbD to nDsbD (7–11). The nDsbD directs the electron flow either toward the cytochrome *c* biogenesis pathway, *via* the protein DsbE/CcmG, or toward the protein DsbC involved in the disulfide isomerization and in the chaperoning system (12–14). Moreover, it has been shown that *E. coli* nDsbD could also interact with the protein DsbG the function of which is unknown so far (15). All the electron transfers are mediated through disulfide bond protein exchanges between reduced and oxidized forms.

A few years ago, the structure of the oxidized form of the *E. coli* nDsbD was determined by X-ray crystallography (4). It displays a particular hydrophobic active site in which active cysteines (Cys103 and Cys109) are covered by a “cap loop” region (residues Asp68–Gly72) that protects them from the environment and blocks the active site from accessibility. Therefore, a structural displacement of the cap from the active site has to occur prior to reduction of the disulfide of nDsbD by cDsbD (16). An X-ray structural study of the mixed disulfide complex between these two partners has permitted insight to the opening of the cap concomitant to a significant repositioning of Phe70. Further, the inspection of X-ray structures of other mixed disulfide complexes involving, on one hand, *E. coli* nDsbD and, on the other hand, downstream partners DsbE/CcmG or DsbC has also shown the opening of the cap and the changeover of Phe70

[†] This research was supported by the CNRS, the Universities of Nancy I and INPL, and the IFR 111 Bioingénierie. M.Q. and L.S. gratefully thank the French Ministry of Research, the CNRS, and the Région Lorraine for financial support.

[‡] The ¹H, ¹³C, and ¹⁵N chemical shifts for nDsbD_{C103S} have been deposited in the BioMagResBank (<http://www.bmrb.wisc.edu>) under BMRB accession number 15627 and the ensemble of 20 NMR representative structures of nDsbD_{C103S} has been deposited in the RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org/pdb) under access code 2k0r.

* To whom correspondence should be addressed, M.-T.C.: phone, (33) 3 83 17 51 07; fax, (33) 3 83 37 99 77; e-mail: Manh-Thong.Cung@ensic.inpl-nancy.fr. G.B.: phone: (33) 3 83 68 43 04; fax, (33) 3 83 68 43 07; e-mail: guy.branlant@maem.uhp-nancy.fr.

[§] Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire.

^{||} Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire.

¹ Abbreviations: CcmG, Cytochrome *c* maturation protein from *E. coli*; Dsb, disulfide-bond formation (DsbA, DsbC, DsbD, DsbE, DsbG); DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; HSQC, heteronuclear single quantum coherence; IPTG, isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside; NMR, nuclear magnetic resonance; NOE, nuclear Overhauser effect; NOESY, NOE spectroscopy; ORF, open reading frame; PCR, polymerase chain reaction; PilB, type IV pilus assembly protein from *Neisseria meningitidis*; rms, root-mean-square; rmsd, rms deviation; SDS–PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; Trx, thioredoxin; TSP-*d4*, (trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-*d4* acid sodium salt.

(17). No 3D structure of the reduced form of the nDsbD has been described so far. Moreover, all of the structures of *E. coli* nDsbD (i.e., the oxidized form and the structures in covalent complexes with its biological partners) were determined by X-ray technique, which does not allow characterization of internal motions of a protein.

Recently, it has been shown that *E. coli* nDsbD is able to reduce *in vitro* the oxidized form of the N-terminal domain of PilB from *Neisseria gonorrhoeae*, which belongs to the DsbE structural family (18). Furthermore, in addition to these qualitative data, nDsbD from *Neisseria meningitidis* was recently isolated by our group and was shown to efficiently reduce the N-terminal domain of PilB from *Neisseria meningitidis* (k_2 value of $6.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, unpublished results).

In the present work, we have resolved the 3D structure in solution and backbone dynamics of the reduced form of nDsbD from *Neisseria meningitidis* using NMR spectroscopy. In fact, it is the C103S nDsbD (nDsbD_{C103S}), which has been studied with the subsequent objective to characterize the dynamic and structural factors involved in molecular recognition with biological partners. The structural and dynamic properties of nDsbD_{C103S} are discussed, especially for the active site and regions putatively involved in interaction, in terms of functional consequences.

MATERIALS AND METHODS

Sample Preparation. The *E. coli* strain used for nDsbDC103S ($\Delta 19-146$) production was C41(DE3) transformed with pETnDsbDC103S plasmid. The corresponding nDsbD fragment was obtained by PCR from *dsbD* ORF (sequences of oligonucleotides not shown), using *N. meningitidis* 8013 genomic DNA, kindly provided by Pr. Nassif (INSERM U570, Paris) between the *NdeI* and the *SacI* sites of the pET20b plasmid. $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -labeled sample was prepared by growing cells in a minimal media with $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ as the sole nitrogen source and with ^{13}C -labeled glucose as the only carbon source. The nDsbD_{C103S} production was induced at an OD_{600} of 0.6 by addition of 1 mM IPTG and harvested after 16 h for the $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ protein by centrifugation, resuspended in minimal volume of buffer A (50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8.0) with 20 mM DTT, and sonicated. After fractionated precipitation at 40% and 70% ammonium sulfate saturation in buffer A, the contaminating proteins were removed by exclusion size chromatography on ACA54 gel (IBF) equilibrated with buffer A. Purified fractions were then pooled and successively applied to a Q-Sepharose column equilibrated with buffer A, followed by a linear gradient from 0 to 0.4 M KCl (nDsbD_{C103S} was eluted at 100 mM KCl) and a Phenyl-Sepharose column equilibrated with buffer A containing 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, followed by a linear gradient from 1 to 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in buffer A (nDsbD_{C103S} was eluted at 700 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) connected to a fast protein liquid chromatography system (Amersham Biosciences). The sample purity and molecular mass were checked by SDS-PAGE and electrospray mass spectrometry, respectively. The protein was isolated by gel filtration on Econo-Pac 10 DG Column (Bio-Rad laboratory) equilibrated with 20 mM phosphate buffer, pH 7.0. The NMR sample contained 0.5 mM $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ protein concentration (90% H_2O , 10% D_2O) in 20 mM phosphate buffer at pH 7.0.

NMR Spectroscopy. All spectra were acquired at 298 K on a Bruker DRX 600 MHz spectrometer equipped with a TCI cryoprobe. Spectra were processed using the program XWINNMR (Bruker) and analyzed with the program CARI (19). TSP- d_4 (Euriso-top) was used as an internal reference for ^1H chemical shift, whereas indirect referencing was used for ^{13}C and ^{15}N chemical shifts (20). Backbone amide ^1HN , ^{15}N , $^{13}\text{C}^\alpha$, $^1\text{H}^\alpha$, and $^{13}\text{C}'$ and side-chain ^1H and ^{13}C resonances were assigned using $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC, HNCO, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, CBCA(CO)NH, and HNHA experiments. HNHB, HCCH-TOCSY, CC(CO)NH, and $^1\text{H}-^{15}\text{N}, ^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC-NOESY spectra at two different mixing times (70 and 100 ms) were also performed for side-chain assignments. The slow amide proton exchange in D_2O solution (21) and temperature-dependence at five different temperatures (287, 291, 296, 298 and 305 K) (22) and the long-range HNCO experiment were used to determine the hydrogen-bond pattern of the protein (23).

Structure Calculations. Interproton distance restraints were derived from two-dimensional $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ NOESY experiment and three-dimensional $^1\text{H}-^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ HSQC-NOESY experiments. First, ATNOS/CANDID program was used to obtain, after seven cycles, an initial set of restraints (24, 25). Second, the NOE cross-peak assignments and intensities were checked visually, and the restraint set was refined. Restraints for the pseudoatoms were systematically overestimated. The occurrence of a hydrogen bond was defined as a couple of distance restraints with an upper limit of 2.0 Å (up to 2.4 Å in a few cases) between the acceptor heavy atom and the hydrogen atom and an upper limit of 3.0 Å (up to 3.3 Å in a few cases) between the acceptor and donor heavy atoms. Torsion restraints for the Φ and Ψ angles were derived from the program TALOS (26), and all the peptide bonds were kept planar and *trans*.

A total of 1500 randomized structures were calculated, and a simulated annealing process was performed using the program CYANA (27). The 20 structures with the lowest target function were selected and refined using DISCOVER (Accelrys Inc., San Diego, CA). Figures were drawn with the program MOLMOL (28).

^{15}N Relaxation Experiments. The ^{15}N longitudinal relaxation rate (R_1), ^{15}N transverse relaxation rate (R_2), and steady-state $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ heteronuclear NOE experiments were recorded at 298 K on a Bruker 600 MHz spectrometer, using the usual pulse sequences (29). A total of 256 (^{15}N) and 2048 (^1H) complex points were collected for the R_1 and R_2 experiments, with eight transients per increment and a recycle delay of 5 s. Ten inversion recovery delays of 2, 50, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000, and 1200 ms were used for R_1 measurement, whereas eight delays of 8, 16, 32, 48, 64, 80, 112, and 144 ms were used during the CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) period of the R_2 experiments. $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ NOE spectra were recorded in an interleaved way with and without proton saturation during relaxation delay, using 256×2 (^{15}N) and 2048 (^1H) complex points and 56 transients per increment typically. The ^1H saturation was achieved by the application of 120° ^1H pulses separated by 5 ms for a period of 4 s. Spectral widths for all heteronuclear experiments were 2433 Hz (^{15}N) and 8389 Hz (^1H) with carrier frequencies at 117.6 and 4.70 ppm, respectively. Data were processed using XWINNMR (Bruk-

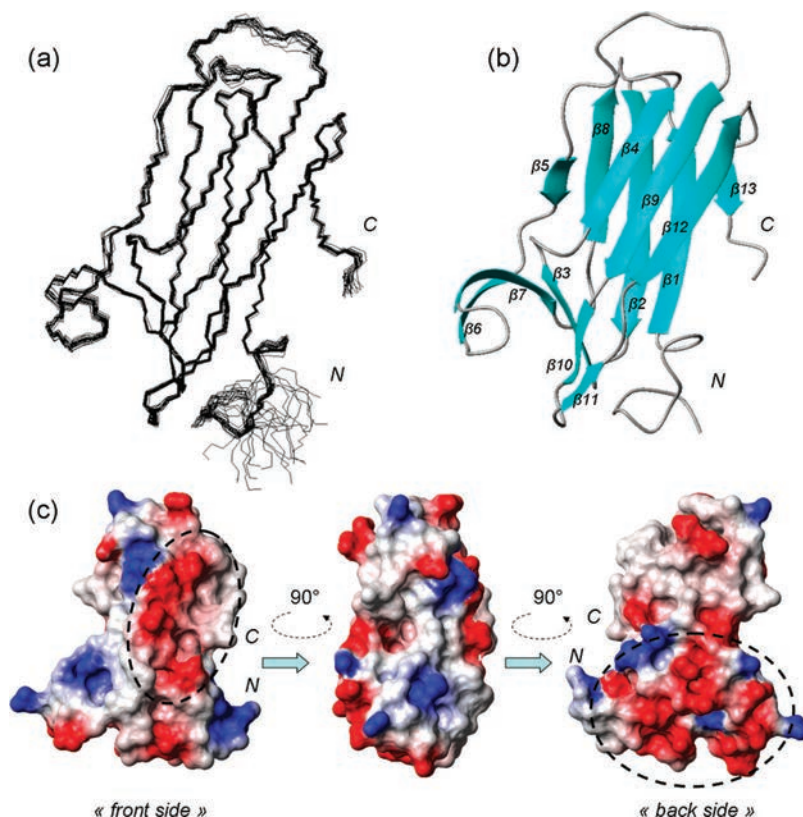


FIGURE 1: Solution structure of nDsbD_{C103S}: (a) backbone superimpositions from Asn9 to Tyr125 are shown for the 20 representative structures; (b) the different secondary structure elements are figured on the mean structure; (c) the electrostatic potential is represented on three different spatial orientations of nDsbD_{C103S} NMR mean structure using blue (for positive potential), red (for negative potential), and white (for neutral potential) color graduations.

er). They were zero-filled in the ¹⁵N dimension and apodized with a shifted square sine-bell window in both dimensions.

Backbone Dynamics Analysis. NMRVIEW software (30), version 6.6.2, was used to measure the peak heights of the ¹⁵N–¹H cross-peaks and to determine the R_1 and R_2 values from a fit to a single-exponential decay function and also the $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ heteronuclear NOE from the ratio between the intensities of a peak in the spectra collected with and without proton saturation. All experiments were performed twice to provide an estimation of the uncertainty on R_1 , R_2 , and NOE values.

R_1 , R_2 , and NOE relaxation parameters were analyzed by means of reduced spectral density mapping at $J_{\text{eff}}(0)$, $J(\omega_N)$, and $\langle J(\omega_H) \rangle$ values (31–34) using a chemical shift anisotropy of -160 ppm for the backbone amide group (35) and a NH bond length of 1.02 Å. $J_{\text{eff}}(0)$ denotes that the exchange contribution to R_2 is not explicitly considered (36). $\langle J(\omega_H) \rangle$ is the average of $J(\omega_H)$, $J(\omega_H + \omega_N)$, and $J(\omega_H - \omega_N)$, which can be approximated by $J(0.87\omega_H)$ (31). Tensor2 (37) was used for the Lipari–Szabo analysis (38, 39) of the backbone ¹⁵N relaxation parameters. Only residues in secondary structure elements were used for determination of the overall tumbling.

RESULTS

Structure Calculations of nDsbD_{C103S}. nDsbD_{C103S} has been studied in a soluble state ranging from Met4 to Thr129, the numbering following that of the N-terminal domain of DsbD from *E. coli*. The chemical shift assignments have been previously reported (40). A nearly complete assignment of

the backbone and of the side chains has been realized except for Ala5, Leu6, Pro13, and Pro111. Superimposition of ¹H–¹⁵N HSQC spectra of the C103S mutant with the wild-type *N. meningitidis* nDsbD does not display major chemical shift variations of backbone amide groups, except for some residues in the vicinity of S103; this observation suggests that the mutant and wild-type proteins exhibit the same structural features (see Supporting Information, Figure S1). Moreover, no significant chemical shift perturbation is observed for C^α and C^β atoms of all the residues, except of course, for the residue 103 (data not shown).

The NMR solution structure of nDsbD_{C103S} was calculated using NOE-derived restraints, backbone dihedral angle restraints derived from TALOS prediction (26), and hydrogen bond restraints obtained from the long-range HNCOC experiment (23). The superimposition of the 20 representative structures for nDsbD_{C103S} is shown in Figure 1a, and the structural statistics are summarized in Table 1. Only two restraint violations greater than 0.3 Å have been observed. According to PROCHECK-NMR analysis (41), 79.0% of the nonglycine and the nonproline residues remain in the most favored regions of the Ramachandran plot, whereas 15.2% and 4.8% of the whole residues are, respectively, in the additionally allowed and generously allowed regions. Only 1% of the residues (Lys62) is located in disallowed regions. Moreover, the fine packing quality control analysis, performed with WHAT IF (42) using the most representative structure of nDsbD_{C103S}, identifies this structure as a good one (WHAT IF Z-score for all contacts of -1.34). Considering the sequence from Asn9 up to Tyr125, the final 20

Table 1: NMR-Derived Geometrical Restraints and Structural Statistics of the Entire Conformational Set of nDsbD_{C103S}

restraint	number
upper interproton	
total of distance restraints	2059
intra	350
short	641
medium	227
long distance	751
H-bonds ^a	90
dihedral angle	154
ϕ	66
ψ	69
violation	occurrence
distance violation >0.3 Å	2
dihedral violation >5°	0
Ramachandran statistics (PROCHECK-NMR)	
residues in the most favorable region (%)	79.0
residues in additionally allowed regions (%)	15.2
residues in generously allowed regions (%)	4.8
residues in disallowed regions (%)	1.0
Fine packing quality control (WHAT IF) ^b	
Z-score for all contacts	-1.34
atoms (residues 9–125)	rmsd (Å)
backbone	0.43 ± 0.09
heavy	1.10 ± 0.12

^a Each hydrogen bond is treated as two distance restraints so that 45 hydrogen bonds lead to 90 distance restraints. ^b The analysis has been performed using the most representative structure of nDsbD_{C103S}

calculated structures exhibit an atomic rmsd from the mean structure of 0.43 ± 0.09 Å for the backbone atoms and 1.10 ± 0.12 Å for all heavy atoms. In parallel to atomic rmsd, all Φ and Ψ dihedral angles are well-defined with low standard deviations except the Met4–Leu11, Ala52–Asp53, Ser61–Glu64, and Ala88–Glu93 sequences for which significant standard deviation values are observed and are indicative of less-defined structural parts.

Structure Analysis of nDsdD_{C103S}. The core of the protein exhibits mainly three β -sheets, all composed of antiparallel individual strands (Figure 1b). The first β -sheet comprises five strands from Phe18 to Val24 for β_1 , Gly28 to Ile35 for β_2 , Ser59 to Phe60 for β_5 , Glu80 to Pro86 for β_8 , and Thr124 to Tyr125 for β_{13} . The second β -sheet comprises five strands from Tyr39 to Tyr42 for β_3 , Glu64 to Glu67 for β_6 , Arg73 to Tyr77 for β_7 , Gly102 to Ala104 for β_{10} and Val108 to Cys109 for β_{11} . The third β -sheet comprises three strands from Val47 to Asn50 for β_4 , Tyr94 to Tyr100 for β_9 , and Val113 to Ile119 for β_{12} . All these β -strands are clearly well-defined as proven by a weak backbone rmsd value of 0.27 ± 0.07 Å on β -stranded secondary structures. According to NOE restraint data, one α -helix turn seems possible from Pro14 to Ala17. Globally, only the N-terminal region, from Met4 to Ala8, is largely disordered in all 20 NMR structures due to the partial chemical shift assignment and the lack of NOE restraints.

As investigated on DALI (43) and VAST (44) servers, the fold adopted by nDsbD_{C103S} is part of the immunoglobulin superfamily. Two main features characterize the structure adopted by this protein in solution: the first and the third β -sheets are arranged in a β -sandwich, while the second

β -sheet forms a partial β -barrel. More precisely, the β -sandwich is mainly formed by strands β_1 , β_2 , and β_8 on one hand and strands β_4 , β_9 , and β_{12} on the other hand. It is flanked by strands β_5 and β_{13} , which are, respectively, hydrogen bonded to strands β_8 and β_1 (Figure 1b). These hydrogen bonds were highlighted by the NMR HNC0 long-range experiment. The partial β -barrel contains the active site (Figure 2a). Indeed, Ser103 (equivalent to *E. coli* Cys103) and Cys109 are, respectively, located on strands β_{10} and β_{11} , and both side chains point toward the inner cavity of the partial β -barrel. More precisely, side chains of Tyr40, Tyr42, and Phe70 point toward Ser103 and Cys109, the conformation of aromatic rings being well-defined in all 20 NMR structures. Besides, the cavity of the partial β -barrel contains four aromatic side chains, thus endowing the active site with a particularly hydrophobic environment, enhanced by the side chain of Val76. Moreover, the aromatic rings of Tyr39 and Tyr110 lie on the external face of the partial β -barrel and cover the backbone atoms of Ser103 and Cys109, the residues Ala104, Ala106, and Val108 enhancing the hydrophobicity of this external face. All of these features give the inner active site a particular hydrophobic character.

The electrostatic potential of nDsbD_{C103S} surface has been calculated and figured using MOLMOL (28). As far as the “back side” of nDsbD_{C103S} (see Figure 1c for spatial orientation) is considered, it points out that potential charges are spread over the surface of strand β_6 and surrounding residues. Indeed, the potential charges of Asp37 and Glu105 permit definition of a remarkable negatively charged side of the nDsbD_{C103S} active site. The same phenomenon is observed on the “front side” along strand β_{12} . In contrast, the surface of the region opposite to the active site is globally less charged.

Reduced Spectral Density Mapping and Model-Free Analysis. The ¹⁵N longitudinal relaxation rate (R_1), ¹⁵N transverse relaxation rate (R_2), and steady-state ¹H–¹⁵N heteronuclear NOE values of nDsbD_{C103S} were measured for 107 backbone NH groups out of the 118 nonproline residues, (Figure 3a–c). The unanalyzed residues either were unassigned or overlapped. The average values for the backbone ¹⁵N-nuclei are: $\langle R_1 \rangle = 1.51 \pm 0.04$ s⁻¹; $\langle R_2 \rangle = 9.41 \pm 0.31$ s⁻¹; $\langle \text{NOE} \rangle = 0.74 \pm 0.01$ s⁻¹. The relaxation parameters plotted versus the protein sequence globally display a nonlinear profile. For instance, a sharp drop of all three parameters is found within the N- and C-termini, around Val91, and here and there along the sequence.

Reduced spectral density mapping, which does not require any model, was used first to analyze the relaxation data. The $J_{\text{eff}}(0)$, $J(\omega_N)$, and $\langle J(\omega_H) \rangle$ obtained values are represented in Figure 3d–f. A sharp decrease of $J_{\text{eff}}(0)$ compensated for a large increase of $\langle J(\omega_H) \rangle$ observed within the N-terminus, the C-terminus, and the segment Lys89–Glu93 and for residue Gly121. This indicates the flexibility at both extremities of the protein, as well as in the β_8 – β_9 loop and for Gly121. Residues Glu15, Gln43, Ala44, Gly63, and Val108 exhibit relatively high $J_{\text{eff}}(0)$ values, while their $J(\omega_N)$ and $\langle J(\omega_H) \rangle$ values are not lower than the average, which suggests the contribution of microsecond–millisecond time scale chemical exchange. $J(\omega_N)$ values do not vary much along the sequence, indicating proximity to the isobestic frequency, where the contribution of $J(\omega)$ is independent of the internal mobility (46).

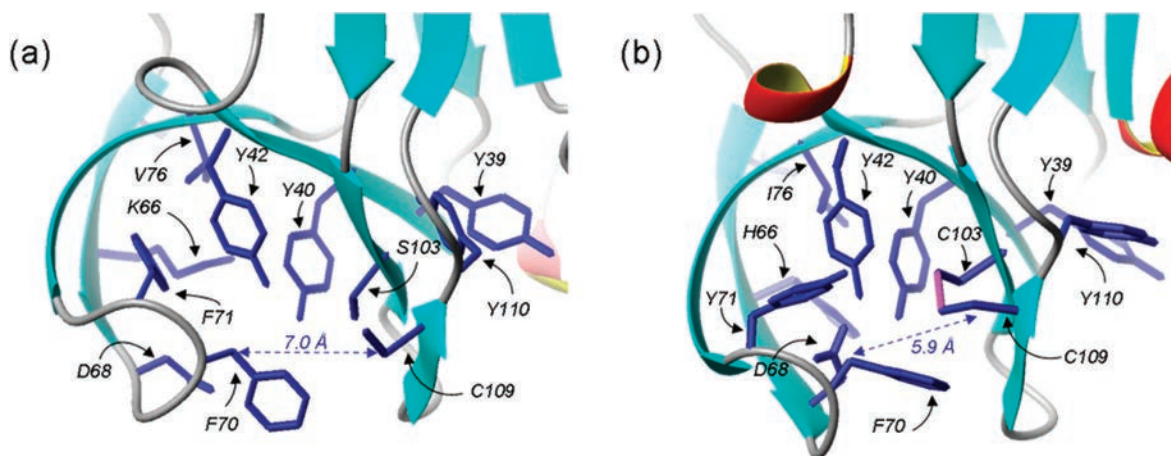


FIGURE 2: Active site of the most representative NMR solution structure of *N. meningitidis* nDsbD_{C103S} (a) and X-ray oxidized structure of *E. coli* nDsbD (b). Only heavy atoms are represented for the side chains. The disulfide bond in *E. coli* nDsbD X-ray structure is figured in purple. The distance between C^β atoms of residues Phe70 and Cys109 is indicated with dashed arrows.

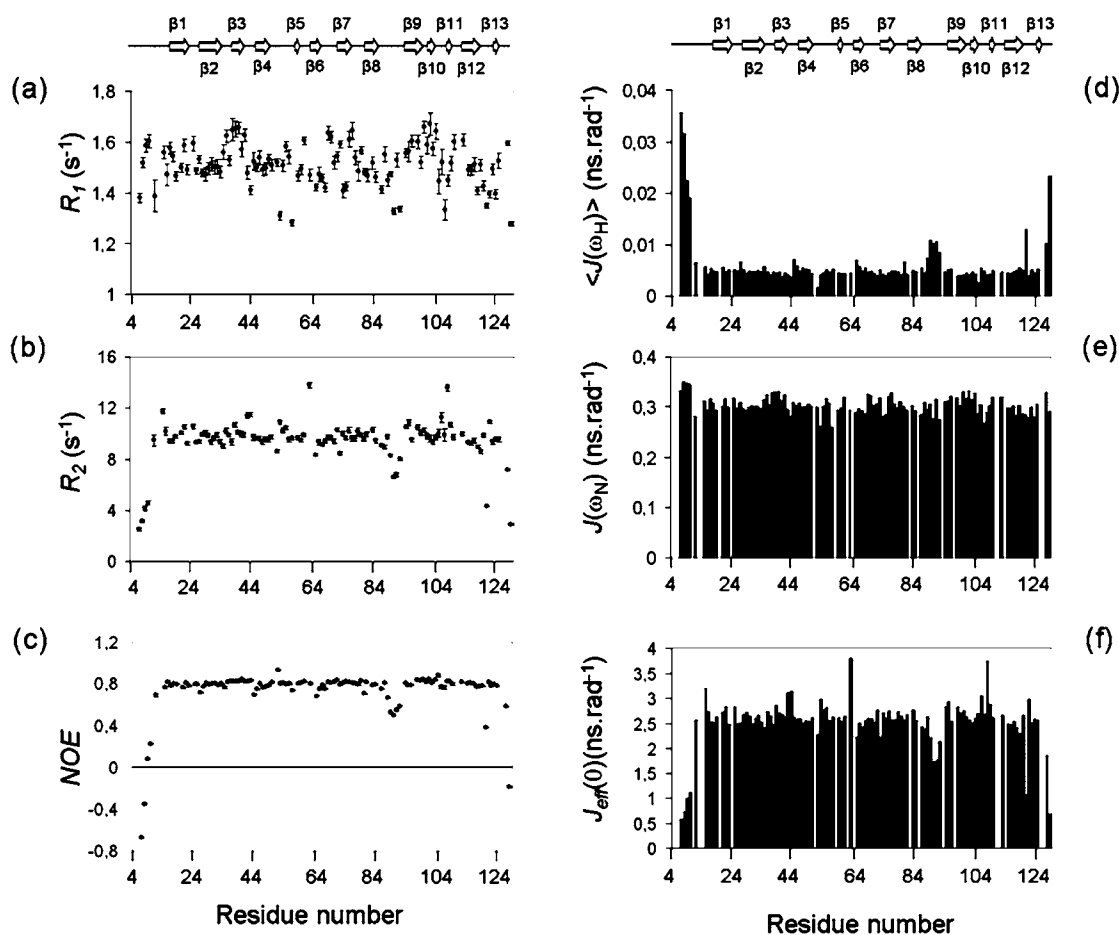


FIGURE 3: ¹⁵N longitudinal relaxation rates, R_1 (a), ¹⁵N transverse relaxation rates, R_2 (b), and steady-state $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ heteronuclear NOE values (c) of nDsbD_{C103S} are plotted versus the amino acid sequence. Reduced spectral density functions of nDsbD_{C103S}, $\langle J(\omega_H) \rangle$ (d), $J(\omega_N)$ (e), and $J_{\text{eff}}(0)$ (f), are also shown. Experiments were recorded on a Bruker DRX 600 MHz at pH 7.00, 25 °C. The secondary structure elements extracted from the mean structure are shown at the top.

To get a detailed picture of the global and internal dynamics of nDsbD_{C103S}, the relaxation parameters were analyzed with a Lipari–Szabo approach (38, 39) by means of the Tensor2 software (37) and using the mean NMR structure. The R_2/R_1 ratios of the residues involved in secondary structures were used to determine the rotational diffusion tensor describing the overall tumbling of the protein. The principal components obtained are $D_x = 1.95 \times 10^7$, $D_y = 2.14 \times 10^7$, and $D_z = 2.57 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$, which

gives a global correlation time of 7.38 ns, in agreement with a monomeric state. Besides, the direction of the principal axes, as well as the axial anisotropy ($2D_z/(D_x + D_y) = 1.26$) and the rhombicity ($D_x/D_y = 0.91$), are in agreement with the inertia tensor of the nDsbD_{C103S} structure (see Figure 4).

The results for the internal mobility are represented in Figure 5. The mean and median order parameters S^2 are respectively 0.81 and 0.86. As generally observed in proteins, the N- and C-terminal extremities of nDsbD_{C103S} show fast

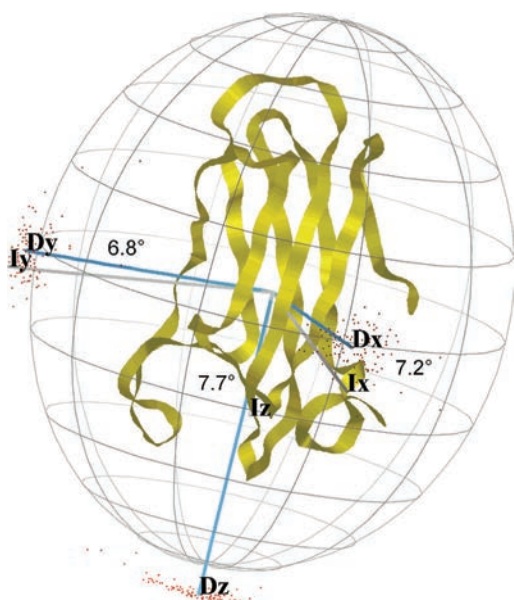


FIGURE 4: Representation of the principal axes D_x , D_y , and D_z of the diffusion tensor (blue) and of the principal axes I_x , I_y , and I_z of the inertia tensor (gray) on the nDsbD_{C103S} mean structure. The dispersion of the diffusion tensor axes, as determined by 100 Monte Carlo simulations, are reported using a scatter plot. The angle values between the respective axes of the diffusion tensor and of the inertia tensor are reported, and the N- and C-terminal regions are indicated. The figure has been generated by Tensor2 (37).

motions of large amplitude, as depicted by weak S^2 , associated here to internal correlation times $\tau_i < 0.1$ ns or $\tau_i > 0.1$ ns, and by high $\langle J(\omega_H) \rangle$ values. This can be related to the high backbone rmsd values observed in these segments (Figure 5a). Likewise, the region Ala90–Glu93, which lies at the opposite side of the active site and which is also less-defined in the NMR structure, displays similar striking dynamic features. Mobility is observed in the surrounding loops Ala25–Asp27 and Phe120–Gly123 too, as reflected by a weak S^2 , the presence of τ_i or that of chemical exchange. Chemical exchange is indeed highlighted by high R_{ex} term and $J_{eff}(0)$ values for residues Phe120 and Asn122, as well as for Glu15, Gln43, Ala44, Asp53, Gln57, Gly63, Tyr94, and Val108. It can be noticed that some particular residues, located in secondary structures, display interesting dynamics parameters notably in the region of strands β_6 and β_7 , even if their backbone rmsd is low. More precisely, Gly63, Glu65, Lys66, Glu67, Asp68, and Arg73, as well as the bend Gln43–Ile46, show particular profiles of reduced spectral density mapping and possess particular S^2 , τ_i , or R_{ex} terms (deviating at least from one standard deviation around the median value calculated on residues belonging to the core of the protein).

DISCUSSION

nDsbD_{C103S} Global Topology. *N. meningitidis* nDsbD_{C103S} displays an immunoglobulin-like fold comprising first a β -sandwich and second an active site shaped as a partial β -barrel. DALI and VAST investigations list *E. coli* nDsbD as the best structural homologue to nDsbD_{C103S}. The amino acid sequence alignment shows that they share 26% sequence identity and that several residues surrounding the active site are conserved (Figure 6a). As expected, strong structural similarity is then observed with the oxidized *E. coli* nDsbD

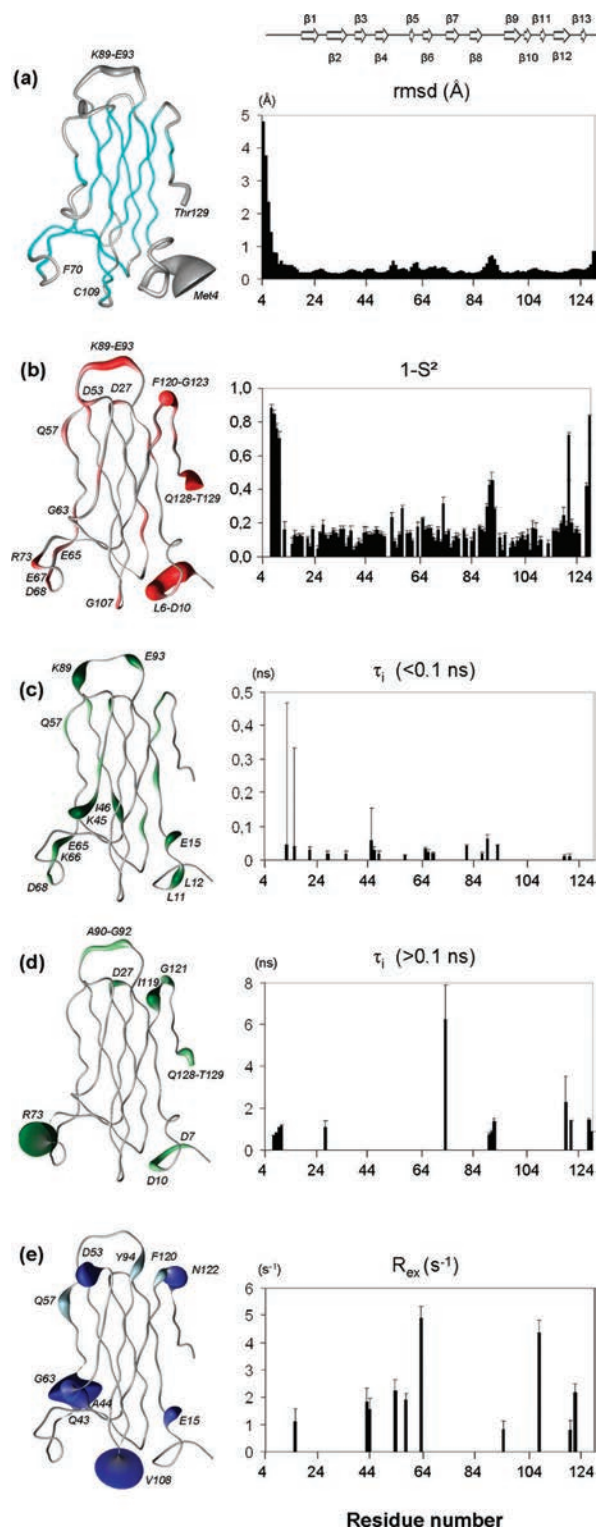


FIGURE 5: Backbone rmsd and model-free internal mobility parameters of nDsbD_{C103S}: (a) backbone rmsd; (b) order parameter S^2 ; (c) slow (>0.1 ns) and (d) fast (<0.1 ns) internal correlation time τ_i ; (e) exchange term R_{ex} versus the amino acid sequence. All these parameters are plotted versus the amino-acid sequence and are also shown on the mean structure with the following rules: for panel a, the width of the spline is proportional to rmsd value and blue color is used to indicate secondary structure elements; for panels b–e, the width of the spline and the color intensity are proportional to the values on the graphical representation; for high values, the proportionality factor with the width of the spline has been decreased to avoid plot overloading. Some particular residues have been reported on the structure to facilitate the reading of the schemes. The secondary structure elements extracted from the mean structure are shown at the top.

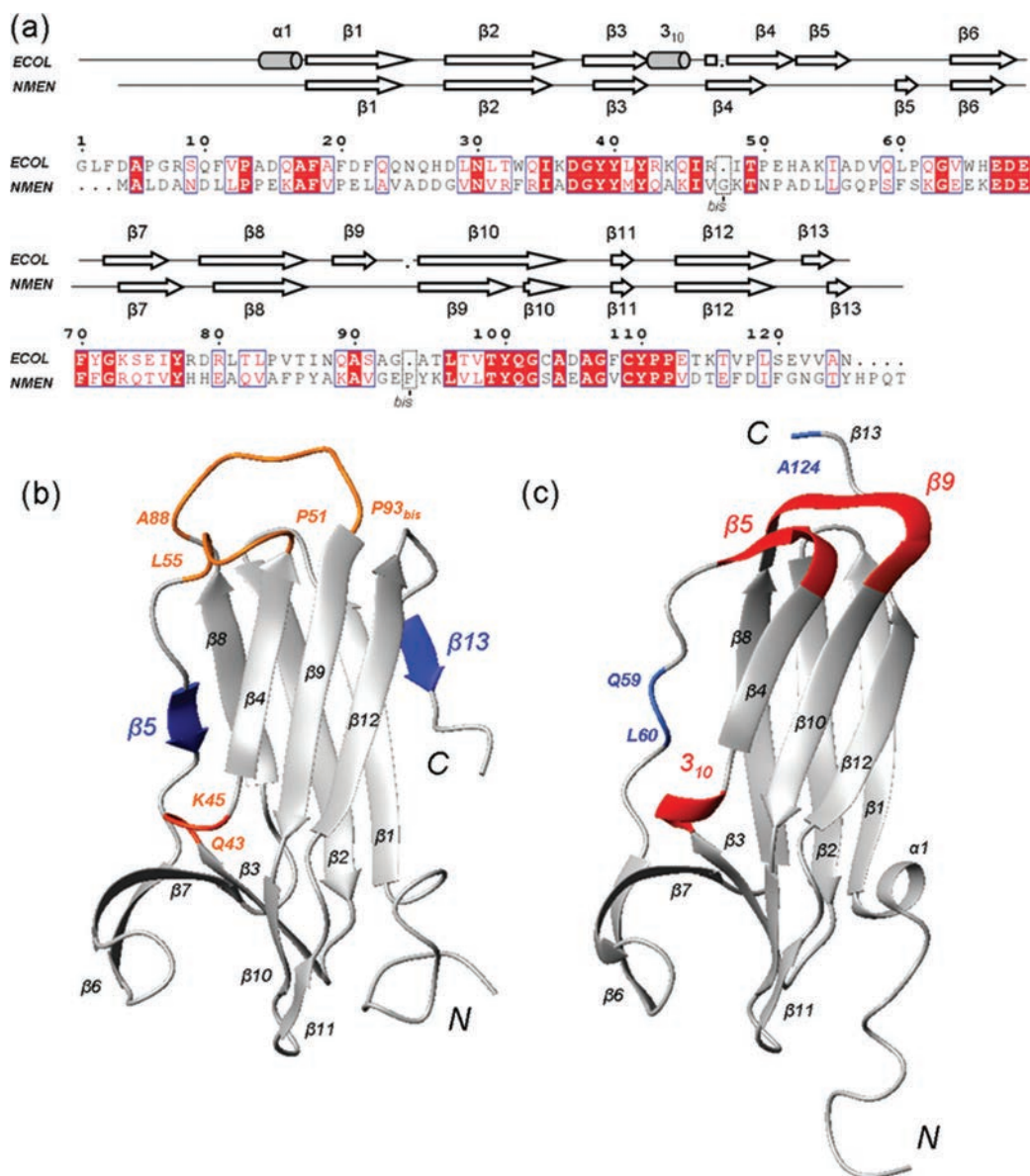


FIGURE 6: Alignment of amino acid sequence and secondary structures between *E. coli* nDsbD and *N. meningitidis* nDsbD_{C103S} (a). The numbering follows that of *E. coli* nDsbD, and the two insertions have been reported as residues Gly47_{bis} and Pro93_{bis}. The figure was prepared with help of *ESPrift* (48). Secondary structure numbering of *E. coli* nDsbD was reported according to Goulding et al. (4). Comparison between nDsbD_{C103S} NMR solution structure (b) and *E. coli* nDsbD X-ray structure (c). The PDB access number 1L6P was used for *E. coli* nDsbD structure. Divergent secondary structure elements are, respectively, colored in blue and red on nDsbD_{C103S} and *E. coli* nDsbD structures. Absence of clear secondary structures on one or the other, structure is highlighted with clearer colors. The figures were prepared with MOLMOL using default setting for secondary structures display (28).

X-ray structure (PDB access code 1l6p and 1jpe) (4), the unique structure available for an unliganded state of this N-terminal domain. However, several differences, notably in the secondary structures, can be highlighted. First of all, obvious indications of conformational changes are highlighted by the high difference of the Φ and Ψ dihedral angle values comparing the well-defined parts of the *N. meningitidis* nDsbD_{C103S} NMR structure with those of the *E. coli* nDsbD X-ray structure (Figure 7). Significant changes are observed essentially for the segments between the different strands and, also to a lesser degree, for some residues inside the $\beta 1$, $\beta 8$, $\beta 9$, and $\beta 10$ strands in nDsbD_{C103S}. This leads to slight untwisting of the β -sandwich in nDsbD_{C103S}. A few minor differences can be underlined such as the length of the strands $\beta 1$, $\beta 6$, and $\beta 7$, one residue shorter than their equivalents in *E. coli* nDsbD. Besides, the segment Gln43–Ile46 does not form a 3_{10} -helix but only a bend,

which is consistent with the presence of exchange terms R_{ex} and fast τ_i in this segment, since no secondary structure is observed. More importantly, several striking changes appear clearly in the composition of the β -sheets (Figure 6b,c). First, the first β -sheet of nDsbD is made up of three β -strands ($\beta 1$, $\beta 2$, and $\beta 8$) in *E. coli*, whereas it contains two short additional strands ($\beta 5$ and $\beta 13$) highlighted by long-range HNC0 and 3D NOESY-HSQC experiments in *N. meningitidis*. The presence of these two strands is supported by the observation of high order parameters, similar to those found in the other rigid β -sandwich secondary structures of nDsbD_{C103S}. This major difference with *E. coli* nDsbD is due to the presence of hydrogen bonds in nDsbD_{C103S} between Ser59-NH and Ala84-CO and Ser61-NH and Gln82-CO creating strand $\beta 5$ and hydrogen bonds between Val24-NH and Gly123-CO and Leu22-NH and Tyr125-CO creating strand $\beta 13$. Second, despite compatible backbone torsion

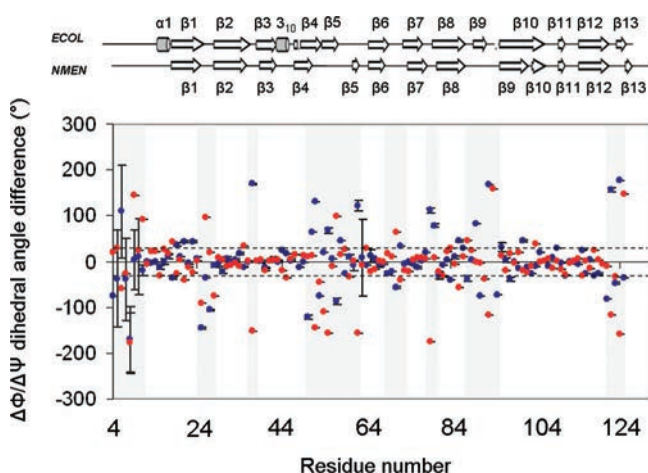


FIGURE 7: Graphical representation of the difference of Φ and Ψ dihedral angle values between the *E. coli* nDsbD X-ray structure and the *N. meningitidis* nDsbD_{C103S} NMR structure along the amino-acid sequence. The blue and the red circles represent the variation of $\Delta\Phi$ and $\Delta\Psi$, respectively. The horizontal lines at 30° and -30° delimit the regions that undergo significant Φ and Ψ dihedral angle changes. Secondary structures of the *E. coli* and *N. meningitidis* nDsbD structures are shown at the top.

angles, the segment Asp57–Gly63 in *E. coli* nDsbD X-ray structure does not display hydrogen bonds permitting the formation of a β -strand. In nDsbD_{C103S}, a β strand is found in this region. Third, as described by the authors, the C-terminal end of *E. coli* nDsbD is able to adopt, in the X-ray structure, a β -sheet conformation involving the *E. coli* $\beta 5$, $\beta 9$, and $\beta 13$ strands, which places this C-terminal segment on the opposite side of the N-terminus. Here, the four-residue longer C-terminal tail of nDsbD_{C103S} is completely reoriented compared with that of *E. coli* nDsbD: it forms a strand $\beta 13$ antiparallel to strand $\beta 1$ and thus comes closer to the N-terminal extremity. The mobility found in the preceding loop Phe120–Gly123 may permit this strand $\beta 13$ to move along strand $\beta 1$ and to participate to the β -sheet. These observations, done between nDsbD_{C103S} and *E. coli* nDsbD, highlight the powerful role of NMR in revealing clear structural differences across bacterial species or oxidation states.

The Active Site: A Hydrophobic Cavity Covered by a Cap Loop. As it has been observed for the oxidized *E. coli* nDsbD structure, the nDsbD_{C103S} active site contains a highly hydrophobic cavity with several aromatic residues. Likewise, the two strands $\beta 6$ and $\beta 7$ cover Ser103 and Cys109. The cleft of the partial β -barrel is thus cluttered with long side chains and access for substrates to active residues is consequently restricted. Interestingly, the so-called “cap loop” situated between strands $\beta 6$ and $\beta 7$ and more particularly the Phe70 side chain close the entrance to this cavity, like in the oxidized *E. coli* nDsbD. Therefore, the cap loop adopts a “closed position” and should possess a protective role in the reduced state too. Nevertheless, even if most of the residues forming the structure of the partial β -barrel in *E. coli* nDsbD are conserved in nDsbD_{C103S}, notably those whose side chains point toward the internal cavity, significant changes occur because of a single amino acid substitution at position 71 in the active site. Indeed, the aromatic ring of Phe71 from nDsbD_{C103S} is largely reoriented compared with its equivalent Tyr71 in *E. coli* nDsbD, which is less hydrophobic and points toward the solvent (Figure 2a,b). The

major consequence is to enlarge the internal diameter of the cavity. In nDsbD_{C103S}, the aromatic ring of Phe71 interacts in a parallel manner with that of Tyr42, interacting itself with Tyr40 and Ser103. To avoid steric congestions, this network of interactions forces the cleft of the partial β -barrel to be larger. In *E. coli* nDsbD, the aromatic ring of Tyr42 interacts with Tyr40 and Cys103 but orthogonally to that of Tyr71. The steric constraints are consequently weaker inside the cavity. That is the reason that the aromatic ring of Phe70 can move closer to Cys109, thus involving a tightening of the partial β -barrel, as depicted by the decrease of distance from 7.0 to 5.9 Å between the C β atoms of Phe70 and Cys109 compared with their equivalent residues in nDsbD_{C103S} (see Figure 2).

Role of Asp68. It had been proposed that the Tyr42 residue from *E. coli* nDsbD could mediate, instead of a water molecule, the proton transfer between Asp68 and Cys103 residues, thanks to close distances between the hydroxyl, carboxyl, and thiol groups of the latter residues (4). In the bunch of nDsbD_{C103S} NMR structures, the mean distance between the O γ from Tyr42 residue and the O γ from Ser103 residue is equal to 4.16 ± 0.21 Å. This is comparable to the distance of 3.51 Å found for the equivalent residues in *E. coli* oxidized nDsbD and compatible with the hypothesis raised by Goulding et al. (4). However a mean distance of 6.48 ± 0.66 Å is observed between the O γ from Tyr42 residue and the carboxyl group of Asp68 residue in nDsbD_{C103S}, whereas the corresponding atoms in *E. coli* nDsbD are separated by only 2.69 Å. Moreover it seems that these two residues do not display the sufficient dynamic properties to come closer. In regards to all these structural features, it is likely that the proton transfer between Asp68 and Cys103 residues in the native nDsbD from *Neisseria* genus may be orchestrated by an additional element, even if the Tyr42 residue is involved.

Dynamics in the Active Site. Dynamic properties of the active site have been analyzed more particularly in order to get insight into the enzymatic mechanism. Flexibility of the partial β -barrel should be considered as a prerequisite in the enzymatic scheme so as to cross the barrier of steric congestions inside the cavity. It has been suggested that the better reactivity of Cys109 compared with Cys103 in *E. coli* nDsbD was due to steric congestion around Cys103 (4). About this hypothesis, a large but isolated exchange term, R_{ex} , has been found for the Val108 residue neighboring Cys109 in nDsbD_{C103S}. However, its particular dynamic features could denote that this term may mainly reflect motions of aromatic side chains in the neighborhood of the Val108 NH group (45), rather than backbone conformational changes that could facilitate access to solvent. Indeed, as other residues exhibiting a significant R_{ex} term, the HN group of Val108 is close to aromatic rings, notably to that of Phe70 (and may therefore be sensitive to the variations of the ring-current effects induced by their motions). Nonetheless, it is reasonable to assume that conformational exchange can have a contribution, even minor, to all these exchange terms thus conferring some mobility to the backbone of nDsbD_{C103S}, as depicted for example by the slight decrease of S^2 term for Val108.

Since structural changes have to make the catalytic cysteine accessible to substrate and since most of the residues surrounding sequentially Cys109 do not display sufficient

mobility to expose it, it is likely that the cap loop region of nDsbD_{C103S} displays a particular dynamics profile. Actually, our dynamics study highlights significant motions, notably for Gly63, Glu65, Lys66, Glu67, Asp68, and Arg73, indicating the ability for the backbone to be flexible in the segment around Phe70 residue of nDsbD_{C103S} and therefore to adapt its conformation to the disulfide oxido-reduction partner. Consistently, the absence of motions for Phe70 in *N. meningitidis* nDsbD_{C103S} is in agreement with its protection role against nonspecific interactions with cysteine residues. The motions observed at the beginning of strand β_6 suggest that the Gly63–Glu65 segment could act as a hinge permitting the opening of the partial β -barrel and recognition of the substrates. Likewise, mobility of the Gln43–Ile46 bend could reinforce this idea by introducing potential backbone adaptability near strands β_6 and β_7 . This could explain the rearrangement observed upon complex formation in the *E. coli* nDsbD equivalent His66–Ser74 segment including Phe70 (47). Indeed, (while the position of the segment including Cys109 is hardly altered) the Asp68–Gly72 “cap loop” region acting as a closed gate is opened up as shown in the X-ray structure of the complexes with the upstream cDsbD (16) or the downstream DsbC (5) and CcmG (17).

Finally, we have shown that the cap loop adopts a “closed gate position” in the structure of nDsbD_{C103S} presenting a reduced form similar to that in the oxidized *E. coli* nDsbD. This involves that the recognition of the nDsbD reduced or oxidized forms by its partners would not rely on the cap loop conformation itself but rather on specific dynamic properties or on other structural elements. Moreover, it shows that the active cysteines are covered by this loop in both redox states, which confers to this loop a protective role, a requirement to avoid the nDsbD interacting nonspecifically. This implies that an opening of the cap must occur upon formation of a complex between nDsbD and its protein partner, in which the catalytic cysteine and the recycling one would become accessible to a reagent. The “opening of the gate” necessitates a conformational change, which could be allowed thanks to the significant motions identified in the Gly63–Arg73 segment and for the Gln43–Ile46 bend, which should consequently be observed in the oxidized form too.

Indeed, in *E. coli* oxidized nDsbD, the S– π interaction between S γ atom of Cys109 and the aromatic ring of Phe70 is described as stabilizing the disulfide bond (4). This observation suggests that this interaction indirectly maintains the closed position of the cap loop. Considering the bunch of the 20 reduced nDsbD_{C103S} structures, such S– π interaction does not exist because of an incompatible angle between the aromatic ring of Phe70 and Cys109. Yet, the cap loop is maintained closed. Therefore, the opening of the cap loop during the formation of complexes involving the reduced form of nDsbD and downstream oxidized partners CcmG (17) and DsbC (5) could not be driven by the rupture of this particular interaction but by the dynamics of the β_6 – β_7 region. We can thus assume that the opening of the cap occurring with the formation of the complex between the oxidized form of nDsbD and the upstream reduced partner cDsbD (16) is also driven by dynamic properties. Even if the rupture of the S– π interaction is required, we can legitimately think that, in the absence of relaxation data

concerning the oxidized form, the active site of the oxidized nDsbD should display similar dynamics features.

The cap displacement would necessarily be triggered by the interaction with a specific biological partner. The induced conformational change would be such that the pK_a of Cys109, which is above 8.5 in the unbound state (unpublished results), is lowered. This would consequently allow a nucleophilic attack. It is therefore important to identify the recognition elements involved in nDsbD interactions to elucidate its mechanism. Other putative interaction regions in nDsbD_{C103S} are then discussed hereafter.

Other Putative Interaction Sites with Biological Partners. An interesting region around strand β_{12} displays a large negatively charged surface, as highlighted by the electrostatic potential analysis of nDsbD_{C103S} (Figure 1c). This side of the protein corresponds to the interaction area of *E. coli* nDsbD with the subunit of the dimeric DsbC that is not reduced by nDsbD, as revealed by the X-ray structure of the complex (5). The potential charge repartition along the structure is quite similar between *E. coli* nDsbD and nDsbD_{C103S} (see Supporting Information, Figure S2), but these negatively charged patches in nDsbD_{C103S} could enable many more electrostatic interactions and thus should be also involved in the recognition with DsbC (or an equivalent in the *Neisseria* genus) or other protein partners. The slight decrease of the S^2 term observed along the β_{12} strand could strengthen the assumption that this region may need to drive such interactions.

Another remarkable part of nDsbD_{C103S} lies at the opposite side of the active site. It is assumed in *E. coli* nDsbD to be interacting with the transmembrane domain tDsbD. It is to be noticed that this local region is not as well-defined as the rest of the protein and does not show β -strands equivalent to *E. coli* β_5 and β_9 strands. Despite characteristic H $^\alpha$ /H $^{N_{i+1}}$ NOE correlations, no hydrogen bonds and no long-distance H N /H N or H $^\alpha$ /H $^\alpha$ NOE correlations have been detected between the segments Pro51–Leu55 and Ala88–Pro93_{bis} for nDsbD_{C103S}. In addition, outstandingly low S^2 values associated to τ_i or R_{ex} terms are observed for Asp53 and especially for the Ala90–Glu93 segment. This clearly proves that the high rmsd observed in these regions (see Figure 5a) are due to an actual flexibility and not to a lack of NMR restraints. It also confirms that these two segments do not display a β -strand organization in the nDsbD_{C103S} structure. This could be explained by the higher global hydrophobicity of these two segments compared with their equivalents in *E. coli* nDsbD (Glu51–Ile55 and Asn88–Gly93 segments) as suggested by the electrostatic potential of both proteins (see Supporting Information, Figure S2). Indeed, in nDsbD_{C103S}, they contain seven nonglycine hydrophobic residues compared with four residues in *E. coli* nDsbD. Moreover, there is no such strict alternation of hydrophobic and nonhydrophobic residues in the nDsbD_{C103} segments ₅₂ADLL₅₅ and ₈₉KAVG₉₂ as in their equivalent segments ₅₂HAKI₅₅ and ₈₉QASA₉₂ in *E. coli* nDsbD. Because hydrophobic residues tend to be buried in the structure, the alternation found in *E. coli* is indeed more favorable in stabilizing a β -sheet structure, with Ala53, Ile55, and Ala92 side chains on one hand and His52, Lys54, Gln89, and Ser91 side chains on the other hand pointing, respectively, inside the β -sandwich and toward the solvent. This allows, in *E. coli* nDsbD, side-chain interactions as seen between Lys54 and Gln89 or Ala53

and Ala90 and permits backbone interactions between Glu51–Ile55 and Asn88–Gly93 segments. In the case of nDsbD_{C103S}, Leu54 and Val91, respectively, equivalent to Lys54 and Ser91 in *E. coli* nDsbD, tend to bury their bulky side chains into the structure, to promote hydrophobic interactions, and to increase the distance between the backbone chains of the two considered segments, disabling specific β -sheet backbone interactions. Loops Ala25–Asp27, Ala88–Pro93_{bis}, and Phe120–Gly123 display remarkable motions at various time scales (see Figure 6). No published NMR and X-ray structures of a complex between nDsbD and tDsbD are available so far. We propose that the motions observed in this area, especially the striking flexibility of the segment Ala88–Pro93_{bis}, could provide adaptability to the peptidic chain to interact with tDsbD. These dynamic features may be crucial to ensure a proper contact area between the nDsbD and tDsbD domains in *Neisseria*. This hypothesis is reinforced by the noteworthy hydrophobicity and the weak electrostatic potential (see Figure 1c) of this region, which could facilitate interaction with the transmembrane domain.

To conclude, we have elucidated a solution structure of nDsbD in a reduced form and characterized its dynamics, which provides new important biological insights for the putative mechanism, so far based on crystallographic data gathered from the oxidized form or complexes. We have shown that the active site is protected by the “cap loop” between strands β 6 and β 7 both in the reduced and oxidized states. Therefore, the recognition of the two redox forms of nDsbD is not due to a conformational change of this cap loop. Moreover, a cap displacement must be triggered by the interaction with its specific partners, which can be permitted by the mobility highlighted in the Gly63–Arg73 segment and for the Gln43–Ile46 bend, forming a hinge. The results suggest a pronounced capacity of structural adjustments of the partial β -barrel upon interaction with a biological partner, whatever the reduced or oxidized forms. This could explain why nDsbD can recognize several different disulfide oxidoreductase partners. Moreover, putative recognition structural or dynamics elements in nDsbD have been proposed, not only around the active site but also in more distant regions assumed to be involved in its interaction with DsbC and tDsbD.

ACKNOWLEDGMENT

Access to the Bruker DRX 600 (NMR facilities of the Service Commun de Biophysicochimie des Interactions, Nancy I) was deeply appreciated. We thank Dr. G. Boussard for critical review of the manuscript.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Figure S1 showing the superimposition of the ¹H–¹⁵N HSQC spectra of the C103S mutant (black) with the reduced form of the wild-type (green) nDsbD from *N. meningitidis*, both recorded at 600 MHz, 298 K, pH 7.0 (a), as well as the backbone amide chemical shift perturbations calculated using the consensual value $\Delta\delta$ (b), and Figure S2 corresponding to the electrostatic potential representation of *E. coli* oxidized nDsbD (a) and that of *N. meningitidis* nDsbD_{C103S} (b) using two spatial orientations. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

REFERENCES

- Stewart, E. J., Katzen, F., and Beckwith, J. (1999) Six conserved cysteines of the membrane protein DsbD are required for the transfer of electrons from the cytoplasm to the periplasm of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 18, 5963–5971.
- Chung, J., Chen, T., and Missiakas, D. (2000) Transfer of electrons across the cytoplasmic membrane by DsbD, a membrane protein involved in thiol-disulphide exchange and protein folding in the bacterial periplasm. *Mol. Microbiol.* 35, 1099–1109.
- Gordon, E. H., Page, M. D., Willis, A. C., and Ferguson, S. J. (2000) *Escherichia coli* DipZ: Anatomy of a transmembrane protein disulphide reductase in which three pairs of cysteine residues, one in each of three domains, contribute differentially to function. *Mol. Microbiol.* 35, 1360–1374.
- Goulding, C. W., Sawaya, M. R., Parseghian, A., Lim, V., Eisenberg, D., and Missiakas, D. (2002) Thiol-disulfide exchange in an immunoglobulin-like fold: structure of the N-terminal domain of DsbD. *Biochemistry* 41, 6920–6927.
- Haebel, P. W., Goldstone, D., Katzen, F., Beckwith, J., and Metcalf, P. (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, 4774–4784.
- Kim, J. H., Kim, S. J., Jeong, D. G., Son, J. H., and Ryu, S. E. (2003) Crystal structure of DsbD γ reveals the mechanism of redox potential shift and substrate specificity. *FEBS Lett.* 543, 164–169.
- Rietsch, A., Belin, D., Martin, N., and Beckwith, J. (1996) An in vivo pathway for disulfide bond isomerization in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 13048–13053.
- Rietsch, A., Bessette, P., Georgiou, G., and Beckwith, J. (1997) Reduction of the periplasmic disulfide bond isomerase, DsbC, occurs by passage of electrons from cytoplasmic thioredoxin. *J. Bacteriol.* 179, 6602–6608.
- Katzen, F., and Beckwith, J. (2000) Transmembrane electron transfer by the membrane protein DsbD occurs via a disulfide bond cascade. *Cell* 103, 769–779.
- Krupp, R., Chan, C., and Missiakas, D. (2001) DsbD-catalyzed transport of electrons across the membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 276, 3696–3701.
- Collet, J. F., Riemer, J., Bader, M. W., and Bardwell, J. C. (2002) Reconstitution of a disulfide isomerization system. *J. Biol. Chem.* 277, 26886–26892.
- Fabianek, R. A., Hennecke, H., and Thony-Meyer, L. (1998) The active-site cysteines of the periplasmic thioredoxin-like protein CcmG of *Escherichia coli* are important but not essential for cytochrome c maturation in vivo. *J. Bacteriol.* 180, 1947–1950.
- Fabianek, R. A., Hofer, T., and Thony-Meyer, L. (1999) Characterization of the *Escherichia coli* CcmH protein reveals new insights into the redox pathway required for cytochrome c maturation. *Arch. Microbiol.* 171, 92–100.
- Reid, E., Cole, J., and Eaves, D. J. (2001) The *Escherichia coli* CcmG protein fulfils a specific role in cytochrome c assembly. *Biochem. J.* 355, 51–58.
- Bessette, P. H., Cotto, J. J., Gilbert, H. F., and Georgiou, G. (1999) In vivo and in vitro function of the *Escherichia coli* periplasmic cysteine oxidoreductase DsbG. *J. Biol. Chem.* 274, 7784–7792.
- Rozhkova, A., Stirmimann, C. U., Frei, P., Grauschopf, U., Brunisholz, R., Gruetter, M. G., Capitani, G., and Glockshuber, R. (2004) Structural basis and kinetics of inter- and intramolecular disulfide exchange in the redox catalyst DsbD. *EMBO J.* 23, 1709–1719.
- Stirmimann, C. U., Rozhkova, A., Grauschopf, U., Gruetter, M. G., Glockshuber, R., and Capitani, G. (2005) Structural basis and kinetics of DsbD-dependent cytochrome c maturation. *Structure* 13, 985–993.
- Brot, N., Collet, J. F., Johnson, L. C., Jonsson, T. J., Weissbach, H., and Lowther, W. T. (2006) The thioredoxin domain of *Neisseria gonorrhoeae* PilB can use electrons from DsbD to reduce downstream methionine sulfoxide reductases. *J. Biol. Chem.* 281, 32668–32675.
- Keller, R. (2004) Optimizing the process of nuclear magnetic resonance spectrum analysis and computer aided resonance assignment, Ph.D. Thesis, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland.
- Wishart, D. S., Bigam, C. G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H. J., and Oldfield, E. (1995) ¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J. Biomol. NMR* 6, 135–140.

21. Bai, Y., Milne, J. S., Mayne, L., and Englander, S. W. (1993) Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* *17*, 75–86.
22. Cordier, F., and Grzesiek, S. (2002) Temperature-dependence of protein hydrogen bond properties as studied by high-resolution NMR. *J. Mol. Biol.* *317*, 39–52.
23. Cordier, F., Barfield, M., and Grzesiek, S. (2003) Direct observation of C^α–H^α•••O=C hydrogen bonds in proteins by interresidue ¹³J_{CαC'} scalar couplings. *J. Am. Chem. Soc.* *125*, 15750–15751.
24. Herrmann, T., Güntert, P., and Wüthrich, K. (2002) Protein NMR structure determination with automated NOE-identification in the NOESY spectra using the new software ATNOS. *J. Biomol. NMR* *24*, 171–189.
25. Herrmann, T., Güntert, P., and Wüthrich, K. (2002) Protein NMR structure determination with automated NOE assignment using the new software CANDID and the torsion angle dynamics algorithm DYANA. *J. Mol. Biol.* *319*, 209–227.
26. Cornilescu, G., Delaglio, F., and Bax, A. (1999) Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J. Biomol. NMR* *13*, 289–302.
27. Güntert, P. (2004) Automated NMR structure calculation with CYANA. *Methods Mol. Biol.* *278*, 353–378.
28. Koradi, R., Billeter, M., and Wüthrich, K. (1996) MOLMOL: A program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graphics* *14*, 51–55.
29. Farrow, N. A., Muhandiram, R., Singer, A. U., Pascal, S. M., Kay, C. M., Gish, G., Shoelson, S. E., Pawson, T., Forman-Kay, J. D., and Kay, L. E. (1994) Backbone dynamics of a free and phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by ¹⁵N NMR relaxation. *Biochemistry* *33*, 5984–6003.
30. Johnson, B. A., and Blevins, R. A. (1994) NMRView: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. *J. Biomol. NMR* *4*, 603–614.
31. Farrow, N. A., Zhang, O., Szabo, A., Torchia, D. A., and Kay, L. E. (1995) Spectral density function mapping using ¹⁵N relaxation data exclusively. *J. Biomol. NMR* *6*, 153–162.
32. Ishima, R., Yamasaki, K., Saito, M., and Nagayama, K. (1995) Spectral densities of nitrogen nuclei in *Escherichia coli* ribonuclease HI obtained by ¹⁵N NMR relaxation and molecular dynamics. *J. Biomol. NMR* *2*, 217–220.
33. Ishima, R., and Nagayama, K. (1995) Protein backbone dynamics revealed by quasi spectral density function analysis of amide N-15 nuclei. *Biochemistry* *34*, 3162–3171.
34. Lefevre, J. F., Dayie, K. T., Peng, J. W., and Wagner, G. (1996) Internal mobility in the partially folded DNA binding and dimerization domains of GAL4: NMR analysis of the N-H spectral density functions. *Biochemistry* *35*, 2674–2686.
35. Hiyama, Y., Niu, C., Silverton, J. V., Bavoso, A., and Torchia, D. A. (1988) Determination of ¹⁵N chemical shift tensor via ¹⁵N-²H dipolar coupling in Boc-glycylglycyl[¹⁵N glycine]benzyl ester. *J. Am. Chem. Soc.* *110*, 2378–2383.
36. Peng, J. W., and Wagner, G. (1995) Frequency spectrum of NH bond in eglin c from spectral density mapping at multiple fields. *Biochemistry* *34*, 16733–16752.
37. Dossset, P., Hus, J.-C., Blackledge, M., and Marion, D. (2000) Efficient analysis of macromolecular rotational diffusion from heteronuclear relaxation data. *J. Biomol. NMR* *16*, 23–28.
38. Lipari, G., and Szabo, A. (1982) Model-free approach to the interpretation on nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity. *J. Am. Chem. Soc.* *104*, 4546–4559.
39. Lipari, G., and Szabo, A. (1982) Model-free approach to the interpretation on nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results. *J. Am. Chem. Soc.* *104*, 4560–4570.
40. Quinternet, M., Selme, L., Tsan, P., Beaufils, C., Jacob, C., Boschi-Muller, S., Averlant-Petit, M.-C., Branlant, G., and Cung, M. T. (2008) ¹H, ¹³C, and ¹⁵N resonance assignment of the C103S mutant of the N-terminal domain of DsbD from *Neisseria meningitidis*. *Biomol. NMR Assign.* *2*, 85–87.
41. Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R., and Thornton, J. M. (1996) AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J. Biomol. NMR* *8*, 477–486.
42. Vriend, G., and Sander, C. (1993) Quality control of protein models: Directional atomic contact analysis. *J. Appl. Crystallogr.* *26*, 47–60.
43. Holm, L., and Sander, C. (1993) Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J. Mol. Biol.* *233*, 123–138.
44. Gibrat, J. F., Madej, T., and Bryant, S. H. (1996) Surprising similarities in structure comparison. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *6*, 377–385.
45. Guignard, L., Padilla, A., Mispelter, J., Yang, Y. S., Stern, M. H., Lhoste, J. M., and Roumestand, C. (2000) Backbone dynamics and solution structure refinement of the ¹⁵N-labeled human oncogenic protein p13^{MTCP1}: comparison with X-ray data. *J. Biomol. NMR* *17*, 215–230.
46. Constantine, K. L., Friedrichs, M. S., Goldfarb, V., Jeffrey, P. D., Sheriff, S., and Mueller, L. (1993) Characterization of the backbone dynamics of an anti-digoxin antibody VL domain by inverse detected ¹H-¹⁵N NMR: comparisons with X-ray data for the Fab. *Proteins* *15*, 290–311.
47. Stirnimann, C. U., Grütter, M. G., Glockshuber, R., and Capitani, G. (2006) nDsbD: A redox interaction hub in the *Escherichia coli* periplasm. *Cell. Mol. Life Sci.* *63*, 1642–1648.
48. Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. I., and Metoz, F. (1999) ESPript: Multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* *15*, 305–308.

BI801343C

Figure S1

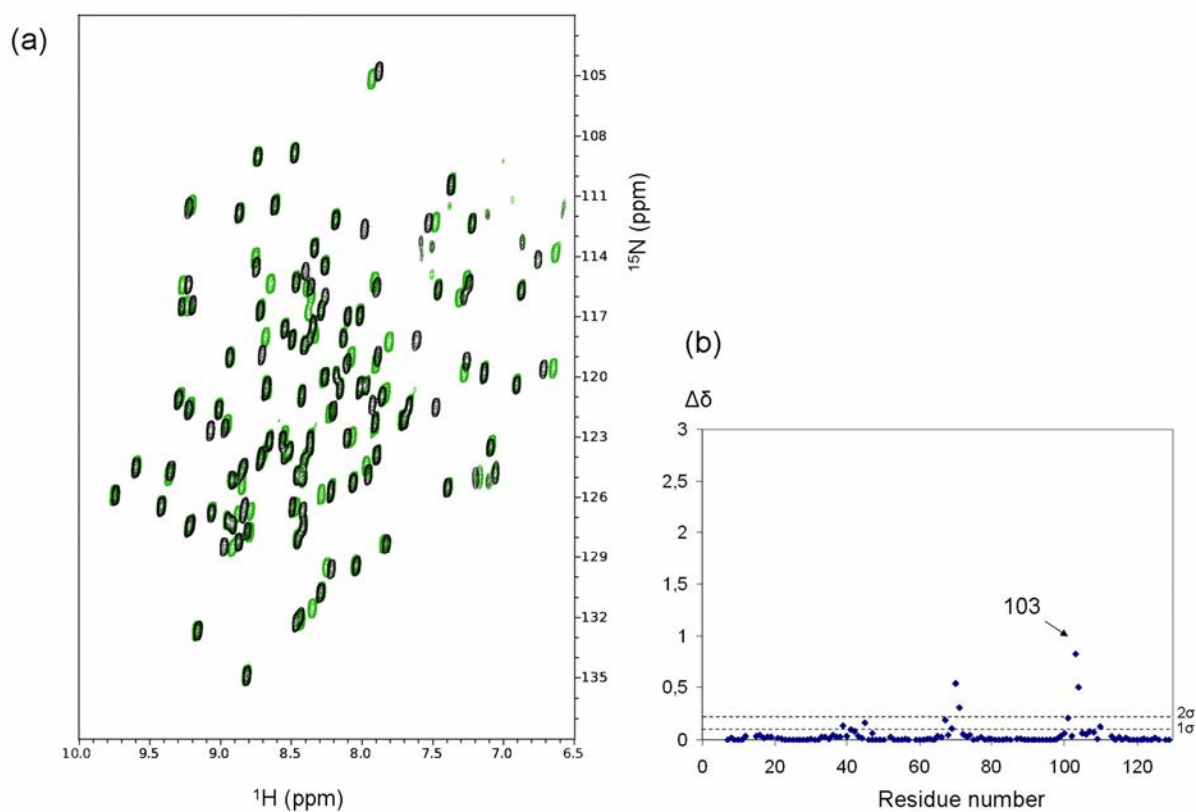


Figure S1. Superimposition of the ^1H - ^{15}N HSQC spectra of the C103S mutant (black) with the reduced form of the wild-type (green) nDsbD from *N. meningitidis*, both recorded at 600 MHz, 298 K, pH 7.0 (a), as well as the backbone amide chemical shift perturbations calculated using the consensual value $\Delta\delta$ (b).

Figure S2

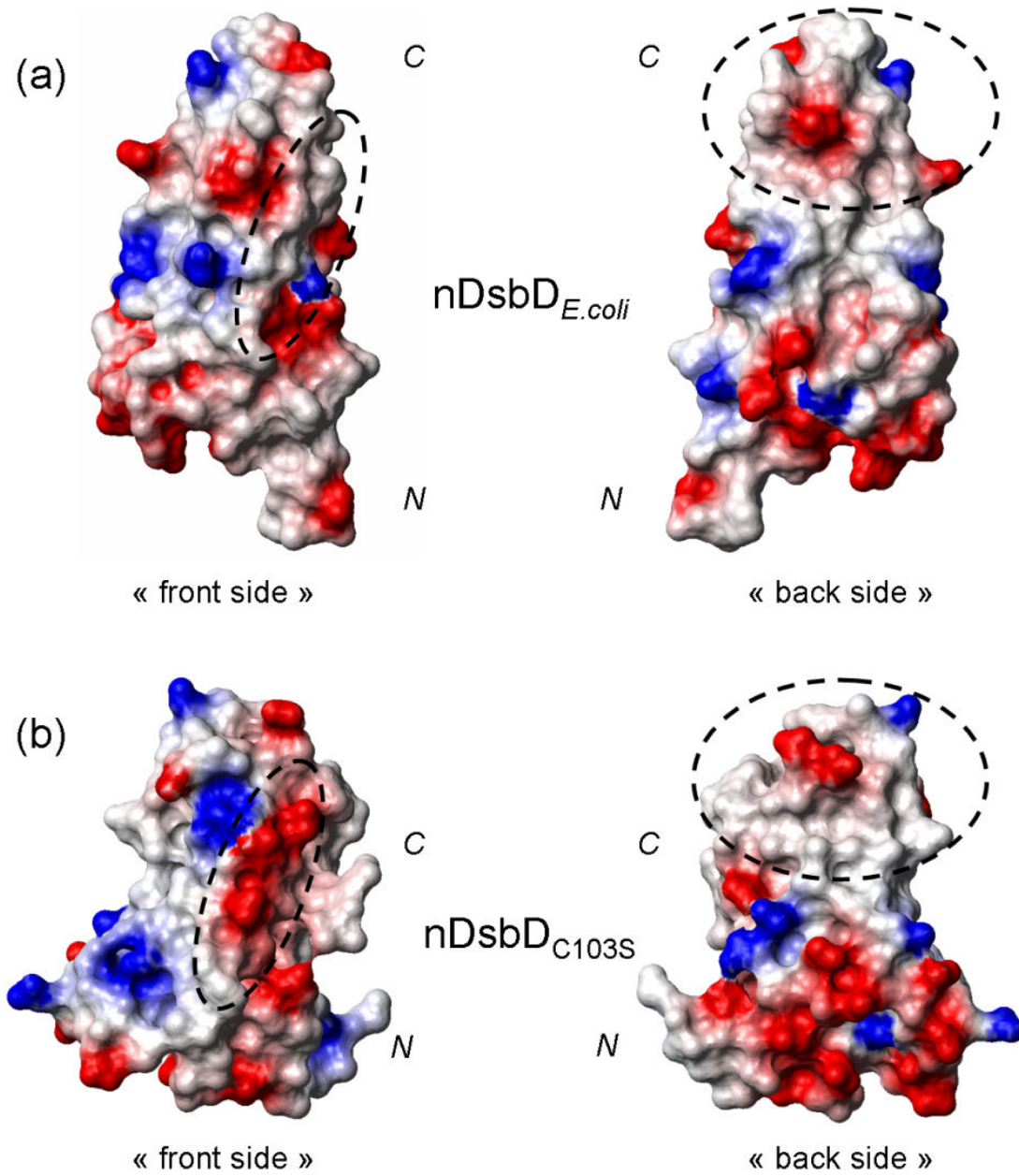


Figure S2. Electrostatic potential representation of *E. coli* oxidized nDsbD (a) and that of *N. meningitidis* nDsbD_{C103S} (b) using two spatial orientations.

Chapitre 2 : Etude structurale et dynamique du domaine N-terminal de la protéine PilB de *Neisseria meningitidis*

I. Introduction

La protéine PilB est supposée intervenir dans les mécanismes de défense des bactéries pathogènes du genre *Neisseria* contre les attaques oxydatives générées par le système immunitaire de leur hôte. Cette protéine peut être découpée en trois domaines. Les domaines central et C-terminal présentent respectivement deux activités méthionine sulfoxyde réductase, l'une de type A et l'autre, de type B. Le domaine N-terminal, qui possède une signature CXXC, a été identifié comme un réducteur *in vitro* de ces deux domaines Msr, tout comme l'a été Trx1 d'*E. coli*. C'est un échange de ponts disulfure entre le domaine N-terminal et les domaines Msr qui permet à PilB de recouvrer son activité anti-oxydante. Ce sont les cystéines 67 et 70 de NterPilB (seuls résidus cystéine de la séquence) qui sont impliqués dans la formation d'un des ponts covalents. Il a récemment été montré par « l'équipe enzymologie » du MAEM que le domaine N-terminal de DsbD (nDsbD) était le partenaire réducteur *in vitro* de NterPilB chez *Neisseria meningitidis*. Ce domaine NterPilB présente des homologies avec la famille structurale des protéines impliquées dans la maturation des cytochromes (CMP) mais avec la particularité de posséder une insertion de 7 résidus et structurée sous forme d'une boucle jouxtant le site actif. Cette dernière a été proposée comme élément structural de reconnaissance pouvant induire la spécificité de substrat.

Le mécanisme catalytique d'échange de ponts disulfure entre NterPilB, nDsbD, MsrA et MsrB fait intervenir, dans son étape initiale, la forme oxydée de NterPilB et la forme réduite de nDsbD. Ce mécanisme impose la libération de NterPilB sous sa forme réduite, la seule capable d'interagir avec les domaines Msr oxydés de PilB (Figure 42). Les formes réduite et oxydée de NterPilB interagissent ainsi chacune avec un partenaire spécifique, les trois substrats potentiels connus pour NterPilB ayant des caractéristiques structurales tout à fait différentes.

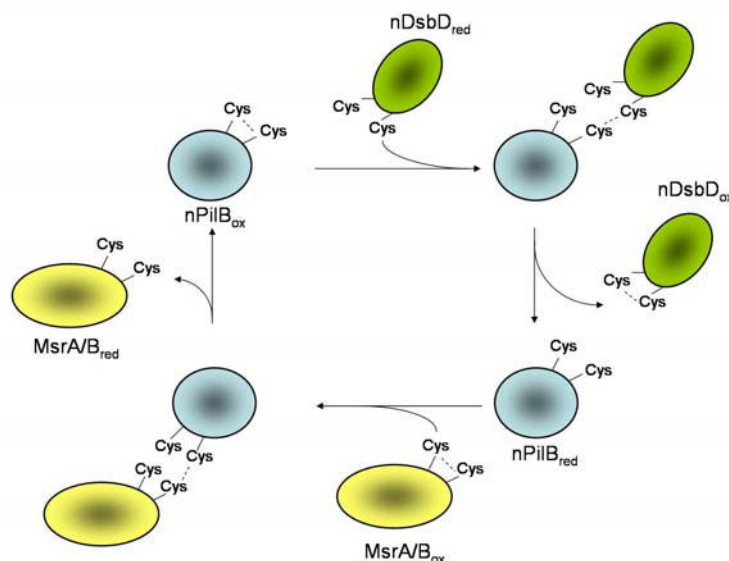


Figure 42 : Schéma réactionnel simplifié du chemin rédox de NterPilB

L'étude par RMN de NterPilB a été motivée par la comparaison des formes réduite et oxydée de la protéine, la structure cristallographique de l'état réduit étant la seule disponible jusqu'à présent. Nous avons cherché à savoir si ces deux états présentaient des différences structurales notables expliquant leur spécificité d'interaction avec (i) le domaine nDsbD en amont, (ii) les domaines Msr A et B en aval. Afin de déterminer les segments potentiellement impliqués dans le mécanisme d'action de la protéine, une évaluation des paramètres dynamiques de la protéine s'avérait être pertinente, notamment au niveau de son insertion FLHE caractéristique.

II. Attribution séquentielle des formes réduite et oxydée de NterPilB

Tout comme expliquée dans le chapitre 1, cette étape est nécessaire à la résolution de la structure tridimensionnelle et à l'analyse dynamique. Pour chacune des formes, oxydée ou réduite, de NterPilB, un échantillon simplement marqué ^{15}N et un échantillon doublement marqué $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ ont été préparés au laboratoire MAEM afin de mener à bien cette étude.

II.1. Etudes préliminaires

Le domaine NterPilB est une protéine de 144 résidus dont l'examen de la structure primaire révèle la présence de 2 cystéines (Cys67 et Cys70) uniquement, celles-là mêmes impliquées dans le processus catalytique. De plus, NterPilB renferme 9 prolines, qui représentent autant d'interruption dans l'enchaînement des groupes amide secondaire et compliquant ainsi l'étape d'attribution séquentielle. Il est d'ailleurs à noter que le motif CXXC, qui contient les deux cystéines réactives, inclut une proline en position 2 (motif CPLC). Toutefois la séquence de NterPilB, en l'absence de segments répétitifs, suggère un travail d'attribution assez simple.

L'examen des structures secondaires déterminées par diffraction des rayons X (Figure 43) indique un bon taux de structuration puisque près de 52 % des résidus de la protéine adoptent une structure secondaire régulière. De plus la longueur des boucles encadrant ces structures secondaires est en moyenne de 4,5 résidus ce qui diminue les difficultés potentielles lors de l'étape de résolution des structures en solution.

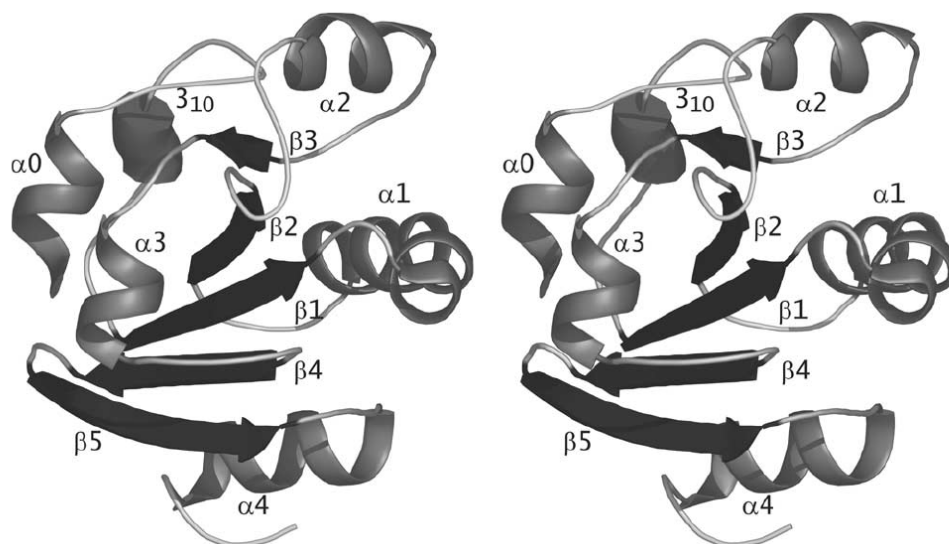


Figure 43 : Représentation stéréo de la structure cristallographique de la forme réduite de NterPilB résolue par RX (Figure issue de Ranaivoson et al., 2006)

II.2. Premiers spectres

Les échantillons de NterPilB (réduit et oxydé) marqués ont été préparés à une concentration de 1mM à pH 7,0 (20 mM de KH_2PO_3), en présence de 50 mM de dithiothréitol pour empêcher l'oxydation des groupes thiol de l'enzyme ; tous les spectres ont été enregistrés à 600 MHz et à une température de 298 K.

Les spectres unidimensionnels ^1H suggèrent un taux de structuration important des deux formes réduite et oxydée de la protéine. Plus une protéine sera structurée, plus on augmente le nombre de protons présentant des environnements chimiques bien définis et différents. A l'inverse, une protéine non structurée n'en possède qu'un nombre restreint et par conséquent, ses protons ne se dispersent que sur une échelle limitée de déplacements chimiques. Dans le cas de NterPilB, la dispersion des déplacements chimiques s'étend sur une largeur d'environ 5 ppm. De plus, la zone correspondant aux protons H^{N} des liaisons amide secondaire est relativement bien résolue.

Les spectres HSQC ^1H - ^{15}N confirment nos premières impressions puisque le taux de recouvrement des groupements HN apparaissant sur ces spectres est faible. De plus, tout comme pour les protons, la dispersion des fréquences des noyaux ^{15}N est bonne. Il est à remarquer que les spectres HSQC ^1H - ^{15}N des formes réduite et oxydée diffèrent légèrement, notamment autour des résidus du pont disulfure (Figure 44).

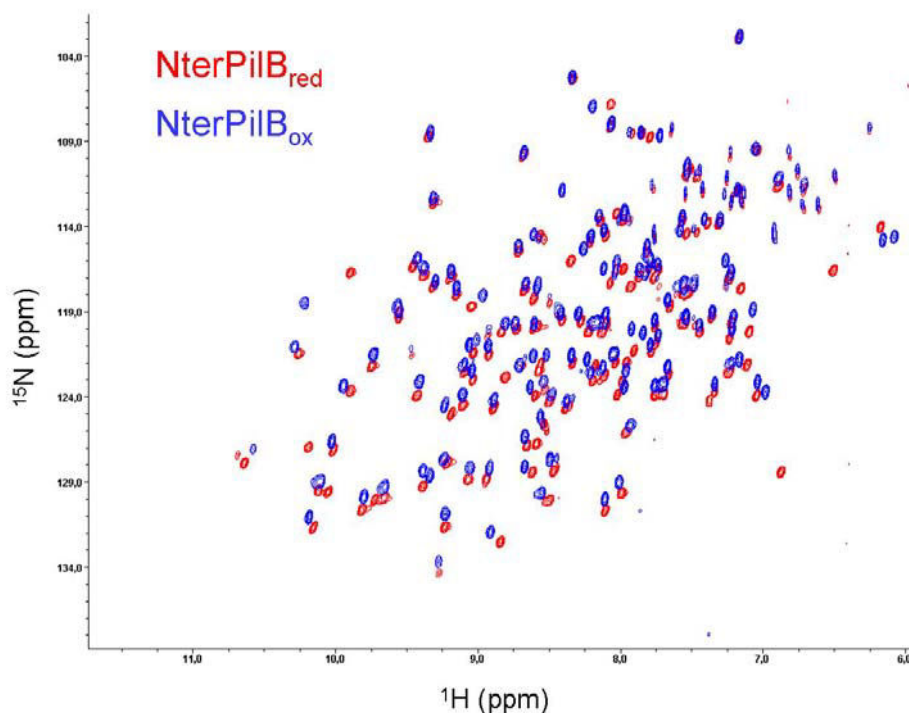


Figure 44 : Superposition des spectres HSQC ^1H - ^{15}N des formes réduite (rouge) et oxydée (bleu) de NterPilB

II.3. Résultats

L'attribution séquentielle des fréquences de résonance des formes réduite et oxydée a fait l'objet de deux publications. Elles font toutes deux référence aux méthodes utilisées et notamment à la production des échantillons et aux expériences RMN réalisées. Ces publications sont incorporées dans ce chapitre et en annexe de ce manuscrit. On peut en dégager les principaux points suivants :

1- Pour chacune des formes, un bon résultat, conduisant à l'attribution de plus de 95% des atomes du squelette peptidique, a été obtenu. Il est à noter que le taux d'attribution des atomes des chaînes latérales est plus important dans le cas de NterPilB_{ox} ce qui peut conduire à un plus grand taux d'attribution des corrélations nOe.

2- Les listes de déplacements chimiques ont été déposées sur le site de la BMRB (BioMagResBank) sous les codes d'entrée 6709 et 15280, respectivement pour les formes réduite et oxydée.

3- L'attribution des fréquences de résonance des atomes du squelette permet d'accéder aux prévisions des structures secondaires de la protéine. Les logiciels TALOS et CSI utilisent les valeurs des déplacements chimiques des atomes du squelette peptidique et établissent un lien statistique entre ces valeurs et l'inclusion des résidus dans un feuillet β ou une hélice. Cela permet de comparer grossièrement, (i) les structures RMN des formes réduite et oxydée entre elles, (ii) les formes réduites obtenues par RMN et par

RX. Ainsi, les prédictions de structures secondaires des formes réduite et oxydée sont très similaires. De plus, elles laissent à penser que les formes RMN et RX sont proches structuralement.

4- La présence du pont disulfure dans la forme oxydée engendre des modifications du spectre HSQC, notamment au niveau des résidus qui l'environnent. D'autres zones, plus éloignées séquentiellement semblent subir l'influence de cette modification.

Nous avons donc suspecté des modifications structurales au niveau des résidus du motif CXXC mais aussi au niveau d'autres résidus séquentiellement éloignés. Grâce à la structure RX, ces résidus ont pu être identifiés comme des résidus proches spatialement du pont disulfure. Toutefois, l'ampleur de ces potentiels changements structuraux ne doit pas être importante car les modifications de déplacements chimiques des groupements ^1H - ^{15}N sont certes significatives, mais limitées en nombre et en amplitude (notamment dans le cas des résidus séquentiellement éloignés du pont S~S).

II.4. Publication

Pour plus de détails (particulièrement pour le détail des méthodes), il convient de se reporter aux publications de Beaufils *et al.* (en annexe - *J. Biomol. NMR*, 2006) et de Quinernet *et al.* (ci-après - *Biomolecular NMR assignments*, 2007).

^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignment of the oxidized form (Cys₆₇–Cys₇₀) of the N-terminal domain of PilB from *Neisseria meningitidis*

Marc Quinternet · Chrystel Beaufile · Fabrice Neiers ·
Pascale Tsan · Sandrine Boschi-Muller ·
Marie-Christine Averlant-Petit · Guy Branlant ·
Manh-Thong Cung

Received: 28 June 2007 / Accepted: 4 July 2007 / Published online: 24 July 2007
© Springer Science+Business Media B.V. 2007

Abstract We report the nearly complete ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignments of the oxidized form (Cys₆₇–Cys₇₀) of the N-terminal domain of PilB from *Neisseria meningitidis*. Secondary structure determination using CSI method and TALOS leads mainly to the prediction of 7 α -helical and 5 β -sheet parts.

Keywords N-terminal domain of PilB ·
Neisseria meningitidis · Disulfide bond

Biological context

The PilB protein, specific to pathogenic bacteria from *Neisseria* genus, is thought to help *Neisseria* survive the burst of reactive oxygen species generated by the infected host cells. The PilB protein is located in the periplasm and made up of three domains. The N-terminal, thioredoxin-like domain (NterPilB), is fused to methionine sulfoxide reductase A (MsrA) and methionine sulfoxide reductase B (MsrB) domains (Olry et al. 2002). MsrA and MsrB catalyze the reduction of protein-bound methionine sulfoxide (MetSO) back to methionine. They display opposite specificity towards the *S* and *R* isomers of the sulfoxide func-

tion of MetSO, respectively. Although distinct in both their primary, secondary and tertiary structures, MsrA and MsrB follow the same catalytic mechanism (Boschi-Muller et al. 2005). The NterPilB, which possesses a CXXC signature, has been recently shown to recycle the oxidized forms of the PilB Msr domains in vitro, as does the thioredoxin, via a disulfide bond exchange (Wu et al. 2005). Thus, this N-terminal domain, which might take part in the bacterial defence system, appears as a good target to selectively block the invasion of the *Neisseria* pathogens.

The X-ray structure of the NterPilB in its reduced form has been recently reported (Ranaivoson et al. 2006). It displays strong structural homologies with periplasmic DsbE thioredoxin-like disulfide oxidoreductases, involved in cytochrome *c* maturation pathway. However, it possesses a unique insertion of four additional residues FLHE near the active site. In a first approach, we recently reported the backbone and side-chain assignment of the reduced form of NterPilB from *N. meningitidis* (Beaufile et al. 2006). We now report the nearly complete backbone and side-chain assignment of the oxidized Cys₆₇–Cys₇₀ form of NterPilB (143 residues). The knowledge of the structure of both reduced and oxidized forms of NterPilB should permit to identify the structural factors involved in the specific recognition between NterPilB and its different partners (Msrs and N-terminal domain of DsbD) and in particular the role of the FLHE insertion.

Methods and experiments

The *E. coli* strain used for NterPilB (Δ_{33-175}) production was BL21-DE3 pLysS transformed with a pETNterPilB plasmid. ^{15}N - and $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -labelled samples were prepared by growing cells in a minimal media with $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ as the

M. Quinternet · C. Beaufile · P. Tsan · M.-C. Averlant-Petit ·
M.-T. Cung (✉)
Laboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire, UMR 7568
CNRS-INPL, Nancy Université, 1 rue Grandville,
B.P. 451, 54001 Nancy Cedex, France
e-mail: Manh-Thong.Cung@ensic.inpl-nancy.fr

F. Neiers · S. Boschi-Muller · G. Branlant
Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, UMR 7567
CNRS-UHP, Nancy Université, Bld des Aiguillettes, B.P. 239,
54506 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France

sole nitrogen source and with glucose, ^{13}C -labelled or not, as the only carbon source. The NterPilB production was induced at an OD_{600} of 0.6 by addition of 1 mM IPTG and harvested after 4 h for the $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ protein and 16 h for the ^{15}N protein. Purification was done as previously described (Wu et al. 2005), and sample purity and molecular mass were checked by SDS-PAGE and electrospray mass spectrometry, respectively. The oxidation of the NterPilB was achieved by incubating reduced NterPilB (0.5 mM) with 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (1 mM) in degassed solution of 10 mM phosphate buffer, pH 7.0 at room temperature for 10 min. Oxidized form was isolated by gel filtration on Econo-Pac 10 DG Column (Bio-Rad laboratory) equilibrated with 10 mM phosphate buffer, pH 7.0. The oxidation state of the N-terminal domain was checked by titration with DTNB as previously described (Wu et al. 2005).

The NMR sample contained 0.5 mM protein concentration (95% H_2O , 5% D_2O) in 10 mM phosphate buffer at pH 7.0. All spectra were acquired at 298 K on a Bruker DRX 600 MHz spectrometer equipped with a TCI cryoprobe. Spectra were processed using the program XWINNMR (Bruker) and analyzed with the programs XEASY (Bartels et al. 1995) and CARA (Keller 2004). Backbone amide $^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{15}N , $^{13}\text{C}^{\alpha}$, $^1\text{H}^{\alpha}$, $^{13}\text{C}'$, and side chain ^1H , ^{13}C resonances were assigned using $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ HSQC, HNC(O), HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, CBCANH, CBCA(CO)NH, and HNHA experiments. HNHB, HCCH-TOCSY, CC(CO)NH and $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ -, $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ -, $^1\text{H}-^{13}\text{C}-^{15}\text{N}$ - 3D HSQC-NOESY spectra were also performed for side-chain assignments.

Torsion angles (Φ , Ψ) and secondary structure prediction are based on H^{N} , H^{α} , N , C^{α} , C^{β} and C' chemical shifts using the TALOS and the CSI programs (Cornilescu et al. 1999; Wishart and Sykes 1994).

Extent of assignments and data deposition

The $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ TROSY spectrum for the NterPilB is shown in Fig. 1. More than 94% of backbone H^{N} , N , C^{α} , C' and C^{β} nuclei have been assigned (i.e., 129/135 $^{15}\text{N}-\text{H}^{\text{N}}$ sites, 140/144 C^{α} , 138/144 C' , 130/135 C^{β}). Proton and carbon chemical shift data for the majority of side chain groups were determined using a combination of 3D spectra.

Most of the nuclei have similar chemical shifts in the reduced and oxidized forms of NterPilB. The chemical surrounding perturbations caused by the oxidation were estimated by comparing the backbone amide chemical shift differences using the bias of the consensual values $\Delta\delta$ (Williamson et al. 1997). The plot of $\Delta\delta$ values as a function of the protein sequence (Fig. 2) reveals that meaningful changes are observed for residues going from W63 to E73 ($\Delta\delta > 0.1$ ppm). These perturbations take

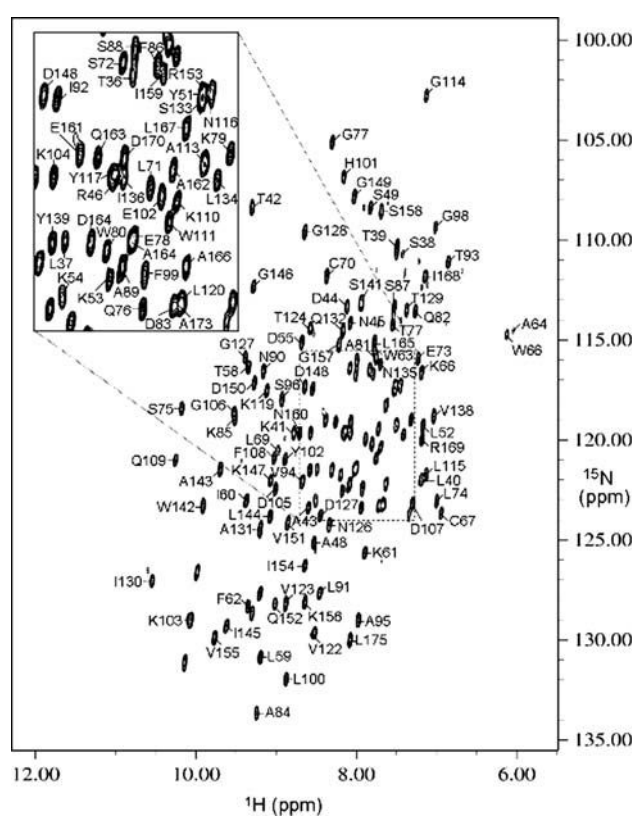


Fig. 1 2D $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ TROSY spectrum of ^{15}N labelled oxidized form (Cys₆₇-Cys₇₀) of the N-terminal domain of PilB from *N. meningitidis* recorded at 600 MHz, 298 K, pH 7.0

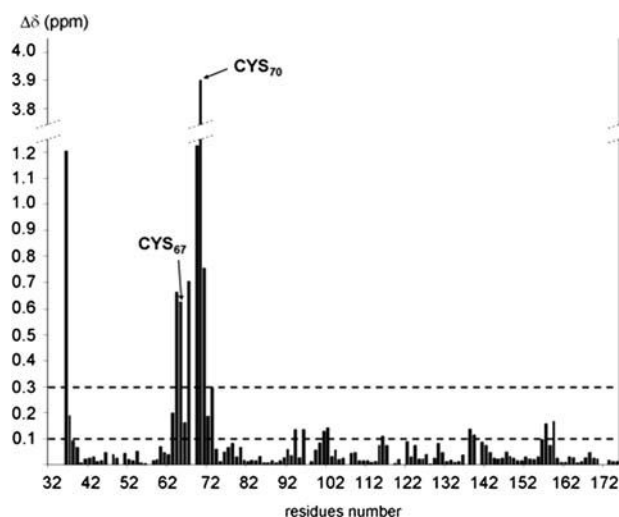


Fig. 2 Chemical shift perturbations of the backbone amide groups calculated between the reduced and the oxidized forms of NterPilB from *N. meningitidis* using the consensual values $\Delta\delta$. The measures were done at 600 MHz, 298 K, pH 7.0 for each of the two states

place inside and in the close vicinity of the active site. The two cysteines involved in the disulfide bond show large perturbations, notably for C70. Moreover, some other

residues (L37, V94, S96, H101, E102, N116, V138, Y139, G157, I159) present significant but reasonable perturbations ($0.1 < \Delta\delta < 0.3$ ppm) whereas L36 shows a larger $\Delta\delta$ value. This is probably due to conformational changes generated by the oxidation.

Evaluation of the obtained H^α , C' , C^α and C^β chemical shifts by the CSI program leads to the prediction of seven α -helical and five β -sheet segments longer than four residues: αA (H35-T39), β1 (T39-T42), β2 (K56-A64), αB (P68-A81), αC (D73-S88), β3 (A89-S96), αD (K104-G114), β4 (V122-D125), αE (N126-S133), β5 (V138-I145) and αF (E161-R169). In addition, the TALOS program predicts, in agreement with the CSI results, the presence of several secondary structure elements, composed by segments shorter than four residues. A little helix (A48-V50) and a little β strand composed of three residues (I154-K156) are predicted in the N-terminal part and in the C-terminal part respectively. The predicted secondary structures of the oxidized NterPilB are close to those predicted for the reduced form and differ in particular by the length of the β -strands and the α -helices.

Chemical shifts were deposited in the BioMagResBank under the access number 15280 (<http://www.bmrb.wisc.edu>). The numbering of amino acid residues is based on the numbering of the entire PilB (Wu et al. 2005).

Acknowledgements This research was supported by the CNRS, the Ministère Délégué à la Recherche (ACI BCMS047), the Henri Poincaré University and INPL, the Conseil Régional de la Lorraine, the IFR 111 Bioingénierie and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC-No 4393). Access to the Bruker DRX 600 NMR facilities of the Service Commun de Biophysicochimie des Interactions Moléculaires, Nancy I was deeply appreciated.

References

- Bartels C, Xia T, Billeter M, Güntert P, Wüthrich K (1995) The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules. *J Biomol NMR* 6:1–10
- Beaufils C, Neiers F, Coudeville N, Boschi-Muller S, Averlant-Petit MC, Branlant G, Cung MT (2006) ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignment of the N-terminal domain of PilB from *Neisseria meningitidis*. *J Biomol NMR* 36:6
- Boschi-Muller S, Olry A, Antoine M, Branlant G (2005) The enzymology and biochemistry of methionine sulfoxide reductases. *Biochim Biophys Acta* 1703:231–238
- Cornilescu G, Delaglio F, Bax A (1999) Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J Biomol NMR* 13:289–302
- Keller R (2004) Optimizing the process of nuclear magnetic resonance spectrum analysis and computer aided resonance assignment. Ph.D. thesis, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland
- Olry A, Boschi-Muller S, Marraud M, Sanglier-Cianferani S, Van Dorsselear A, Branlant G (2002) Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of PILB, a probable virulence factor from *Neisseria meningitidis*. *J Biol Chem* 277:12016–12022
- Ranaivoson FM, Kauffmann B, Neiers F, Wu J, Boschi-Muller S, Panjikar S, Aubry A, Branlant G, Favier F (2006) The X-ray structure of the N-terminal domain of PILB from *Neisseria meningitidis* reveals a thioredoxin-fold. *J Mol Biol* 358:443–454
- Williamson RA, Carr MD, Frenkiel TA, Feeney J, Freedman RB (1997) Mapping the binding site for matrix metalloproteinase-2 by NMR chemical shift perturbation. *Biochemistry* 36:13882–13889
- Wishart DS, Sykes BD (1994) The ^{13}C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ^{13}C chemical-shift data. *J Biomol NMR* 4:171–180
- Wu J, Neiers F, Boschi-Muller S, Branlant G (2005) The N-terminal domain of PILB from *Neisseria meningitidis* is a disulfide reductase that can recycle methionine sulfoxide reductases. *J Biol Chem* 280:12344–12350

III. Etude, en milieu aqueux, de la structure et de la dynamique interne des formes réduite et oxydée du domaine N-terminal de PilB de *Neisseria meningitidis* (NterPilB)

L'étude de la structure 3D et de la dynamique du squelette, en solution aqueuse, des deux formes réduite et oxydée de NterPilB a fait l'objet d'une publication dans le journal *Biochemistry* (Quinternet *et al.*, 2008). L'ensemble du texte et des références bibliographiques sont disponibles ci-après. Les principaux résultats et conclusions de cet article sont résumés ci-dessous.

III.1. Etude de la structure, en solution aqueuse, de NterPilB sous ses deux formes

III.1.1. Méthodes pour le calcul des structures

Les structures obtenues dérivent de l'attribution des spectres NOESY-HSQC (qui donnent accès aux contraintes de distances interprotoniques), des prévisions des valeurs d'angles (obtenues grâce à TALOS), et d'un ensemble de liaisons hydrogène (obtenu grâce à des expériences d'échange $^1\text{H}/^2\text{H}$ et d'effet de la température). Toutes ces contraintes ont été prises en compte dans les calculs de modélisation moléculaire effectués avec des logiciels de recuit simulé (DYANA pour la forme réduite et CYANA pour la forme oxydée). Les meilleures structures ont été sélectionnées et affinées avec le logiciel DISCOVER. Ainsi, pour chacun des états rédox, une famille de 20 structures représentatives a été obtenue puis validée par PROCHECK-NMR.

III.1.2. Analyse structurale des formes réduite et oxydée obtenues par RMN

Pour les deux formes réduite et oxydée de NterPilB, le repliement obtenu est de type Trx, avec un feuillet central formé de 6 brins β flanqué de 5 hélices (Figure 45). Le domaine NterPilB se distingue de la thiorédoxine par une insertion de 24 résidus en position N-terminale et une autre insertion de 28 résidus au sein même de la structure. La première insertion donne naissance à une hélice α , un brin β et une hélice 3_{10} ; la deuxième insertion forme un brin β et une hélice α supplémentaire ainsi qu'une boucle de 7 résidus ($_{99}\text{FLHEKKD}_{105}$).

Globalement, la forme réduite semble légèrement moins bien définie que la forme oxydée. Cela s'explique par un taux d'attribution légèrement moins important pour NterPilB_{red}. Toutefois, ces zones moins bien définies correspondent à celles éloignées du site actif qui renferme le motif caractéristique $_{67}\text{CXXC}_{70}$. En excluant ces régions particulières, on peut constater que les formes réduite et oxydée sont bien superposables, que ce soit en considérant les atomes du squelette peptidique, ou bien l'ensemble des hétéroatomes.

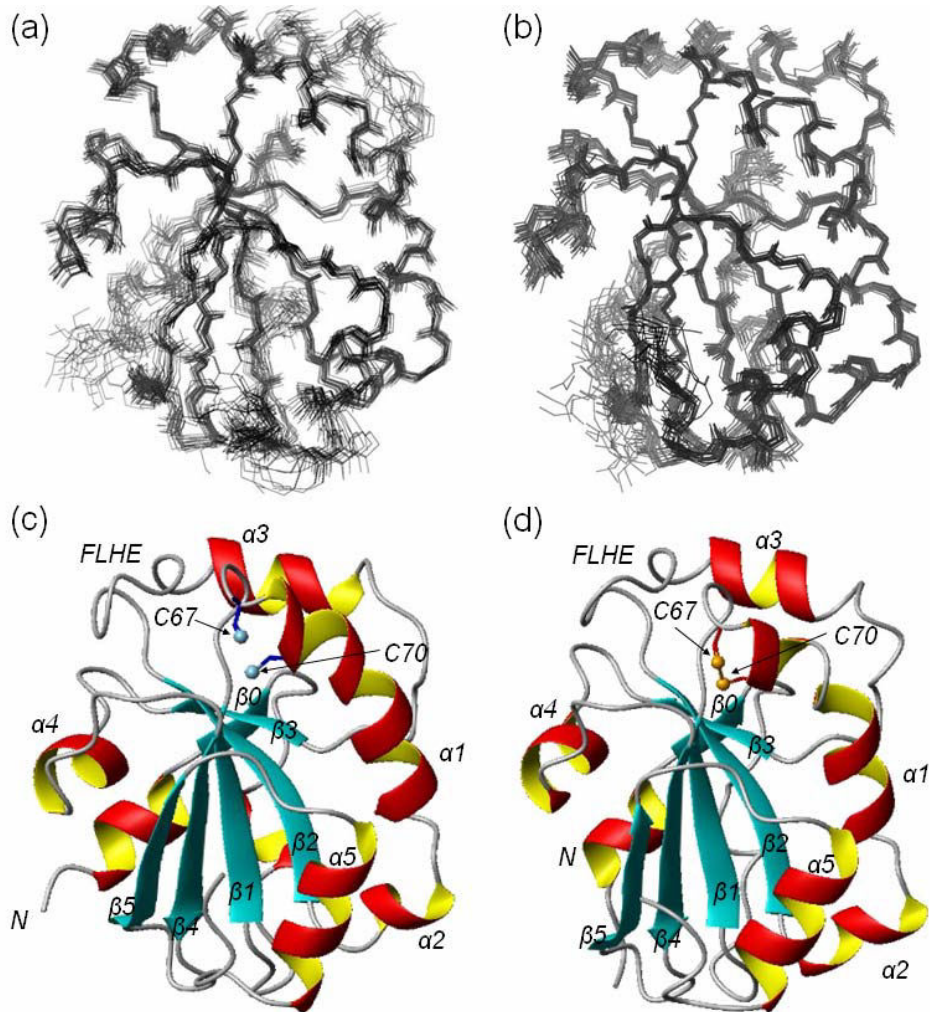


Figure 45 : Représentation de l'ensemble des 20 meilleures structures, en solution aqueuse, de NterPilB sous forme réduite (a) et sous forme oxydée (b). Les cystéines 67 et 70, les éléments de structures secondaires et la boucle FLHE sont figurés sur la structure la plus représentative de la forme réduite (c) et sur la structure la plus représentative de la forme oxydée (d).

Cependant, des changements structuraux, certes mineurs mais dépendant de l'état rédox, sont visibles sur la longueur de certains brins β et au niveau de la partie N-terminale de la protéine où les hélices α_0 et α_{10} ainsi que le brin β_0 ne sont pas clairement définis. De façon plus approfondie, l'analyse des angles diédraux Φ et Ψ du squelette peptidique (Figure 46) souligne des réarrangements structuraux subtils au sein des segments formant le site actif. Non seulement cela concerne les deux résidus cystéine mais aussi les résidus Leu100 et His101 de la boucle FLHE, et les résidus des boucles β_2 - α_3 et β_5 - α_5 . Tous ces résidus sont spatialement proches du motif CXXC.

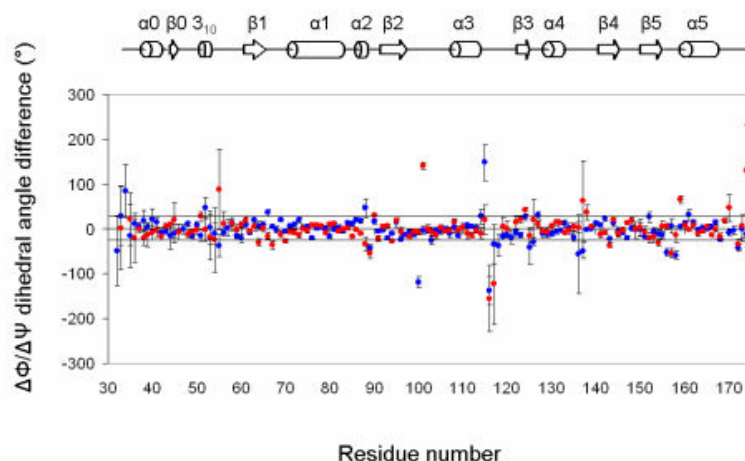


Figure 46 : Représentation des différences de variation des angles dièdres Φ (rouge) et Ψ (bleu) induit par l'état d'oxydation de NterPilB

III.2. Etude des paramètres de relaxation des noyaux ^{15}N du squelette peptidique des deux formes de NterPilB

Les vitesses de relaxation longitudinale et transversale et le $n\text{Oe } ^1\text{H-}^{15}\text{N}$ (déterminées grâce au logiciel NmrviewJ) des noyaux ^{15}N du squelette des formes réduite et oxydée de NterPilB (mesurée à pH 7,0) ont été analysés selon deux approches : (i) la cartographie de densité spectrale et (ii) l'analyse appelée « model-free » dérivant des modèles de Lipari-Szabo (effectuée grâce au logiciel Tensor2). Ces deux approches, combinées l'une à l'autre, permettent d'estimer le mouvement global de la protéine ainsi que les mouvements internes du squelette peptidique.

Dans le cas de NterPilB, il en ressort que les deux états rédox de la protéine possèdent des caractéristiques dynamiques comparables. Hormis les parties N- et C- terminales, classiquement flexibles dans les protéines, des mouvements rapides et/ou lents sont observés dans les boucles $3_{10}\text{-}\beta 1$, $\beta 1\text{-}\alpha 1$ (contenant le motif CXXC), $\beta 2\text{-}\alpha 3$ (contenant les résidus $_{99}\text{FLHE}_{102}$), $\alpha 4\text{-}\beta 4$ et $\beta 5\text{-}\alpha 5$. Ces segments, excepté la portion $3_{10}\text{-}\beta 1$, se trouvent dans le proche entourage spatial des cystéines. Toutefois, la comparaison des profils dynamiques des formes réduite et oxydée montre des différences notables pour les résidus de la boucle $\beta 1\text{-}\alpha 1$ mais aussi, plus particulièrement, pour His101. Ce dernier présente un terme d'échange R_{ex} très important pour la forme réduite.

Des mesures de relaxation à pH 5,5 ont ensuite montré que la valeur du terme d'échange de His101 de NterPilB_{red} chutait fortement avec le pH. Cette titration de la protéine par le pH a permis de dégager une valeur de pKa de 6,8 pour la chaîne latérale du résidu His101.

III.3. Discussion

Les formes RMN et RX de NterPilB_{red} ont été comparées. Il en résulte un très bon recouvrement du squelette et des hétéroatomes. L'utilisation des serveurs DALI et VAST a permis de classer NterPilB dans la famille structurale des CMP (pour « Cytochrome Maturation Protein ») avec, pour nouveau membre, la protéine YkuV de *Bacillus subtilis* non encore décrite comme homologue à NterPilB. Cette protéine YkuV, comparée à NterPilB, est d'autant plus intéressante qu'elle possède, elle aussi, une insertion de 7 résidus en comparaison avec DsbE, protéine classée comme le meilleur homologue de NterPilB. Aux résidus ⁹⁹FLHE₁₀₂ de NterPilB correspondent les résidus ⁷¹RSED₇₄ de YkuV (Figure 47).

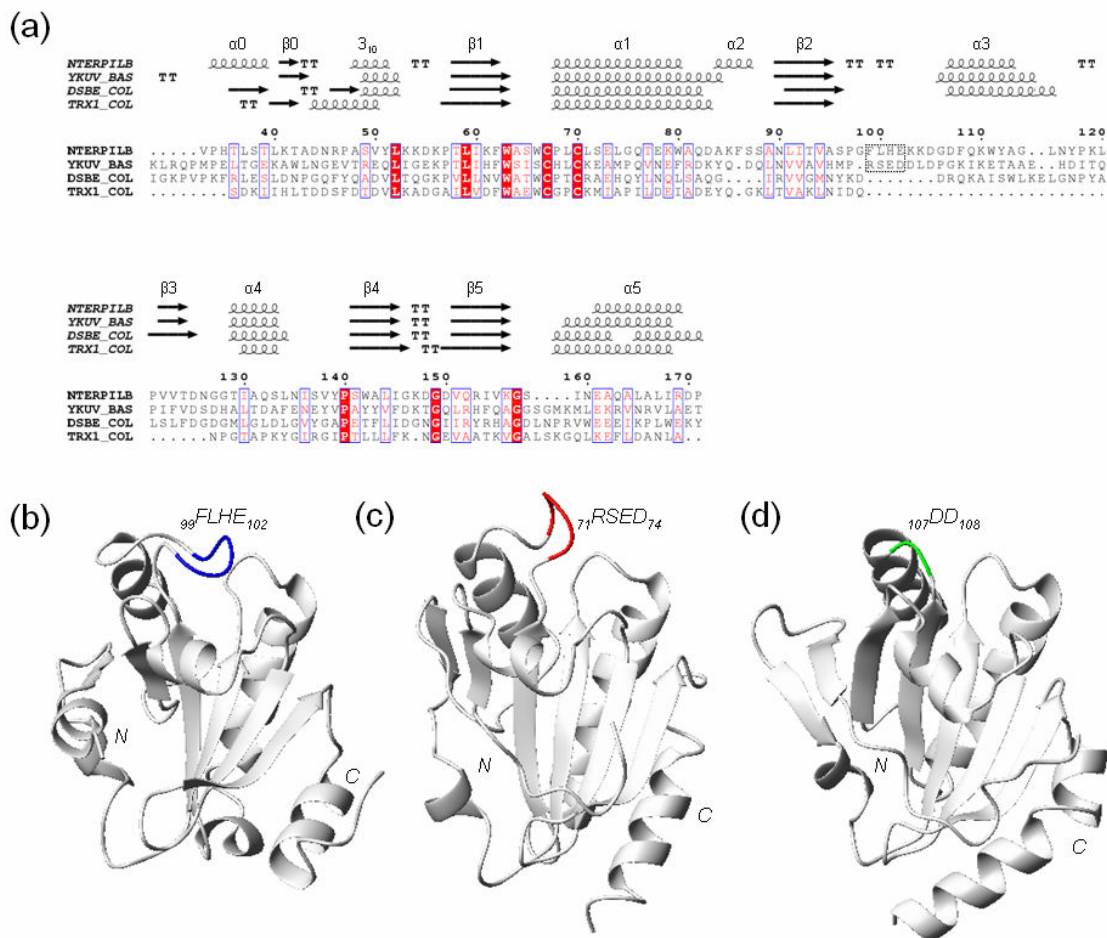


Figure 47 : Alignement des séquences de NterPilB de *N. meningitidis*, d'YkuV de *B. subtilis*, de DsbE d'*E. coli* et de Trx1 d'*E. coli* en fonction de leurs structures primaires et tridimensionnelles (a). Les éléments de structures secondaires sont représentés au-dessus des séquences. Sont aussi représentées les structures tridimensionnelles de NterPilB de *N. meningitidis* sous forme réduite identifiée par RMN (b), d'YkuV de *B. subtilis* sous forme réduite obtenue par RMN (c) et de DsbE d'*E. coli* sous forme oxydée obtenue par RX. Les boucles supplémentaires de NterPilB et de YkuV sont indiquées en bleu et rouge respectivement. Leur site d'insertion sur la structure de DsbE est indiqué en vert.

Les paramètres dynamiques obtenus sur NterPilB ont été comparés à ceux disponibles pour YkuV de *Bacillus subtilis*, Trx m de *Chlamydomonas reinhardtii* et Trx d'*Escherichia coli*, seules protéines appartenant à la famille CMP et pour lesquelles on dispose de données de relaxation. Globalement, il en ressort que les segments présentant des termes de mobilité singuliers sont les mêmes dans toutes ces

protéines. Cependant, l'échelle de temps de ces mouvements peut varier. Il est proposé que cette particularité puisse contribuer à la spécificité de substrat.

Au niveau du site actif, des changements structuraux subtils peuvent être mis en évidence avec la présence du pont S~S, comme la formation (i) d'une cassure de l'hélice $\alpha 1$ prolongeant le motif CXXC et (ii) d'un coude induisant une déviation dans l'orientation des deux parties de cette hélice $\alpha 1$. Toutefois, le positionnement des chaînes latérales des résidus du site actif dans les états réduit et oxydé ne présentent pas de différences significatives. Il est d'ailleurs à noter que pour la majorité des CMP, la formation d'un pont disulfure n'engendre pas de changements majeurs des structures secondaire et tertiaire. Un examen plus en profondeur concernant les angles dièdres de NterPilB réduit et oxydé a permis, cependant, de montrer que des différences significatives dans l'orientation de la chaîne peptidique pouvaient être observées selon l'état rédox de la protéine. Ce sont notamment les acides aminés environnant le site actif qui sont concernés par ces observations, l'authenticité de ces changements structuraux étant supportée par les variations de déplacements chimiques observées sur les groupements amide et carbonyle (atomes H^N , N , et C^O) des résidus concernés. L'analyse dynamique du site actif suggère, quant à elle, la présence de mouvements dans le domaine de la μs à la ms pour le site actif, mais combinée à une rigidité dans le domaine des mouvements rapides.

Les paramètres structuraux et dynamiques ont ensuite été analysés de façon plus approfondie au niveau de la boucle ${}_{99}FLHE_{102}$ de NterPilB. Cette boucle surplombe le site actif et se positionne de façon similaire selon les formes RMN et RX de NterPilB_{red}. En comparant les structures RMN des deux états rédox de NterPilB, on peut toutefois remarquer que les groupements carbonyle du résidu Leu100 et amide du résidu His101 adoptent une orientation opposée, même si le positionnement des chaînes latérales reste le même. Quant aux caractéristiques dynamiques de cette boucle, l'étude des paramètres de relaxation à pH 7,0 et 5,5 a montré que le terme d'échange chimique de large amplitude du résidu His101, observé pour la forme réduite de NterPilB, devait refléter l'équilibre protonation/déprotonation de la chaîne latérale imidazole. De plus, cette boucle ne présente pas de mouvements dit rapides et peut donc être considérée comme rigide et ce, quel que soit l'état d'oxydation (même si les profils de densité spectrale présentent quelques différences). Ces résultats sont très comparables à ce qui est observé dans la boucle ${}_{71}RSED_{74}$ de YkuV. Contrairement au cas de NterPilB, cette boucle, elle aussi bien définie dans l'ensemble des structures RMN de YkuV, pointe non pas vers le motif CXXC, mais vers le solvant. Elle ne présente pas de dynamique particulière mais un modèle de docking impliquant YkuV et ArsC de *B. subtilis* montre que cette boucle est proche de la zone d'interaction entre ces partenaires. Cela suggère (i) qu'un segment bien défini et ne présentant pas de paramètres dynamiques d'amplitude importante peut aussi être impliqué dans la reconnaissance du partenaire biologique, et (ii) que l'orientation d'un tel segment peut être un paramètre important pour la spécificité de substrat.

En conclusion, cette étude par RMN montre que NterPilB, sous ses deux formes, possède une boucle bien structurée surplombant une face de son site actif. Tout comme peut le faire Trx1_{red} d'*E. coli*, nous savons que NterPilB_{red} est capable de réduire un domaine de Msr sous forme oxydée. Cependant,

NterPilB_{ox} n'est pas régénéré par le système Trx réductase d' *E. coli* et NterPilB_{red} n'est pas capable de réduire les domaines Msr d' *E. coli*. Nous avons montré, notamment grâce à l'étude des angles dièdres des deux formes réduite et oxydée de la protéine, que des réarrangements structuraux subtils intervenaient lors du passage à l'état oxydé de NterPilB. Ces modifications interviennent au niveau des résidus à proximité du motif CXXC et, de façon surprenante, pour les résidus Leu et His de la boucle FLHE. Cependant, notre étude dynamique n'a mis en évidence aucune flexibilité pour cette boucle, quel que soit l'état d'oxydation de la protéine. La question du rôle de cette boucle est alors posée : deux hypothèses peuvent être ainsi avancées :

L'équipe du MAEM a montré que le domaine N-terminal de DsbD de *N. meningitidis* était probablement le partenaire réducteur de NterPilB_{ox}. Cependant, nDsbD est capable de réduire d'autre protéine présentant un repliement de type Trx (DsbE, DsbC, DsbG et cDsbC) mais ne présentant pas d'insertion similaire à la boucle FLHE. Cela suggère fortement que la boucle n'est pas un facteur discriminant pour l'interaction entre NterPilB et nDsbD. De plus, la purification récente, par l'équipe du MAEM, de DsbE de *N. meningitidis* a permis de montrer que sa cinétique de réduction par nDsbD était du même ordre de grandeur que celle de NterPilB, ce qui vient conforter cette hypothèse. La boucle FLHE pourrait ainsi promouvoir l'interaction spécifique avec les domaines Msr de PilB. Cette hypothèse est d'autant plus probable que l'équipe du MAEM a montré que NterPilB réduit efficacement le domaine MsrB de PilB alors que DsbE de *N. meningitidis* en est incapable.

Ces conclusions ouvrent la porte à quelques perspectives. L'étude structurale et dynamique d'un complexe mixte entre NterPilB et le domaine MsrB ainsi que la caractérisation enzymatique d'un mutant de délétion FLHE de NterPilB pourraient, toutes deux, apporter des éléments de réponse aux questions posées précédemment.

III.4. Publication

Pour plus de détails sur l'analyse structurale et dynamique par RMN de NterPilB sous ses deux formes réduite et oxydée, l'article de *Biochemistry* est disponible dans sa totalité ci-après.

Solution Structure and Dynamics of the Reduced and Oxidized Forms of the N-Terminal Domain of PilB from *Neisseria meningitidis*[†]

Marc Quinternet,[‡] Pascale Tsan,[‡] Fabrice Neiers,[§] Chrystel Beaufls,[‡] Sandrine Boschi-Muller,[§] Marie-Christine Averlant-Petit,[‡] Guy Branlant,^{*,§} and Manh-Thong Cung^{*,‡}

Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire, UMR 7568 CNRS-INPL, Nancy Université, 1 rue Grandville, B.P. 20451, 54001 Nancy Cedex, France, and Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, UMR 7567 CNRS-UHP, Nancy Université, Faculté des Sciences et Techniques, Bld des Aiguillettes, B.P. 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

Received May 13, 2008; Revised Manuscript Received June 24, 2008

ABSTRACT: The secreted form of the PilB protein was proposed to be involved in pathogen survival fighting against the defensive host's oxidative burst. PilB protein is composed of three domains. The central and the C-terminal domains display methionine sulfoxide reductase A and B activities, respectively. The N-terminal domain, which possesses a CXXC motif, was recently shown to regenerate *in vitro* the reduced forms of the methionine sulfoxide reductase domains of PilB from their oxidized forms, as does the thioredoxin 1 from *E. coli*, via a disulfide bond exchange. The thioredoxin-like N-terminal domain belongs to the cytochrome maturation protein structural family, but it possesses a unique additional segment (⁹⁹)FLHE₍₁₀₂₎ localized in a loop. This segment covers one edge of the active site in the crystal structure of the reduced form of the N-terminal domain of PilB. We have determined the solution structure and the dynamics of the N-terminal domain from *Neisseria meningitidis*, in its reduced and oxidized forms. The FLHE loop adopts, in both redox states, a well-defined conformation. Subtle conformational and dynamic changes upon oxidation are highlighted around the active site, as well as in the FLHE loop. The functional consequences of the cytochrome maturation protein topology and those of the presence of FLHE loop are discussed in relation to the enzymatic properties of the N-terminal domain.

Various pathogenic and invasive bacteria such as *Neisseria meningitidis* have recourse to methionine sulfoxide reductase (Msr)¹ to repair oxidative damages caused on protein methionine residues by the immune system of their host. Two stereospecific Msrs reduce, back to methionine, one of the two isomers of the methionine sulfoxide function (MetSO) formed upon oxidation. MsrA is specific of the Met-(S)-SO, while MsrB reduces only the Met-(R)-SO. Although completely distinct in both their primary, secondary, and tertiary structures, MsrA and MsrB follow a similar three-step catalytic mechanism involving in the last step the reduction,

by thioredoxin (Trx), of the oxidized Msr under disulfide state (1–3). Examples of the fusion of the MsrA and MsrB domains into a single protein are known. In that context, the PilB proteins from *Neisseria* genus, *Fusobacterium nucleatum*, and *Psychrobacter cryohalolentis*² are unique in that they possess a supplementary N-terminal domain. In fact, two protein forms in *Neisseria gonorrhoeae* were shown to be produced *in vivo* (4). One form, which contains the three domains, i.e., the N-terminal domain and the central and C-terminal domains that display MsrA and MsrB activities, respectively (2), is secreted from the bacterial cytoplasm to the outer membrane, whereas the second form, which is cytoplasmic, only contains the Msr domains. The secreted form was proposed to be involved in the pathogen survival fighting against the defensive host's oxidative burst.

Recently, the N-terminal domain (NterPilB) from *Neisseria meningitidis* was shown to display disulfide oxidoreductase activity toward the PilB Msr domains *in vitro* (5). The structure in its reduced form (NterPilB_{red}) as well as that from *N. gonorrhoeae* was determined by X-ray crystallography (6, 7). The analysis of NterPilB_{red} X-ray structure from *N. meningitidis* (6) has revealed strong structural

[†] This research was supported by the CNRS, the Universities of Nancy I and INPL, the IFR 111 Bioingénierie, the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC-N° 5436), and the French Ministry of Research (ACI BCMS047). F.N. and M.Q. gratefully thank the French Ministry of Research, the CNRS, and the Région Lorraine for financial support.

* To whom correspondence should be addressed. M.-T.C.: phone, (33) 3 83 17 51 07; fax, (33) 3 83 37 99 77; e-mail, Manh-Thong.Cung@ensic.inpl-nancy.fr. G.B.: phone, (33) 3 83 68 43 04; fax, (33) 3 83 68 43 07; e-mail, guy.branlant@maem.uhp-nancy.fr.

[‡] Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire, UMR 7568 CNRS-INPL, Nancy Université.

[§] Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, UMR 7567 CNRS-UHP, Nancy Université.

¹ Abbreviations: CMP, cytochrome maturation protein; CSA, chemical shift anisotropy; DTT, dithiothreitol; HSQC, heteronuclear single-quantum coherence; Met-(S)-SO, L-methionine (S)-sulfoxide; Met-(R)-SO, L-methionine (R)-sulfoxide; Msr, methionine sulfoxide reductase; NMR, nuclear magnetic resonance; NOE, nuclear Overhauser effect; NOESY, NOE spectroscopy; NterPilB, N-terminal domain of PilB protein from *Neisseria meningitidis*; rms, root mean square; rmsd, rms deviation.

² The PilB organization from the *Neisseria* genus is also present in the genome of *Fusobacterium nucleatum*, a Gram-negative anaerobe human opportunistic pathogen, and of *Psychrobacter cryohalolentis*, a Gram-negative coccobacille capable of growth at temperatures below 4 °C.

homologies with DsbEs.³ DsbEs like CcmG from *Escherichia coli* (8), CycY from *Bradyrhizobium japonicum* (9), TlpA from *Bradyrhizobium japonicum* (10), and ResA from *Bacillus subtilis* (11) are enzymes which are involved in cytochrome maturation pathway. Like the X-ray structures of these cytochrome maturation proteins (CMPs) (12–15), the overall structure of NterPilB consists of a Trx-like fold defined as a mixed four-stranded β -sheet surrounded by three α -helices, with two insertions compared to the canonical Trx-fold. The first insertion, from Val33 to Lys56 residues, is located in the N-terminal region, the numbering following that of the entire PilB from *N. meningitidis* (2). The second insertion, from Phe99 to Asn126 residues, gives rise to an additional β -strand and an α -helix. However, NterPilB differs from the CMPs by the presence of an additional loop (99)FLHE₍₁₀₂₎ in the second insertion, near the active site. Recently, Zhang et al. (16) have solved by NMR the solution structures of the reduced and oxidized forms of YkuV from *B. subtilis* whose function remains to be determined but which possesses a CMP topology, with an additional loop as NterPilB.

In the present study, we have determined the solution structure of NterPilB in its reduced (NterPilB_{red}) and oxidized (NterPilB_{ox}) forms and characterized their dynamic properties. The results are compared between the two redox forms so as to detect possible structural or dynamic changes occurring upon the formation of the disulfide bond between Cys67 and Cys70. The functional consequences of the CMP topology and those of the presence of FLHE loop are discussed in relation to the enzymatic properties of NterPilB.

MATERIALS AND METHODS

Sample Preparation. The *E. coli* strain used for NterPilB (Δ 33–175) production was BL21-DE3 pLysS transformed with a pETNterPilB plasmid. ¹⁵N- and ¹⁵N/¹³C-labeled samples were prepared by growing cells in a minimal media with ¹⁵NH₄Cl as the sole nitrogen source and with glucose, ¹³C-labeled or not, as the only carbon source. The Nter-PilB production was induced at an OD₆₀₀ of 0.6 by addition of 1 mM IPTG and harvested after 4 h for the ¹⁵N/¹³C protein and 16 h for the ¹⁵N protein. Purification was done as previously described (5), and sample purity and molecular mass were checked by SDS-PAGE and electrospray mass spectrometry, respectively. The oxidation of the NterPilB was achieved by incubating NterPilB (0.5 mM) with 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (1 mM) in a degassed solution of 10 mM phosphate buffer, pH 7.0 at room temperature, for 10 min whereas the reduced form sample was kept in its reduced state by adding 50 mM 1,5-dithiothreitol-*d*₁₀. The two samples were isolated by gel filtration on an Econo-Pac 10 DG column (Bio-Rad Laboratory) equilibrated with 10 mM phosphate buffer, pH 7.0. The oxidation state of the N-terminal domain was checked by

titration with DTNB as previously described (5). The NMR sample contained 0.5 mM protein concentration (95% H₂O, 5% D₂O) in 30 mM phosphate buffer at pH 7.0 (Cambridge Isotope Laboratories).

NMR Spectroscopy. All spectra were acquired at 298 K on a Bruker DRX 600 MHz spectrometer equipped with a TCI cryoprobe. Spectra were processed using the program XWINNMR (Bruker) and analyzed with the programs XEASY (17) and CARA (18). TSP-*d*₄ (Euriso-top) was used as an internal reference for ¹H chemical shift whereas indirect referencing was used for ¹³C and ¹⁵N chemical shifts (19). Backbone amide ¹HN, ¹⁵N, ¹³C^α, ¹H^α, ¹³C', and side-chain ¹H, ¹³C resonances were assigned using ¹H–¹⁵N HSQC, HNCO, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, CBCANH, CB-CA(CO)NH, and HNHA experiments. HNHB, HCCH-TOCSY, CC(CO)NH, and ¹H–¹⁵N, ¹H–¹³C HSQC-NOESY spectra at two different mixing times (70 and 100 ms) were also performed for side-chain assignments. Hydrogen bonds were identified using slow amide proton exchange in D₂O solution (20) and temperature dependence at five different temperatures (287, 291, 296, 298, and 305 K) (21).

Structure Calculations. Interproton distance restraints were derived from three-dimensional ¹H–¹³C/¹⁵N HSQC-NOESY experiments. The NOE cross-peaks were first classified as strong, medium, and weak and converted into upper limits of 2.5, 3.5, and 5.5 Å and then refined after the first run of calculation. Restraints for the pseudoatoms were systematically overestimated. Each hydrogen bond restraint was defined as a couple of distance restraints with an upper limit of 2.4 Å between the acceptor heavy atom and the hydrogen atom and an upper limit of 3.3 Å between the acceptor and donor heavy atoms. Restraint for the disulfide bond was defined as a set of three distance restraints: the distance between the two sulfur atoms S^γ_i and S^γ_j lies between 2.0 and 2.1 Å; the distance between the C^β_i and S^γ_j lies between 3.0 and 3.1 Å; the distance between S^γ_i and C^β_j lies between 3.0 and 3.1 Å. Torsion restraints for the Φ and Ψ angles were derived from the program TALOS (22), and all of the peptide bonds were kept planar and *trans*, with the exception of that between Tyr139 and Pro140 which was restrained to be planar and *cis*, on the basis of the C^β and C^γ chemical shifts of Pro140 (δ _{C^β} = 35.44 ppm, δ _{C^γ} = 25.21 ppm) (23).

A total of 1000 randomized structures were calculated, and the simulated annealing process was performed for the reduced and the oxidized forms of NterPilB using respectively the programs DYANA (24) and CYANA (25). The 20 structures with the lowest target function were selected and refined using DISCOVER (Accelrys Inc., San Diego, CA). Figures were drawn with the programs MOLMOL (26) and INSIGHT II.

¹⁵N Relaxation Experiments. The ¹⁵N longitudinal relaxation rate (*R*₁), ¹⁵N transverse relaxation rate (*R*₂), and the steady-state {¹H}–¹⁵N heteronuclear NOE experiments were recorded at 298 K on a Bruker 600 MHz spectrometer, using the usual pulse sequences (27). A total of 256 (¹⁵N) and 2048 (¹H) complex points were collected for the *R*₁ and *R*₂ experiments, with 8 transients/increment and a recycle delay of 5 s. Ten inversion recovery delays of 2, 50, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000, and 1200 ms were used for *R*₁ measurement, whereas eight delays of 8, 16, 32, 48, 64, 80, 112, and 144 ms were used during the CPMG (Carr–Purcell–Meiboom–Gill) period of the *R*₂ experiments. {¹H}–¹⁵N

³ Abbreviations: DsbE, disulfide bond formation; CcmG, cytochrome *c* maturation protein from *Escherichia coli*; TlpA, membrane-anchored thioredoxin-like protein from *Bradyrhizobium japonicum*; CycY, membrane-anchored periplasmic thioredoxin-like protein from *Bradyrhizobium japonicum* (it is the product of *cycY*, the last gene in a cluster of cytochrome *c* biogenesis genes); ResA, extracytoplasmic membrane-bound thiol–disulfide oxidoreductase required for cytochrome *c* maturation in *Bacillus subtilis*; YkuV, protein encoded by the *ykuV* gene from *Bacillus subtilis*.

NOE spectra were recorded in an interleaved way with and without proton saturation during relaxation delay, using 256×2 (^{15}N) and 2048 (^1H) complex points and 56 transients/increment typically. The ^{15}N saturation was achieved by the application of 120° ^{15}N pulses separated by 5 ms, for a period of 4 s. Spectral widths for all heteronuclear experiments were 2433 Hz (^{15}N) and 8389 Hz (^1H) with carrier frequencies at 117.6 and 4.70 ppm, respectively. Data were processed using XWINNMR (Bruker). They were zero-filled in the ^{15}N dimension and apodized with shifted square sine-bell window in both dimensions.

Backbone Dynamics Analysis. NMRVIEW software (28) version 6.6.2 was used to measure the peak heights of the ^{15}N – ^1H cross-peaks and to determine the R_1 and R_2 values from a fit to a single-exponential decay function and also the $\langle\{^1\text{H}\}\text{--}^{15}\text{N}$ heteronuclear NOE from the ratio between the intensities of a peak in the spectra collected with and without proton saturation, respectively. All experiments were performed twice to provide an estimation of the uncertainty on R_1 , R_2 , and NOE values.

R_1 , R_2 , and NOE relaxation parameters were analyzed by means of reduced spectral density mapping at $J_{\text{eff}}(0)$, $J(\omega_{\text{N}})$, and $\langle J(\omega_{\text{H}}) \rangle$ values (29–32), using a chemical shift anisotropy of -160 ppm for the backbone amide group (33) and a NH bond length of 1.02 \AA . $J_{\text{eff}}(0)$ denotes that the exchange contribution to R_2 is not explicitly considered (34). $\langle J(\omega_{\text{H}}) \rangle$ is the average of $J(\omega_{\text{H}})$, $J(\omega_{\text{H}} + \omega_{\text{N}})$, and $J(\omega_{\text{H}} - \omega_{\text{N}})$ which can be approximated by $J(0.87\omega_{\text{H}})$ (29).

Tensor2 (35) was used for the Lipari–Szabo analysis (36, 37) of the backbone ^{15}N relaxation parameters. Only residues in secondary structure elements were used for determination of the overall tumbling.

pH Titration. A 0.5 mM sample of NterPilB in 10 mM phosphate buffer initially at pH 7 was used for the chemical shift titration. The pH was adjusted by adding small volumes of 1 N HCl or NaOH solutions. TROSY experiments were recorded at nine pH values: 5.50, 6.05, 6.56, 6.88, 7.13, 7.41, 7.71, 8.11, and 8.61 for the reduced form; 5.53, 5.92, 6.29, 6.68, 6.93, 7.30, 7.69, 8.04, and 9.02 for the oxidized form. The pH of the sample was measured before and after the recording of each spectrum, and the average value was taken as the effective pH. Proton chemical shifts of each residue were fitted to $\delta_{\text{obs}} = \delta_{\text{d}} + \Delta\delta/[1 + 10^{(\text{pH} - \text{pK}_{\text{a}})}]$ using KALEIDAGRAPH (Synergy Software, Reading, PA).

RESULTS

Structure Calculations of NterPilB_{red} and NterPilB_{ox}. NterPilB has been studied in a soluble form ranging from Val33 to Leu175. The chemical shift assignments for the reduced and oxidized forms have been reported previously (38, 39). For these two forms, a nearly complete assignment of the backbone and of the side chains has been realized except for the sequence Val33 to His35, residues Ser137 and Pro171. Residues Thr36, Tyr51, Lys54, and Ala84 on the one hand and residues Val50 and Lys61 on the other hand remain only partially assigned in the reduced and in the oxidized forms, respectively. There are approximately 30% fewer short-range and long-range NOE correlations for the reduced form, mainly in the Ser49–Asp55, Gln109–Pro118, and Ala166–Leu175 regions for which several residues are stacked with others. The corresponding NOE correlations

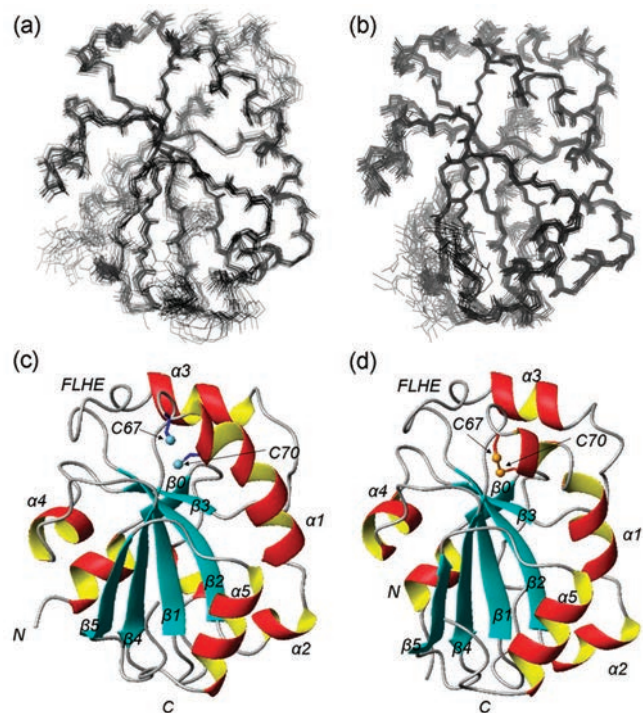


FIGURE 1: Solution structures of both forms, reduced and oxidized, of NterPilB. Backbone superimpositions from Thr39 to Asp170 residues are shown for 20 representative structures of the reduced NterPilB (a) and of the oxidized NterPilB (b). The different secondary structure elements are figured on the most representative structure for the reduced NterPilB_{red} (c) and for the oxidized NterPilB_{ox} (d). The Cys side chains are indicated in blue and red for the reduced and the oxidized forms, respectively. The sulfur atoms of Cys67 and Cys70 are drawn as blue balls for the reduced form and as orange balls for the oxidized form.

are unclear, which led us to ignore them in the structure calculations.

The NMR solution structures of both forms were calculated using NOE-derived restraints, backbone dihedral angle restraints derived from TALOS prediction, and hydrogen bond restraints obtained from the $^1\text{H}/^1\text{H}$ exchange combined to the temperature dependence experiments. The superimpositions of the 20 representative structures for each form are shown in Figure 1a,b and the structural statistics for both forms are summarized in Table 1.

For the NterPilB_{red}, no distance restraint violation greater than 0.1 \AA and no dihedral angle violation greater than 5° are found. According to PROCHECK-NMR analysis, all the non-glycine and the non-proline residues lie in the authorized regions of the Ramachandran plot. For residues Thr39 to Asp170, the 20 structures exhibit an atomic rmsd from the mean structure of $0.79 \pm 0.13 \text{ \AA}$ for the backbone atoms and $1.54 \pm 0.13 \text{ \AA}$ for all heavy atoms. By excluding the regions with high rmsds (Supporting Information Figure S1) and thus keeping only the well-defined Leu40–Ala48, Lys56–Gln109, and Lys119–Leu165 segments which represent 76% of the backbone, the atomic rmsds fall to $0.50 \pm 0.08 \text{ \AA}$ for the backbone atoms and $1.01 \pm 0.13 \text{ \AA}$ for all heavy atoms.

For the NterPilB_{ox}, three distance restraint violations greater than 0.1 \AA and two dihedral angle violations greater than 5° are observed. According to PROCHECK-NMR analysis, 79.0% of the non-glycine and the non-proline residues remain in the most favored regions of the Ramachandran plot whereas 19.4% of the whole residues are in

Table 1: NMR-Derived Geometrical Restraints and Structural Statistics of the Entire Conformational Set of Reduced NterPilB_{red} and Oxidized NterPilB_{ox}

restraint	NterPilB _{red}	NterPilB _{ox}
upper interproton		
total of distance restraints	2378	2351
intra	819	455
short	485	638
medium	410	428
long	498	671
H-bonds ^a	166	156
SS bond ^b	0	3
dihedral angle	154	169
Φ	77	86
Ψ	77	83
distance violation		
>0.1 Å	0	3
>0.2 Å	0	0
dihedral violation		
>5°	0	2
Ramachandran statistics (PROCHECK-NMR)		
residues in the most favorable region (%)	85.5	79.0
residues in additionally allowed regions (%)	12.6	19.4
residues in generously allowed regions (%)	1.6	0
residues in disallowed regions (%)	0	1.6
rmsd (Å)		
backbone atoms (residues 39–170)	0.79 ± 0.13	0.57 ± 0.13
heavy atoms (residues 39–170)	1.54 ± 0.13	1.27 ± 0.17

^a Each hydrogen bond is treated as two distance restraints so that 83 hydrogen bonds lead to 166 distance restraints. ^b Each SS bond is treated as three distance restraints.

the additionally allowed regions and 1.6% of the residues (corresponding to Leu100 and to Asp174) are in the disallowed regions. For residues Thr39 to Asp170, the 20 structures exhibit an atomic rmsd from the mean structure of 0.57 ± 0.13 Å for the backbone atoms and 1.27 ± 0.13 Å for all heavy atoms. In the oxidized form, fewer problems of signal overlapping were encountered, which explains that up to 91% of the backbone is well defined (Supporting Information Figure S1). However, if we only retain the previously selected regions (Leu40-Ala48, Lys56-Gln109, and Lys119-Leu165) to provide a comparison with the reduced form, the atomic rmsds become 0.45 ± 0.08 Å for the backbone atoms and 1.07 ± 0.13 Å for all heavy atoms. In these regions, the rmsd values are therefore similar in the two redox states (the comparison between the structures of the two forms leads to rmsds of 0.82 Å for the backbone atoms and 1.22 Å for all heavy atoms).

With the exception of Ala, Gly, and Pro residues, analysis of the χ_1 values and their standard deviations shows that 69% and 64% of residues are well defined respectively for the oxidized and reduced forms. In particular, the low values of standard deviations associated to χ_1 values show that the side chain of most residues of the active site (Trp63-Glu73) and its vicinity (Ser137-Tyr139) and of the loop FLHE (Phe99-Glu102) are well defined. The Φ and Ψ dihedral angles are calculated for the mean structure, and their standard deviations are estimated from those of the 20 representative structures. In parallel to atomic rmsds, all Φ and Ψ dihedral angles are well defined with low standard deviations except for the Met32-Thr36, Asp44-Asn45, Leu52-Lys56, Leu115-Pro118, Asp125-Asn126, Ile136-Ser137, and Ala173-Leu175 sequences for which large standard deviation values are observed and are indicative of less defined structural parts. Conformational changes are highlighted by the large difference of the Φ and Ψ dihedral angle values by comparing

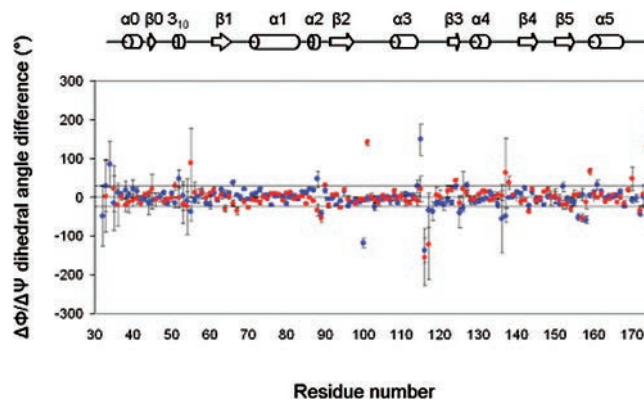


FIGURE 2: Graphical representation of the difference of Φ and Ψ dihedral angle values between the reduced and the oxidized forms along the amino acid sequence of NterPilB. The red and the blue circles represent the variation of Φ and Ψ values upon redox state, respectively. The horizontal lines at 25° and -25° delimit the regions that undergo significant Φ and Ψ dihedral angle changes. Secondary structures, derived from the NMR structures, of the NterPilB are shown above.

the well-defined parts of NterPilB (Figure 2). The standard deviations of the dihedral value differences are taken as the sum of the individual standard deviations of Φ and Ψ calculated for the reduced and oxidized forms.

Structure Analysis of Reduced and Oxidized NterPilB. The overall structures of NterPilB_{red} and NterPilB_{ox} are very similar (Figure 1c,d). The core of both forms exhibits mainly a five-stranded β -sheet composed of parallel (p) and anti-parallel (a) individual strands. These latter are arranged in a $\beta_3(p)\beta_2(p)\beta_1(a)\beta_4(a)\beta_5(a)$ pattern and comprise consensually, in both forms, residues Thr58 to Phe62 for β_1 , Asn90 to Ala95 for β_2 , Val122 to Thr125 for β_3 , Ser 141 to Ile145 for β_4 , and Val151 to Val155 for β_5 . This main β -sheet network is flanked by five helices comprising consensually residues Pro68 to Trp80 for α_1 , Ala84 to Ser87 for α_2 , Asp107 to Tyr112 for α_3 , Thr129 to Ser133 for α_4 , and Glu161 to Arg169 for α_5 . In NterPilB_{red}, the five helices are α -type helices. In NterPilB_{ox}, the α -helix α_1 is split into two helices separated by a turn formed by residues Ser72 and Glu73, and the helix α_2 is defined as a 3_{10} -helix instead of an α -helix.

The detection of hydrogen-bonded NH groups in the N-terminal region (residues Val33 to Thr39) suggests that this segment may adopt an α -helix organization (helix α_0). However, probably due to the lack of NOE-derived and dihedral informations on these residues, no well-defined secondary structure is obtained, in particular for NterPilB_{ox}. The large dispersion of this segment, as indicated by its high rmsd values (1.57 ± 0.67 Å and 0.99 ± 0.43 Å for the backbone of NterPilB_{ox} and NterPilB_{red} respectively), probably disturbs the stabilization of the β_0 strand. Indeed, an additional little antiparallel β_0 strand, comprising the residues Lys41 and Thr42, is present in 14 out of the 20 selected structures of NterPilB_{red} and in 10 out of the 20 selected structures of NterPilB_{ox}. Moreover, an additional 3_{10} -helix comprising residues Ala48 to Tyr51 is present in 17 of the 20 selected structures of NterPilB_{red} and only in 8 of the 20 selected structures of NterPilB_{ox}, this probably due to the poor assignment of Val50 in the oxidized form in spite of measured hydrogen-bonded NH groups.

Two other regions, far from the active site and for which few NOEs are observed, are also ill-defined: in the vicinity

of Lys54 in both redox forms, and the 113–117 segment, especially in the reduced form. For these segments and for the N- and C-terminal parts, the Φ and Ψ dihedral angle values differ notably between the reduced and oxidized forms. The standard deviation, calculated for the dihedral value differences in these regions which exhibit few NMR restraints, is high (Figure 2). Thus, these differences are not significant. On the other hand, large and significant $\Delta\Phi$ ($\Phi_{\text{ox}} - \Phi_{\text{red}}$) and $\Delta\Psi$ ($\Psi_{\text{ox}} - \Psi_{\text{red}}$) differences of the backbone dihedral angle values [$\Delta\Phi$ for Ala64 ($-30.1 \pm 8.4^\circ$), Cys67 ($-36 \pm 9.6^\circ$), Cys70 ($-27.4 \pm 4.2^\circ$), His101 ($141.1 \pm 7.6^\circ$), Val138 ($37.8 \pm 17.2^\circ$), Gly157 ($-54.5 \pm 9.7^\circ$), Ile159 ($66.4 \pm 9^\circ$) and $\Delta\Psi$ for Trp66 ($36.8 \pm 7.4^\circ$), Leu100 ($-119.2 \pm 11.8^\circ$), Ser137 ($-49.3 \pm 17.5^\circ$), Lys156 ($-52.4 \pm 8.1^\circ$), Ser158 ($-58.5 \pm 9.8^\circ$), Glu161 ($32.9 \pm 12^\circ$), superior to 25° and combined with a weak standard deviation] upon redox change of Nter-PilB are observed for Cys67, Cys70, and neighboring residues (Ala64 and Trp66), as well as for particular residues located in the $\beta 2$ - $\alpha 3$ and $\beta 5$ - $\alpha 5$ loops, that denotes a rearranging of some active site segments.

Analysis of the ^{13}C chemical shift differences of backbone carbonyl groups reveals regions of significant variation between the reduced and the oxidized forms of NterPilB (Supporting Information Figure S2). Residues surrounding the active cysteines are principally perturbed. That concerns residues Phe62, Ala64, Ser65, Cys67 to Ser72, Phe99 to His101, Pro140, and Ser141. These chemical shift data are consistent with the previously reported data concerning backbone amide groups (39) and with local structural changes in the neighborhood of the active site occurring upon oxidation. Other but isolated residues are also perturbed (Leu37, Ala43, Leu52, and Gly118).

^{15}N Relaxation Parameters. The ^{15}N longitudinal relaxation rate (R_1), ^{15}N transverse relaxation rate (R_2), and the steady-state $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N heteronuclear NOE values of NterPilB were measured for 121 and 122 backbone NH groups out of the 135 nonproline residues, respectively in the reduced and oxidized forms (Figure 3). The unanalyzed residues were either unassigned or overlapped. The average values for the backbone ^{15}N nuclei are very similar in the two redox states: $\langle R_1 \rangle = 1.57 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$, $\langle R_2 \rangle = 10.3 \pm 0.3 \text{ s}^{-1}$, $\langle \text{NOE} \rangle = 0.80 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ in the reduced form and $\langle R_1 \rangle = 1.55 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$, $\langle R_2 \rangle = 10.9 \pm 0.2 \text{ s}^{-1}$, $\langle \text{NOE} \rangle = 0.82 \pm 0.02 \text{ s}^{-1}$ in the oxidized form. The relaxation parameters plotted versus the polypeptidic sequence globally display similar profiles in the two redox forms. For instance, a sharp drop of all three parameters is found within the C-terminus. But the most striking point is a particularly large R_2 value for residue His101 in the reduced form.

Reduced Spectral Density Mapping. Reduced spectral density mapping, which does not require any model for the global motion and for the internal motion, was used first to analyze the relaxation data. $J_{\text{eff}}(0)$, $J(\omega_{\text{N}})$, and $\langle J(\omega_{\text{H}}) \rangle$ spectral density values were calculated for the 121 and 122 NH groups for which the relaxation parameters could be determined respectively in the reduced and oxidized state (see Materials and Methods). As shown in Figure 4, the variations of spectral density values along the sequence are globally similar in both redox states. For instance, a decrease of $J_{\text{eff}}(0)$ together with an increase of $\langle J(\omega_{\text{H}}) \rangle$ is observed within the C-terminus, and to a lesser extent around residues Lys53

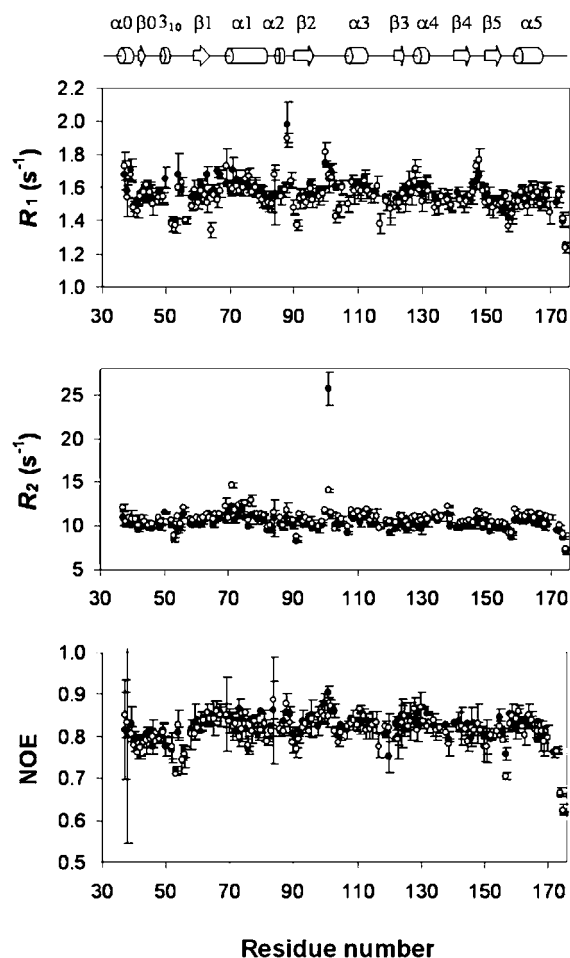


FIGURE 3: ^{15}N longitudinal relaxation rates (R_1), ^{15}N transverse relaxation rates (R_2), and steady-state $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N heteronuclear NOE values of NterPilB_{red} (filled circles) and NterPilB_{ox} (open circles) versus the amino acid sequence. Experiments were recorded on a Bruker DRX 600 MHz at pH 7.00, 25 °C. The secondary structure is shown at the top.

and Ser158. This indicates flexibility in the C-terminal tail, as well as in the 3_{10} - $\beta 1$ and $\beta 5$ - $\alpha 5$ loops. Similar decreases in these regions are observed for the $J(\omega_{\text{N}})$ values, which are found to exhibit a pattern rather similar to that of $J_{\text{eff}}(0)$, except residues undergoing chemical exchange. Indeed, in both redox states, $J_{\text{eff}}(0)$ value of residue His101 is clearly higher than the average one, suggesting a large μs -ms time scale chemical exchange. However, in the oxidized form, this value is not as high as in the reduced form. Chemical exchange is likely to be found too in the segment Cys70-Leu74 and for residue Val138, which display, especially in the oxidized form, $J_{\text{eff}}(0)$ values slightly above the average, while their $J(\omega_{\text{N}})$ and $\langle J(\omega_{\text{H}}) \rangle$ values are not particularly low (40).

Differences between the two forms can be clearly highlighted when the differences between spectral density values are plotted. Indeed, two main regions, the segment Trp63-Thr77 containing the Cys-Xaa-Xaa-Cys motif and part of the $\beta 2$ - $\alpha 3$ (FLHE) loop (residues His101-Lys103), appear to exhibit differences larger than two standard deviations from the average (Figure 4) for at least one of the three spectral density values. Remarkably, in the Trp63-Thr77 segment, difference of $J(\omega_{\text{N}})$ ($\Delta J(\omega_{\text{N}})$) between the oxidized and reduced forms is mainly negative for residues Trp63-Trp66 in the $\beta 1$ - $\alpha 1$ loop whereas difference of $J_{\text{eff}}(0)$

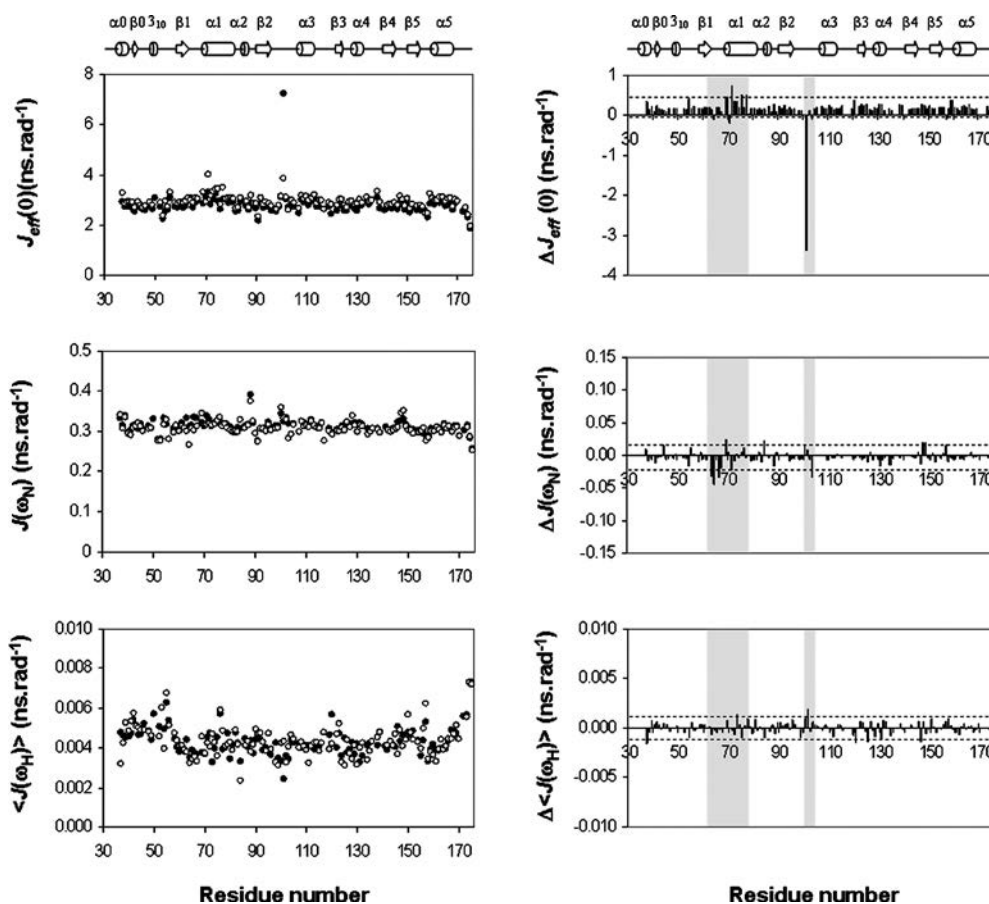


FIGURE 4: Reduced spectral density functions of NterPilB: (a) $J_{\text{eff}}(0)$, $J(\omega_N)$, and $\langle J(\omega_H) \rangle$ were obtained for NterPilB_{red} (filled circles) and NterPilB_{ox} (open circles) at 25 °C, pH 7.00, and ^{15}N frequency of 60.81 MHz. (b) Difference of spectral density functions $\Delta J_{\text{eff}}(0)$, $\Delta J(\omega_N)$, and $\Delta \langle J(\omega_H) \rangle$ between the oxidized form and the reduced form. The dotted lines represent the limits, defined as the average value ± 2 standard deviations, out of which the difference is considered as significant. The gray boxes highlight the two main regions (63–77 and 101–103) displaying significant changes upon oxidation.

($\Delta J_{\text{eff}}(0)$) is mainly positive for residues Leu69–Thr77 at the beginning of the $\alpha 1$ helix. This indicates that the formation of the disulfide bridge leads to a slight decrease of fast time scale motions in the $\beta 1$ – $\alpha 1$ loop containing the catalytic Cys67 together with a slight increase of the slow time scale motions in the $\alpha 1$ helix bearing the recycling Cys70.

Model-Free Analysis. To get a more detailed picture of the dynamics of NterPilB, the relaxation parameters were analyzed with a Lipari–Szabo approach (36, 37), by means of the Tensor2 software (35) and using the mean NMR structure. An anisotropic tensor giving a global correlation time τ_c of 7.51 ± 0.01 ns and 7.86 ± 0.01 ns, an axial anisotropy of 1.15 and 1.12, and a rhombicity of 1.06 and 1.04 respectively in the reduced and the oxidized forms was found. These values as well as the orientation of the tensor axes are in agreement with the molecule inertia tensor (the principal components of which are in the ratios 1:0.93:0.68), indicating a monomeric state.

Internal mobility parameters were obtained for Lys104 and Phe108 residues respectively in the reduced and in the oxidized forms. A few residues, including the catalytic cysteine Cys67, Leu100, and Lys103 in the reduced form, and the recycling Cys70, residues Gly98–Leu100, Glu102 in the oxidized form, could not be correctly fitted and had therefore to be discarded from the analysis.

The mean order parameter is 0.90 in the reduced form and 0.92 in the oxidized form. In both forms, the order

parameter decreases in the 3_{10} – $\beta 1$ loop (residues Leu52 to Lys56), in the $\beta 5$ – $\alpha 5$ loop (residues Lys156 to Ser158), and in the C-terminal region (residues Asn172 to Leu175) as shown in Figure 5. Relatively low values are also found here and there, generally in loops or at the end of some helices or sheets (residues Asp107, Val151). Internal correlation time was found mainly in the regions Lys40–Lys56 and Asp150–Gly157 and in the C-terminus, far from the active site. As expected, a large exchange term R_{ex} is found for residue His101, especially in the reduced state. Smaller R_{ex} terms are also observed in the $\alpha 1$ helix (residues Cys70–Leu74), and the $\alpha 4$ – $\beta 4$ loop (residues Leu134–Val138) and punctually for residues Leu52 and Ile159 in both forms.

pH Titration and pH Effect on Dynamics Parameters. R_{ex} parameter, which indicates chemical exchange, usually reflects conformational exchange. Yet, the residue His101 with surprisingly large R_{ex} value appears to be a His residue, the side chain of which usually has a pK_a around 6.8 in solution, thus very close to the sample pH. Since His101 is located in the critical FLHE loop, a titration study and a relaxation study at different pHs were carried out to determine whether the His101 exchange term originates from large conformational changes or is simply related to the pH conditions.

The ^1H and ^{15}N chemical shifts of the backbone and of the tryptophan side-chain NH groups were measured at nine pH values, ranging from pH 9 to pH 5.5. Superimposition

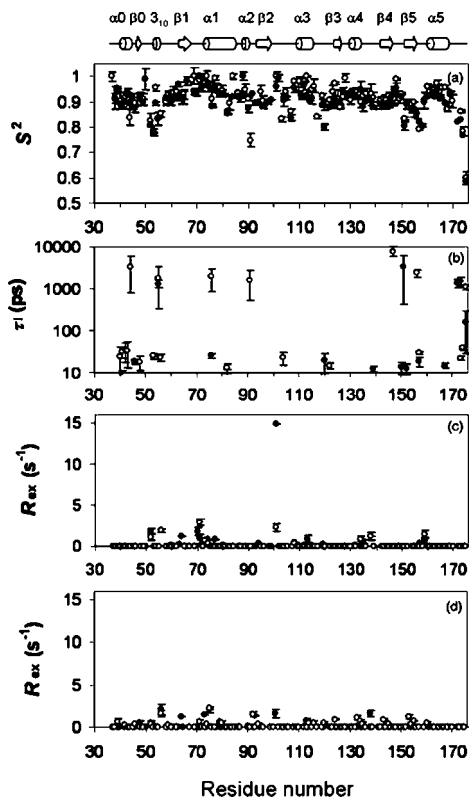


FIGURE 5: Model-free internal mobility parameters of NterPilB: (a) Order parameter S^2 , (b) internal correlation time τ_i , and (c) exchange term R_{ex} at pH 7 and (d) exchange term R_{ex} at pH 5.5 for NterPilB_{red} (filled circles) and NterPilB_{ox} (open circles) versus the amino acid sequence. The secondary structure is shown at the top.

of the ^1H – ^{15}N HSQC spectra reveals that most cross-peaks remain unchanged, suggesting that the three-dimensional structure is conserved. The largest variations are observed for the ^1H chemical shift of the backbone NH of Leu100, His101 and the side-chain NH^ϵ of Trp66 in both redox states. These observed chemical shifts correctly fit a simple Henderson–Hasselbalch equation, leading to a $\text{pK}_a = 6.8 \pm 0.1$ in both redox states. This pK_a value likely corresponds to that of the His101 imidazole side chain, which is the closest titrable element to those nuclei experiencing large chemical shift variations (Figure 6). Moreover, the solution structure shows that the imidazole ring is exposed to solvent and is therefore expected to have a pK_a value close to that of the free amino acid, which is precisely 6.8.

A new set of relaxation parameters was recorded at pH 5.5 for both redox forms and analyzed with a Lipari–Szabo approach, in the same manner as for pH 7. In both redox states, dynamics results were globally similar to those at pH 7, except that the R_{ex} value of His101 falls dramatically from 14.9 s^{-1} down to 1.9 s^{-1} in the reduced form and equals zero in the oxidized form (Figure 5d).

DISCUSSION

Global Structures and Dynamics of NterPilB in Solution. The solution structure of NterPilB_{red} from *N. meningitidis* exhibits the same folding as the X-ray structure. Backbone superimposition (for residues Thr39 to Asp170) leads to a rmsd of 1.04 \AA (Figure 7a). The locations of the secondary structures are similar. The α -helix α_0 , the strand β_0 , and the 3_{10} -helix in the N-terminal region, found in the majority of

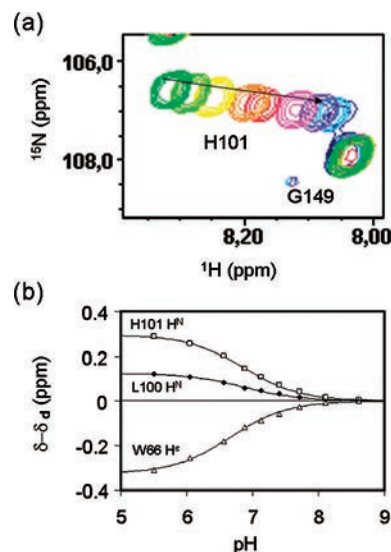


FIGURE 6: pH titration of NterPilB: (a) Overlay of ^1H – ^{15}N HSQC spectra of NterPilB_{ox} showing His101 and G149 cross-peaks, recorded at pH 5.50 (dark green), 6.05 (light green), 6.56 (yellow), 6.88 (orange), 7.13 (red), 7.41 (pink), 7.71 (purple), 8.11 (light blue), and 8.61 (dark blue). (b) Proton chemical shift titration curves for the backbone NH of Leu100, His101 and the side-chain NH^ϵ of Trp66. The continuous lines show the best fit to a simple Henderson–Hasselbalch equation.

the 20 NMR structures, are present in the X-ray structure. However, exceptions can be highlighted. First, the end of strand β_1 is one residue shorter in all NMR reduced structures, as in the X-ray structure of the reduced N-terminal domain of PilB from *N. gonorrhoeae*. Second, the beginning of helix α_1 is slightly bent but continuous, whereas it shows a break at residues Ser72 and Glu73 in the crystal structure. Nevertheless, no drastic changes concerning the side chains of the residues around the active site are observed between the NMR and the X-ray structures of NterPilB_{red} (Figure 7b).

DALI (41) and VAST (42) have been used to search for structural homologues of the NterPilB_{red} NMR solution structure in the PDB (43). In addition to the CMPs previously identified, the newly reported structure of YkuV from *B. subtilis* can be included to the structural comparison with NterPilB and CMPs, based on its scores of superimposition (DALI Z-score = 9.8; VAST-score = 9.8). NterPilB and CMPs all contain a Trx-like fold defined as a mixed four-stranded β -sheet surrounded by three α -helices. A structural alignment of NterPilB, *E. coli* DsbE, and YkuV with *E. coli* Trx1 shows the presence of a long insertion between residues Gln62 and Asn63 of Trx1 (corresponding to residues Gly98 and Gly128 in Figure 8). As described before for NterPilB and CMPs, this segment gives rise to an additional α -helix and a β -strand. Interestingly, this segment in NterPilB and YkuV is longer than in other CMPs and forms an additional loop. These two proteins appear to possess a segment of similar length leading to a YkuV₍₇₁₎RSED₍₇₄₎ loop equivalent in length to the NterPilB₍₉₉₎FLHE₍₁₀₂₎ loop. NterPilB would therefore be closer to YkuV than other CMPs.

Moreover, our NMR study provides additional dynamics information in solution. The Lipari–Szabo analysis of the relaxation parameters shows that NterPilB is a relatively rigid protein globally, with a mean order parameter of 0.91 for its backbone. Low order parameters in both redox forms are found for the C-terminal extremities, in the 3_{10} – β_1 loop

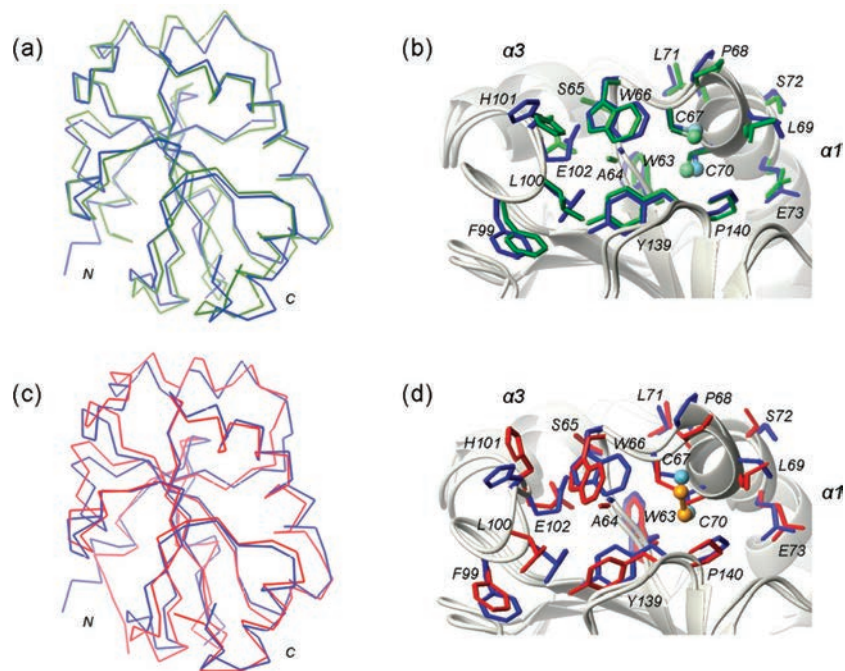


FIGURE 7: Backbone superimposition (from Thr39 to Asp170 residues) of the NMR solution structure (blue) with X-ray structure (green) for the reduced NterPilB (a). Active sites of these two forms are also figured using the same colors (b). Backbone superimposition (from Thr39 to Asp170 residues) of the NMR solution structures of the reduced (blue) and oxidized (red) forms of NterPilB (c). Active sites of these two forms are also figured using the same colors (d). Only heavy atoms of the side chains are represented. The sulfur atoms of Cys67 and Cys70 are drawn as blue balls for the NMR reduced form, as orange balls for the NMR oxidized form, and as green balls for the X-ray reduced form.

(residues Leu52-Lys56) and the $\beta 5$ - $\alpha 5$ loop (residues Lys156-Ser158) as well as for residues Asp107 and Val151 at the beginning of $\alpha 3$ helix and $\beta 5$ sheet, respectively (Figure 9). The flexibility highlighted in these regions is supported by the reduced spectral density mapping exhibiting low $J_{\text{eff}}(0)$ values compensated for by high $\langle J(\omega_{\text{H}}) \rangle$ values. The high rmsd around Lys54, observed both in the solution and in the crystal structures, can therefore be explained by a large backbone flexibility. In contrast, the poor resolution obtained for segment Ala113-Tyr117 in the reduced form is more likely due to a lack of experimental NOEs and angle restraints, as no particular dynamics is observed. Although experimental relaxation data are missing for the first four residues Val33-Thr36, high order parameters are found in the Leu37-Thr39 segment, in agreement with the assumption that the N-terminal region may form an α -helix, as in the crystal structure. Nevertheless, this N-terminal helix would not be well characterized because of the lack of NMR restraints.

In fact, apart for the putative CMP YkuV (16), no ^{15}N relaxation studies have been reported yet for CMPs as they were all studied in the crystal state. As far as we know, the only other dynamics data available on homologous proteins are for *Chlamydomonas reinhardtii* oxidized Trx *m* (44) and for *E. coli* oxidized and reduced Trxs (45). Our dynamics results were therefore discussed in comparison with YkuV and those thioredoxins. The increased flexibility observed for the 3_{10} - $\beta 1$ loop in NterPilB was also found in the homologous loop of Trxs and YkuV. However, it is located on the opposite side of the active site and may not be of functional importance. In contrast, the flexible $\beta 5$ - $\alpha 5$ loop is part of the active site and the homologous $\beta 5$ - $\alpha 5$ loop, in *C. reinhardtii* (44) and *E. coli* (45) Trxs, was reported to exhibit low order parameter as well. Unfortunately, this could

not be generalized to YkuV since data are missing in this region. However, this loop flexibility, which seems to be recurrent, could be mandatory for its interaction with a biological partner. Interestingly, in the single docking calculated model of YkuV complexed with ArsC, this loop seems to largely participate to interaction. As far as the $\alpha 4$ - $\beta 4$ loop is concerned, slow microsecond to millisecond time scale conformational exchange is found in NterPilB whereas subnanosecond time scale flexibility was reported in the *C. reinhardtii* and *E. coli* Trxs. Conformational exchange is observed in the $\beta 1$ - $\alpha 1$ loop and $\alpha 1$ helix bearing the catalytic and recycling cysteines in NterPilB as well as in *E. coli* Trx reduced form and in YkuV. Whereas a large segment comprising the $\alpha 2$ - $\beta 3$ loop and the $\beta 3$ strand in YkuV displays significant chemical exchange, only a few residues in the corresponding region of NterPilB have a small R_{ex} contribution. The dynamics differences evidenced in the Trxs and Trx-like proteins, along with the presence of the specific insertion in NterPilB, may contribute to explain the specificities of each protein.

Induced Redox Changes in the Active Site. Backbone superimposition (from Thr39 to Asp170 residues) of NterPilB_{red} and NterPilB_{ox} solution structures leads to a relatively low rmsd value of 1.16 Å, suggesting that the formation of the disulfide bond does not affect dramatically the global folding of the enzyme (Figure 7c). However, the mean distance between the two sulfur atoms of Cys67 and Cys70 decreases from 3.54 ± 0.55 Å to 2.10 ± 0.03 Å in NterPilB_{red} and NterPilB_{ox}, respectively. In NterPilB_{ox}, the presence of the disulfide bridge seems to freeze the conformation of the beginning of $\alpha 1$ helix and to induce a break (Figure 7c,d). This helix is locally bent by a turn formed with the residues Ser72 and Glu73. The central axis of the two resulting parts of $\alpha 1$ helix shows a larger deviation than in NterPilB_{red}.

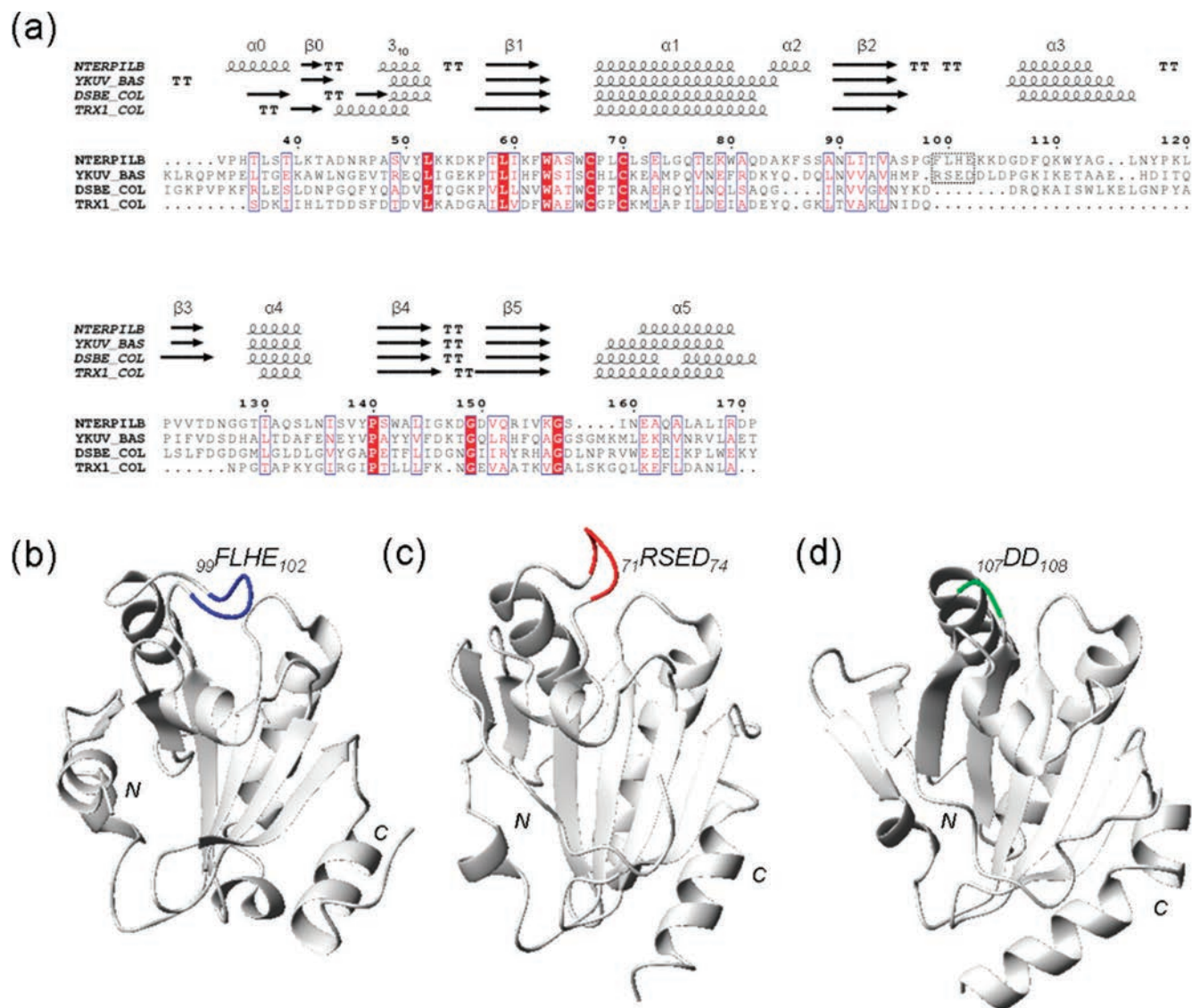


FIGURE 8: Amino acid sequences of NterPilB from *N. meningitidis*, YkuV from *B. subtilis*, and DsBE and Trx1 from *E. coli* were aligned according to their three-dimensional superimposition. Residues on red background are consensually found in all sequences. Residues in blue boxes show nonstrict similarities. Secondary structures were displayed up to the sequence alignment. Annotations were only displayed for NterPilB. The figure was prepared using ESPript (49) (a). Backbone symbolic representation of the NMR solution structure of NterPilB_{red} from *N. meningitidis* (b), the NMR solution structure of YkuV_{red} from *B. subtilis* (c), and X-ray structure of DsBE_{ox} from *E. coli* (d). Residues ⁹⁹FLHE₁₀₂ in NterPilB are represented in blue; residues ⁷¹RSED₇₄ in YkuV (corresponding to residues 98 and 128 in the alignment), in red; and the insertion site ¹⁰⁷DD₁₀₈ in DsBE, in green.

Whatever the oxidation state, the conformation of the active site of both forms appears similar and side chains for residues surrounding the two cysteines lie in the same orientation as shown in Figure 7d. Indeed, except chemical shift variation data suspecting that ResA may undergo localized conformational change between oxidation states (46), in the other CMPs crystal structures and YkuV NMR structures, the presence of the disulfide bond seems to not affect dramatically the global Trx-like fold either. One can notice that the break after the first four residues of $\alpha 1$ helix in *N. meningitidis* NterPilB_{ox} NMR solution structures was observed too in the X-ray structures of NterPilB_{red} from *N. meningitidis* and *N. gonorrhoeae*. On the contrary, in NterPilB_{red} NMR solution structure and in Trx, DsBE, ResA, TlpA, and YkuV structures (in the reduced or oxidized states), this helix can still be considered as continuous, although slightly distorted. The dynamic and structural studies suggest that the 3D structures of both reduced and

oxidized forms are well defined, rigid, and almost similar. However, a more in-depth examination of the backbone dihedral angle parameters made it possible to highlight, through the comparison between the Φ and Ψ angle values of the two reduced and oxidized forms, significant structural changes upon oxidation of NterPilB especially concerning the active cysteines and surrounding residues Ala64 and Trp66 and also in the neighboring $\beta 2$ - $\alpha 3$ and $\beta 5$ - $\alpha 5$ loops. This suggests that a fine rearranging of the Trp66-Cys67, Leu69-Cys70, Lys156-Gly157, Ser158-Ile159 bonds and of the Ile136-Val138 segment is concomitant to disulfide bridge formation. The low values of the standard deviations estimated for these differences show that it corresponds to rigid and well-defined structures of protein rather than to ill-defined regions as those where high values of the standard deviations were estimated. These conformational changes are supported by the observation of significant chemical shift

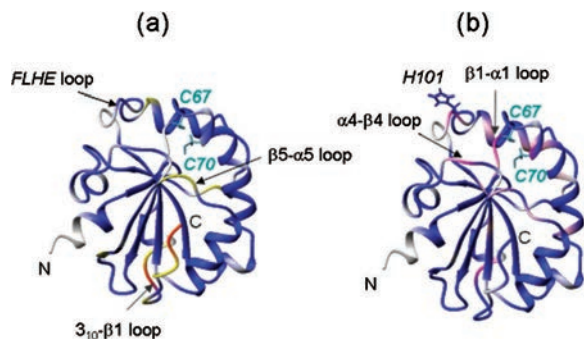


FIGURE 9: Model-free internal mobility parameters of NterPilB_{red}: (a) Order parameter S^2 . Residues with an order parameter lower than 1 or 2 standard deviations are represented respectively in yellow and dark orange. (b) Residues with an exchange term $0 < R_{ex} < 1 \text{ s}^{-1}$ are represented in light pink and those with $R_{ex} > 1 \text{ s}^{-1}$ in dark pink. Residues for which mobility parameters could not be determined are in white.

variations of backbone carbonyl and amide groups between the two redox states.

As for the dynamic properties, the analysis of Lipari–Szabo mobility parameters showed, in both redox states, relatively high order parameter around the active site as well as the presence of conformational exchange for a few residues. However, these results did not allow to analyze thoroughly the redox changes in the active site, as several residues could not be fitted in this region. Moreover, the observed perturbations could not be considered as significant, given the several assumptions made in the Lipari–Szabo analysis and the general offset of 0.02 for the average order parameter observed between the two redox states, which might originate from the uncertainty in the diffusion tensor determination. The spectral density mapping, which uses the relaxation parameters without any dynamic or structural model hypothesis, could be performed on all residues of the active site, except prolines, and appeared to give complementary valuable information and to be a more suitable method to detect dynamic variations. Indeed, in both redox forms, the $\langle J(\omega_H) \rangle$ values are relatively low or close to the average, all around the active site, except for residue Gln76 which has a slightly decreased order parameter of 0.91. This indicates that this whole region, including the residues that were rejected from the model-free analysis, has very restricted flexibility in the fast time scale. Nevertheless, relatively large $J_{eff}(0)$ values were observed for many residues in the segment Leu69–Gly75, especially in the oxidized form, suggesting the presence of slow movements in the μs – ms range affecting a large part of the active site. The differences of spectral density values between the redox states interestingly show that motions in the slow time scale around the active site are slightly increased in the oxidized state compared to the reduced state ($\Delta J_{eff}(0) > 0$), while those in a faster time scale are decreased ($\Delta J(\omega_N) < 0$).

The Structure of the FLHE Loop. In NterPilB_{red} and NterPilB_{ox} NMR solution structures, the FLHE residues are shaped in a well-structured loop internally stabilized by a hydrogen bond between Phe99 and Glu102. Moreover, a hydrogen bond involving backbone NH group of Ser65 and side chain of Glu102 promotes the global positioning of this four-residue segment. The rmsd values between the NMR solution and X-ray structures of NterPilB_{red} are respectively 0.31 and 1.35 Å for the backbone and the heavy atoms of

the FLHE loop. This indicates a high conservation level of this structural element, between the crystal and the solution structures. However, the rmsd value between the reduced and the oxidized NMR structures for this same segment is increased up to 0.61 Å for the backbone atoms and decreased down to 0.99 Å for the heavy atoms. Indeed, the Ψ dihedral angle of Leu100 and the Φ dihedral angle of His101 switch from $35.2 \pm 11.8^\circ$ to $-84.0 \pm 0.8^\circ$ and from $62.1 \pm 7.6^\circ$ to $-156.8 \pm 2.7^\circ$ respectively between the reduced and the oxidized state. This promotes a reorientation of Leu100-CO and His101-NH groups. Even if the global backbone orientation and the side-chain positions for residues Phe99 to Glu102 show no drastic changes, subtle structural differences do exist between reduced and oxidized forms at this precise spot.

The relaxation data have been inspected particularly and cautiously for the FLHE loop. The order parameters observed in the FLHE loop were all higher than 0.91, suggesting very restricted vibrational motions. However, one has to keep in mind that several mobility data are missing in the loop, especially for the residues that could not be reliably fitted by the Tensor2 program. For that reason, a redox comparison of the mobility parameters in the FLHE loop was possible on His101 only, the only residue for which the Lipari–Szabo analysis could be performed in both states. His101 order parameter did not show any significant variation. As far as its exchange term is concerned, the dramatically large value (14.9 s^{-1}) obtained in the reduced form at pH 7 appears to fall down to 1.9 s^{-1} at pH 5.5. Comparable effects have been reported by Hass et al. in plastocyanin (47), for its two His, one with a pK_a of 7.1 and the other, ligated to a Cu(I) ion, with a pK_a of 5.1. Indeed, the exchange terms observed for the nuclei close to the His side chain are assigned to the protonation/deprotonation equilibrium of the ionizable group and, therefore, follow a pH-dependent function reaching a maximum for $\text{pH} = pK_a$ (47). A pH titration from pH 5.5 to 9 of NterPilB showed that Leu100, His101 backbone NHs and the Trp66 side-chain NH $^\epsilon$ experienced the largest chemical shift variations, which leads to a pK_a value estimated at 6.8 in both redox states. This pK_a value precisely corresponds to that of the His free amino acid and is logically assigned to the His101 imidazole side chain, which is largely exposed to solvent (Figure 9b). Our results therefore point out that the large exchange term observed at pH 7 for the His101 backbone NH group mostly originates from the protonation/deprotonation of the side chain and not from a large conformational change. This phenomenon is also present in the oxidized form, R_{ex} decreasing from 2.5 s^{-1} at pH 7 to zero at pH 5.5. However, the R_{ex} value at pH 7 is smaller than that in the reduced form, although the pK_a values of His101 side chains were found to be identical in both oxidized and reduced forms. A possible explanation could be the slight conformation change occurring in the His101 backbone, observed by a close inspection of the NMR structures (see above and Supporting Information Figure S3). Indeed, in the reduced state, the His101 amide NH bond is relatively exposed to solvent and globally lies on the same side as its imidazole side chain, in all 20 representative structures. In contrast, in the oxidized state, this NH bond seems to reorient, in all structures, by pointing inside of the protein, i.e., opposite to the N $^\epsilon$ H of the His101 side chain. Therefore, the His101 NH group in the oxidized state might

be less affected by the occurring protonation/deprotonation process at its side chain than in the reduced state. Finally, the relaxation study detects no large conformational exchange in the FLHE loop in both redox forms, since the exchange term observed for His101 was shown to reflect mostly a proton exchange at the histidine side chain.

As for the active site, the spectral density mapping appeared to be useful to complement the dynamics analysis in the FLHE loop, since it could be performed on all residues and could not be biased by any model assumptions. Rather low $\langle J(\omega_H) \rangle$ values indicative of very restricted flexibility are obtained in the whole loop. Particularly high $\Delta J_{\text{eff}}(0)$ values are observed only for His101, which is affected by the proton exchange at its side chain, as discussed above. The spectral density mapping therefore confirms that the FLHE loop is globally rigid in both redox states. However, the differences of spectral density values between the oxidized and the reduced forms highlight significant variations of $J(\omega_N)$ and $\langle J(\omega_H) \rangle$ in this loop, indicating dynamic perturbations on the fast time scale. Finally, together with the subtle conformational changes observed between the two redox states, dynamics results demonstrate the presence of small but significant perturbations upon redox change.

Interestingly, the additional Arg71-Asp77 segment of YkuV that corresponds in NterPilB to the Phe99-Asp105 segment holding the additional FLHE loop (Figure 8a) is equally well structured in the reduced and the oxidized forms of YkuV (backbone rmsd values of 0.47 ± 0.20 and 0.44 ± 0.16 Å, respectively). Nonetheless, the conformation of this segment is clearly different in YkuV and in NterPilB. The protrusion formed by this segment points toward the active site in NterPilB (Figure 8b), while it rather stretches along the β -strand axis and points toward the solvent (Figure 8c) in YkuV. From the simple docking-calculated model of YkuV complexed with ArsC from *B. subtilis*, this loop seems to be close to the interaction interface. However, as observed for the FLHE loop of NterPilB, no particular dynamics data have been reported for the RSED loop of YkuV (16). This may suggest that a well-structured segment which does not exhibit large internal motions in the unbound state of the protein could possibly be involved during the binding step with a biological partner. The orientation of this segment relative to the active site may be then a sufficient element to generate the substrate specificity.

Functional Consequences of the CMP Topology and of the Presence of the FLHE Loop. NterPilB is a periplasmic disulfide oxidoreductase belonging to the Trx-like family but with a CMP topology. As *E. coli* reduced Trx1, it is able to regenerate the reduced forms of the Msr domains of PilB from their oxidized forms. But, in contrast to *E. coli* Trx1, (i) NterPilB_{ox} is not reduced by the *E. coli* Trx reductase (5), and (ii) NterPilB_{red} does not regenerate the *E. coli* reduced forms of MsrA and MsrB from their oxidized forms (data not shown). Compared to CMPs, one edge of the active site is covered by the specific FLHE loop. Our results show that the reduced and the oxidized forms of NterPilB have in common a few flexible regions. Significant differences in the dihedral angle values upon the redox process of NterPilB are observed for Cys67, Cys70, and neighboring residues (Ala64 and Trp66), as well as for particular residues located in the β_2 - α_3 and β_5 - α_5 loops, that denote a rearranging of some segments near the active site. In particular, the large

values of $\Delta\Psi(\text{Leu100})$ and $\Delta\Phi(\text{His101})$ (Supporting Information Figure S1) attest the rearranging of the Leu100-His101 bond and the reorientation of the His101-NH. However, the FLHE loop keeps very restricted fast time scale motions and experiences no large conformational exchange in both states. These results raise the question of the role of the specific FLHE loop. Two hypotheses can be advanced both as a discriminating factor in the recognition of either its periplasmic recycling partner or the oxidized Msr domains within the PilB protein.

The recycling partner of NterPilB_{ox} is probably the N-terminal domain of DsbD (nDsbD). Indeed, the nDsbD from *E. coli* was shown to be able to reduce NterPilB_{ox} from *N. gonorrhoeae* (7). Recently, our group purified the nDsbD domain from *N. meningitidis* and showed that it efficiently reduces *in vitro* NterPilB_{ox} from *N. meningitidis* with a k_2 value of $6 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Selme et al., unpublished results). The nDsbD domain of *E. coli* presents an immunoglobulin-like fold and is known to efficiently recycle three periplasmic Trx-like proteins (48). These proteins are involved either in the periplasmic disulfide isomerization or in the cytochrome *c* maturation systems, all of them lacking the FLHE loop. These data strongly suggest that the FLHE loop is not a discriminating factor for the interaction with the nDsbD. This is confirmed by the fact that the *N. meningitidis* DsbE, which has been recently purified and characterized by our group, is efficiently reduced by the nDsbD domain with a k_2 value in the range of that determined for the NterPilB domain (Gand et al., unpublished results).

An alternative role of this loop would be to promote a selective interaction between the NterPilB domain and the oxidized Msr domains within the PilB protein. This is probably the case. Indeed, the NterPilB domain has been previously shown to reduce efficiently the isolated MsrB domain of PilB (5),⁴ while recent results from our group have demonstrated that the *N. meningitidis* DsbE is unable to reduce the isolated oxidized MsrB domain of PilB (Selme et al., unpublished results). In that context, the knowledge of the structure of a complex between NterPilB and the MsrB domain of PilB, linked by a mixed disulfide bond, could allow fine analyses of the interactions between both partners and, in particular, of the role of the FLHE loop. An enzymatic characterization of a truncated form of NterPilB deleted from the FLHE loop would be also informative.

ACKNOWLEDGMENT

Access to the Bruker DRX 600 (NMR facilities of the Service Commun de Biophysicochimie des Interactions, Nancy I) was deeply appreciated. We thank Dr. G. Boussard for critical review of the manuscript and Dr. N. Coudevylle and Dr. S. Bouguet-Bonnet for technical assistance.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Figure S1 shows a backbone rmsd (in Å) distribution as a function of the residue number along the NterPilB_{red} (blue) and NterPilB_{ox} (red) sequence. Figure S2 shows chemical

⁴ Previous kinetic studies on the soluble domains of PilB have shown that the NterPilB is able to reduce efficiently the MsrB domain but not the MsrA one (5). This latter result is probably due to the fact that the activity was tested on an isolated domain but not on the entire PilB protein. Indeed Brot et al. (7) have shown, in the full-length protein context, the absence of a preference for the NterPilB from *N. gonorrhoeae* to reduce one Msr domain over the second one (7).

shift perturbations of the ^{13}C CO backbone groups calculated between the reduced and the oxidized form of NterPilB. The dotted line corresponds to the value of the mean perturbation plus two standard deviations. The measures were done at 600 MHz, 298 K, and pH 7.0 for the two forms. Figure S3 shows the structure close-up of NterPilB around His101. The 20 representative structures of the reduced (blue) and the oxidized (red) state are displayed after backbone superimposition (from Thr39 to Asp170 residues). The backbone amide HN and the side-chain N ϵ H bonds of His101 are represented in thick lines. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

REFERENCES

- Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Van Dorsselaar, A., and Branlant, G. (2000) A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 275, 35908–35913.
- Olry, A., Boschi-Muller, S., Marraud, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselaar, A., and Branlant, G. (2002) Characterization of the methionine sulfoxide reductase activities of PILB, a probable virulence factor from *Neisseria meningitidis*. *J. Biol. Chem.* 277, 12016–12022.
- Boschi-Muller, S., Olry, A., Antoine, M., and Branlant, G. (2005) The enzymology and biochemistry of methionine sulfoxide reductases. *Biochim. Biophys. Acta* 1703, 231–238.
- Skaar, E. P., Tobiason, D. M., Quick, J., Judd, R. C., Weissbach, H., Etienne, F., Brot, N., and Seifert, H. S. (2002) The outer membrane localization of the *Neisseria gonorrhoeae* MsrA/B is involved in survival against reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 10108–10113.
- Wu, J., Neiers, F., Boschi-Muller, S., and Branlant, G. (2005) The N-terminal domain of PILB from *Neisseria meningitidis* is a disulfide reductase that can recycle methionine sulfoxide reductases. *J. Biol. Chem.* 280, 12344–12350.
- Ranaivoson, F. M., Kauffmann, B., Neiers, F., Wu, J., Boschi-Muller, S., Panjikar, S., Aubry, A., Branlant, G., and Favier, F. (2006) The X-ray structure of the N-terminal domain of PILB from *Neisseria meningitidis* reveals a thioredoxin-fold. *J. Mol. Biol.* 358, 443–454.
- Brot, N., Collet, J. F., Johnson, L. C., Jönsson, T. J., Weissbach, H., and Lowther, W. T. (2006) The thioredoxin domain of *Neisseria gonorrhoeae* PilB can use electrons from DsbD to reduce downstream methionine sulfoxide reductases. *J. Biol. Chem.* 281, 32668–32675.
- Fabianek, R. A., Hennecke, H., and Thöny-Meyer, L. (1998) The active-site cysteines of the periplasmic thioredoxin-like protein in CcmG of *Escherichia coli* are important but not essential for cytochrome *c* maturation vivo. *J. Bacteriol.* 180, 1947–1950.
- Fabianek, R. A., Huber-Wunderlich, M., Glockshuber, R., Künzler, P., Hennecke, H., and Thöny-Meyer, L. (1997) Characterization of the *Bradyrhizobium japonicum* CycY protein, a membrane-anchored periplasmic thioredoxin that may play a role as a reductant in the biogenesis of *c*-type cytochromes. *J. Biol. Chem.* 272, 4467–4473.
- Loferer, H., Bott, M., and Hennecke, H. (1993) *Bradyrhizobium japonicum* TlpA, a novel membrane-anchored thioredoxin-like protein involved in the biogenesis of cytochrome *aa*₃ and development of symbiosis. *EMBO J.* 12, 3373–3383.
- Erlendsson, L. S., Acheson, R. M., Hederstedt, L., and Le Brun, N. E. (2003) *Bacillus subtilis* ResA is a thiol-disulfide oxidoreductase involved in cytochrome *c* synthesis. *J. Biol. Chem.* 278, 17852–17858.
- Ouyang, N., Gao, Y. G., Hu, H. Y., and Xia, Z. X. (2006) Crystal structures of *E. coli* CcmG and its mutants reveal key roles of the N-terminal β -sheet and the fingerprint region. *Proteins* 65, 1021–1031.
- Edeling, M. A., Guddat, L. W., Fabianek, R. A., Thöny-Meyer, L., and Martin, J. L. (2002) Structure of CcmG/DsbE at 1.14 Å resolution: high-fidelity reducing activity in an indiscriminately oxidizing environment. *Structure* 10, 973–979.
- Capitani, G., Rossmann, R., Sargent, D. F., Grütter, M. G., Richmond, T. J., and Hennecke, H. (2001) Structure of the soluble domain of a membrane-anchored thioredoxin-like protein from *Bradyrhizobium japonicum* reveals unusual properties. *J. Mol. Biol.* 311, 1037–1048.
- Crow, A., Acheson, R. M., Le Brun, N. E., and Oubrie, A. (2004) Structural basis of redox-coupled protein substrate selection by the cytochrome *c* biosynthesis protein ResA. *J. Biol. Chem.* 279, 23654–23660.
- Zhang, X., Hu, Y., Guo, X., Lescop, E., Li, Y., Xia, B., and Jin, C. (2006) The *Bacillus subtilis* YkuV is a thiol: disulfide oxidoreductase revealed by its redox structures and activity. *J. Biol. Chem.* 281, 8296–8304.
- Bartels, C., Xia, T., Billeter, M., Güntert, P., and Wüthrich, K. (1995) The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules. *J. Biomol. NMR* 6, 1–10.
- Keller, R. (2004) Optimizing the process of nuclear magnetic resonance spectrum analysis and computer aided resonance assignment. Ph.D. Thesis, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland.
- Wishart, D. S., Bigam, C. G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H. J., and Oldfield, E. (1995) ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J. Biomol. NMR* 6, 135–140.
- Bai, Y., Milne, J. S., Mayne, L., and Englander, S. W. (1993) Primary structure effects on peptide group hydrogen exchange. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 17, 75–86.
- Cordier, F., and Grzesiek, S. (2002) Temperature-dependence of protein hydrogen bond properties as studied by high-resolution NMR. *J. Mol. Biol.* 317, 39–52.
- Cornilescu, G., Delaglio, F., and Bax, A. (1999) Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *J. Biomol. NMR* 13, 289–302.
- Siemion, I. Z., Wieland, T., and Pook, K. H. (1975) Influence of the distance of the proline carbonyl from the β and γ carbon on the ^{13}C chemical shifts. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 14, 702–703.
- Güntert, P., Mumenthaler, C., and Wüthrich, K. (1997) Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program DYANA. *J. Mol. Biol.* 273, 283–298.
- Güntert, P. (2004) Automated NMR structure calculation with CYANA. *Methods Mol. Biol.* 278, 353–378.
- Koradi, R., Billeter, M., and Wüthrich, K. (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graphics* 14, 51–55.
- Farrow, N. A., Muhandiram, R., Singer, A. U., Pascal, S. M., Kay, C. M., Gish, G., Shoelson, S. E., Pawson, T., Forman-Kay, J. D., and Kay, L. E. (1994) Backbone dynamics of a free and phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by ^{15}N NMR relaxation. *Biochemistry* 33, 5984–6003.
- Johnson, B. A., and Blevins, R. A. (1994) NMRView: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. *J. Biomol. NMR* 4, 603–614.
- Farrow, N. A., Zhang, O., Szabo, A., Torchia, D. A., and Kay, L. E. (1995) Spectral density function mapping using ^{15}N relaxation data exclusively. *J. Biomol. NMR* 6, 153–162.
- Ishima, R., Yamasaki, K., Saito, M., and Nagayama, K. (1995) Spectral densities of nitrogen nuclei in *Escherichia coli* ribonuclease HI obtained by ^{15}N NMR relaxation and molecular dynamics. *J. Biomol. NMR* 2, 217–220.
- Ishima, R., and Nagayama, K. (1995) Protein backbone dynamics revealed by quasi spectral density function analysis of amide N-15 nuclei. *Biochemistry* 34, 3162–3171.
- Lefevre, J. F., Dayie, K. T., Peng, J. W., and Wagner, G. (1996) Internal mobility in the partially folded DNA binding and dimerization domains of GAL4: NMR analysis of the N-H spectral density functions. *Biochemistry* 35, 2674–2686.
- Hiyama, Y., Niu, C., Silverton, J. V., Bavoso, A., and Torchia, D. A. (1988) Determination of ^{15}N chemical shift tensor via ^{15}N - ^2H dipolar coupling in Boc-glycylglycyl[^{15}N glycine]benzyl ester. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 2378–2383.
- Peng, J. W., and Wagner, G. (1995) Frequency spectrum of NH bond in eglin *c* from spectral density mapping at multiple fields. *Biochemistry* 34, 16733–16752.
- Dosset, P., Hus, J.-C., Blackledge, M., and Marion, D. (2000) Efficient analysis of macromolecular rotational diffusion from heteronuclear relaxation data. *J. Biomol. NMR* 16, 23–28.
- Lipari, G., and Szabo, A. (1982) Model-free approach to the interpretation on nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 4546–4559.

37. Lipari, G., and Szabo, A. (1982) Model-free approach to the interpretation on nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results. *J. Am. Chem. Soc.* *104*, 4560–4570.
38. Beaufils, C., Neiers, F., Coudevylle, N., Boschi-Muller, S., Averlant-Petit, M. C., Branlant, G., and Cung, M. T. (2006) ^1H , ^{13}C and ^{15}N backbone resonance assignment of the N-terminal domain of PilB from *Neisseria meningitidis*. *J. Biomol. NMR* *36*, 6.
39. Quinternet, M., Beaufils, C., Neiers, F., Tsan, P., Boschi-Muller, S., Averlant-Petit, M.-C., Branlant, G., and Cung, M.-T. (2007) ^1H , ^{13}C and ^{15}N backbone resonance assignment of the oxidized form (Cys₆₇-Cys₇₀) of the N-terminal domain of PILB from *Neisseria meningitidis*. *Biomol. NMR Assign.* *1*, 143–145.
40. Auguin, D., Barthe, P., Augé-Sénégas, M. T., Stern, M. H., Noguchi, M., and Roumestand, C. (2004) Solution structure and backbone dynamics of the pleckstrin homology domain of the human protein kinase B (PKB/Akt). Interaction with inositol phosphates. *J. Biomol. NMR* *28*, 137–155.
41. Holm, L., and Sander, C. (1993) Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J. Mol. Biol.* *233*, 123–138.
42. Gibrat, J. F., Madej, T., and Bryant, S. H. (1996) Surprising similarities in structure comparison. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *6*, 377–385.
43. Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., and Bourne, P. E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* *28*, 235–242.
44. Lancelin, J.-M., Guilhaudis, L., Krimm, I., Blackledge, M. J., Marion, D., and Jacquot, J.-P. (2000) NMR structures of thioredoxin *m* from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proteins* *41*, 334–349.
45. Stone, M. J., Chandrasekhar, K., Holmgren, A., Wright, P. E., and Dyson, J. H. (1993) Comparison of backbone and tryptophan side-chain dynamics of reduced and oxidized *Escherichia coli* thioredoxin using ^{15}N NMR relaxation measurements. *Biochemistry* *32*, 426–435.
46. Colbert, C. L., Wu, Q., Erbel, P. J. A., Gardner, K. H., and Deisenhofer, J. (2006) Mechanism of substrate specificity in *Bacillus subtilis* ResA, a thioredoxin-like protein involved in cytochrome *c* maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 4110–4415.
47. Hass, M. A., Thuesen, M. H., Christensen, H. E., and Led, J. J. (2004) Characterization of μs -ms dynamics of proteins using a combined analysis of ^{15}N NMR relaxation and chemical shift: conformational exchange in plastocyanin induced by histidine protonations. *J. Am. Chem. Soc.* *126*, 753–765.
48. Stirnimann, C. U., Grütter, M. G., Glockshuber, R., and Capitani, G. (2006) nDsbD: a redox interaction hub in the *Escherichia coli* periplasm. *Cell. Mol. Life Sci.* *63*, 1642–1648.
49. Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. I., and Metoz, F. (1999) ESPript: multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* *15*, 305–308.

BI800884W

Figure S1

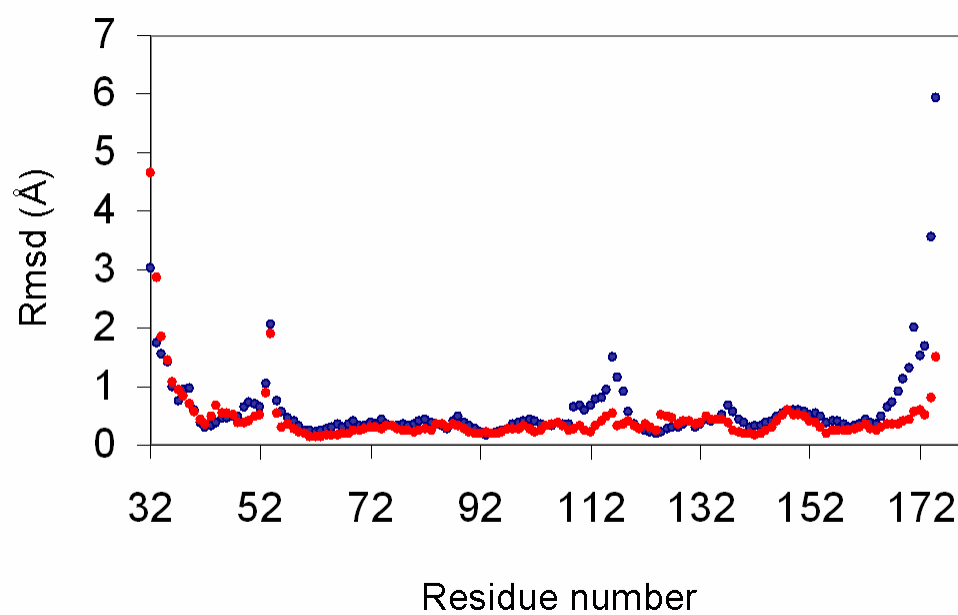


Figure S1. Backbone rmsd (in Å) distribution as a function of the residue number along the NterPilB_{red} (blue) and NterPilB_{ox} (red) sequence.

Figure S2

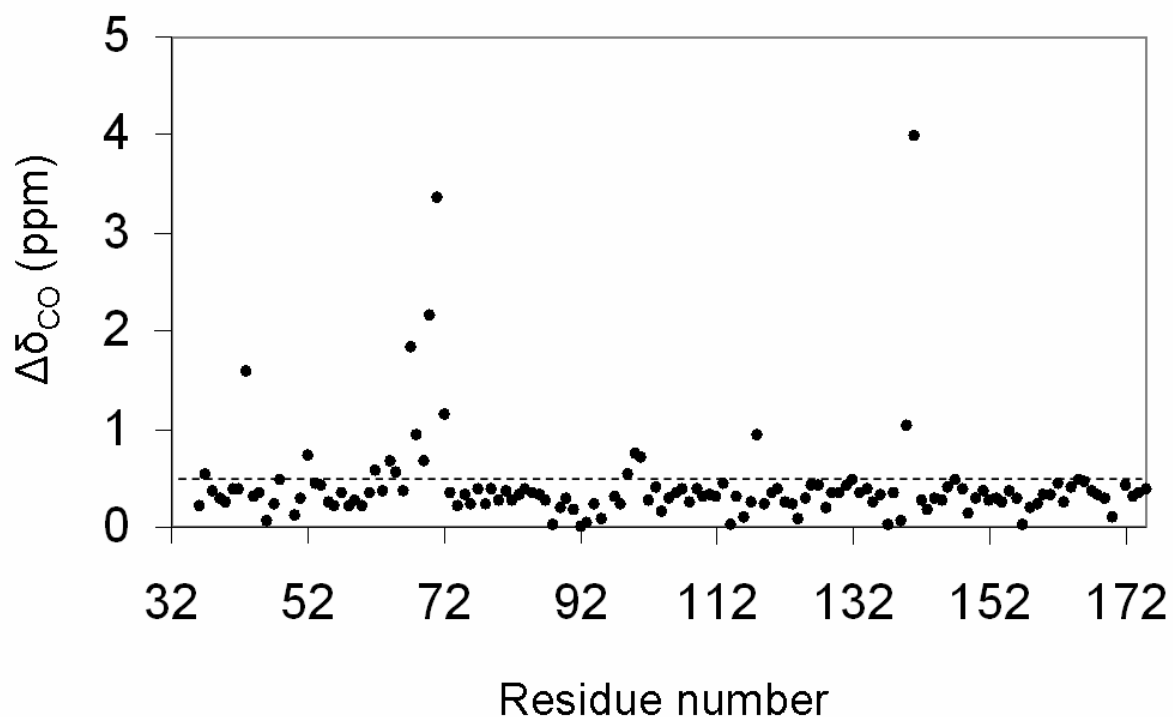


Figure S2. Chemical shift perturbations of the ^{13}C CO backbone groups calculated between the reduced and the oxidized form of NterPilB. The dotted line corresponds to the value of the mean perturbation plus two standard deviations. The measures were done at 600 MHz, 298 K, pH 7.0 for the two forms.

Figure S3

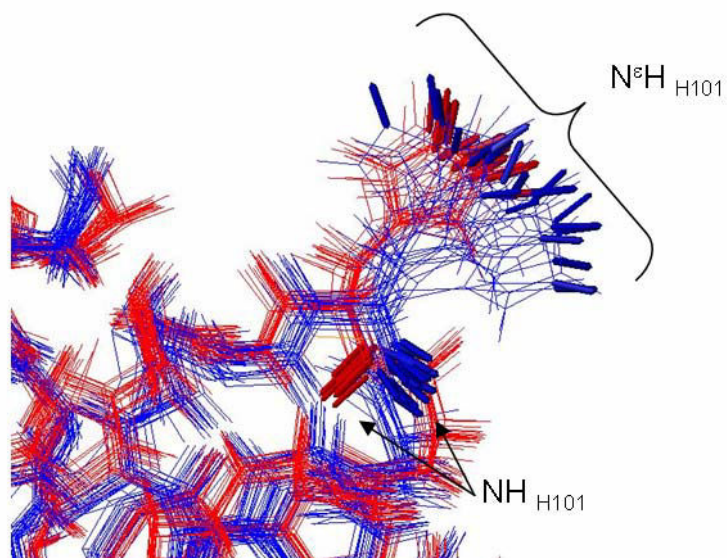


Figure S3. Structure close-up of NterPilB around His101. The 20 representative structures of the reduced (blue) and the oxidized (red) state are displayed after backbone superimposition (from Thr39 to Asp170 residues). The backbone amide HN and the side-chain N^εH bonds of His101 are represented in thick lines.

Chapitre 3 : Etude structurale et dynamique du complexe covalent entre nDsbD et NterPilB de *Neisseria meningitidis*

I. Introduction

Les protéines DsbD et PilB ont été présentées comme interagissant et participant à l'apport d'électrons dans le processus de réparation des protéines oxydées. PilB est capable, grâce à ses deux domaines Msr, de réduire les fonctions MetSO présentes dans les protéines ayant subi par exemple une attaque oxydative. Les domaines Msr réduits cèdent leurs électrons aux résidus MetSO qui recouvrent alors leur forme méthionine. La régénération des domaines Msr oxydés est supposée se faire *via* le domaine N-terminal de PilB, lui-même ensuite régénéré par le domaine N-terminal de DsbD (Figure 48).

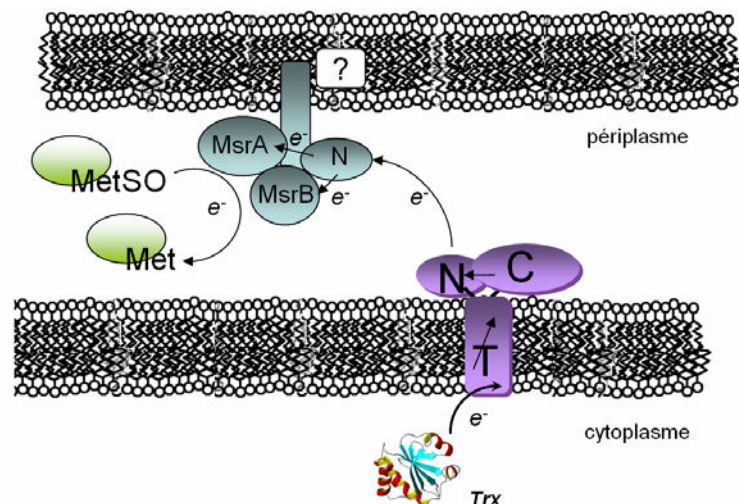


Figure 48 : Représentation supposée de la voie de réparation des Met, altérées sous leur forme sulfoxyde MetSO, par la protéine PilB chez *N. meningitidis*. Les électrons cytoplasmiques apportés par Trx sont transmis de DsbD (en violet) à PilB (en bleu) via l'interaction entre leurs domaines N-terminaux. Les domaines Msr reçoivent les électrons de NterPilB de façon à réduire la fonction sulfoxyde des MetSO portées par les protéines oxydées, régénérant ainsi les résidus Met. Le point d'interrogation à côté de PilB traduit l'incertitude qui demeure quant à l'ancrage, supposé périplasmique, de cette protéine. Les flèches indiquent le sens de cheminement des électrons.

Les chapitres précédents ont montré que le domaine NterPilB, dont le repliement est de type Trx, possède une boucle caractéristique FLHE, certes rigide, mais pouvant être un facteur discriminant pour la spécificité de substrat de la protéine. L'étude des formes réduite et oxydée de NterPilB a aussi montré que le changement d'état rédox de cette protéine pouvait être à l'origine de modifications conformationnelles subtiles au niveau du site actif et de la boucle FLHE. Ces deux formes, réduite et oxydée, sont en quelque

sorte les formes initiale et finale du mécanisme catalytique qui permet la régénération des domaines Msr par NterPilB.

Quant à DsbD, hormis les différences structurales mises en avant entre les espèces bactériennes *E. coli* et *N. meningitidis*, il a aussi été montré que son domaine nDsbD était flexible au niveau d'une région dite « couvercle » surplombant le site actif. Grâce à des études dynamiques par RMN inédites, la flexibilité intrinsèque, démontrée dans le cas de nDsbD, a été proposée intervenir dans la large spécificité de cette protéine envers les repliements de type Trx-like.

Malgré l'apport de ces nouvelles données, il reste à répondre à la question du rôle précis joué par la boucle FLHE de NterPilB. Cette question ne peut pas être réellement résolue par l'analyse de l'état non-lié de la protéine. C'est pourquoi, nous avons cherché à déterminer la structure d'un complexe nDsbD/NterPilB dans le but de comprendre les facteurs importants concourant à la reconnaissance entre ces deux partenaires. De plus, une analyse des paramètres de relaxation a été entreprise de façon à examiner les comportements dynamiques de chacune des composantes à l'état complexé. La stratégie employée a été celle de l'étude d'un complexe covalent dans lequel les résidus catalytiques Cys67 de NterPilB et Cys109 de nDsbD sont reliés par un pont disulfure, les cystéines de régénération (Cys70 et Cys103 respectivement pour NterPilB et nDsbD) ayant été sélectivement mutées en Ser. Cela permet d'étudier un complexe chimiquement stable (dont la conformation tridimensionnelle devrait être très proche de celle du complexe transitoire du mécanisme catalytique) et d'obtenir ainsi une bonne image des résidus impliqués dans l'interaction.

L'ensemble des résultats exposés dans les paragraphes qui vont suivre ont servi de base pour la rédaction d'un article. La totalité de ce manuscrit, que nous allons soumettre prochainement, est incorporé à cette thèse. Pour plus de détails, il convient de se reporter à cet article.

II. Données cinétiques

Pour valider notre démarche, il convenait de prouver l'implication de Cys67 de NterPilB et de Cys109 de nDsbD dans la formation d'un pont disulfure intermoléculaire. Pour cela, des tests biochimiques ont été entrepris par le laboratoire MAEM d'une part, alors que la Cys67 de NterPilB a été choisie, d'autre part, grâce à l'étude bibliographique réalisée sur les protéines Trx-like.

Un suivi cinétique de la réduction de NterPilB_{ox} par nDsbD a permis de dégager une valeur de k_2 de $6,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Cette donnée suggère que nDsbD est le réducteur physiologique de NterPilB (Figure 49a). Le fait qu'aucune saturation cinétique n'est observée pour des concentrations en nDsbD de l'ordre de 500 μM indique que l'affinité entre les deux partenaires est d'au mieux 1mM, donc faible. De plus, l'utilisation des mutants C103S et C109S de nDsbD a permis de montrer, par suivi cinétique, que c'était la cystéine 109 de nDsbD qui était impliquée dans la formation du complexe (Figure 49b). C'est donc le complexe nDsbD_{C103S}-SS-NterPilB_{C70S} (ci-après désigné par nDsbD-SS-NterPilB) qui a été préparé et étudié par RMN (Figure 49c).

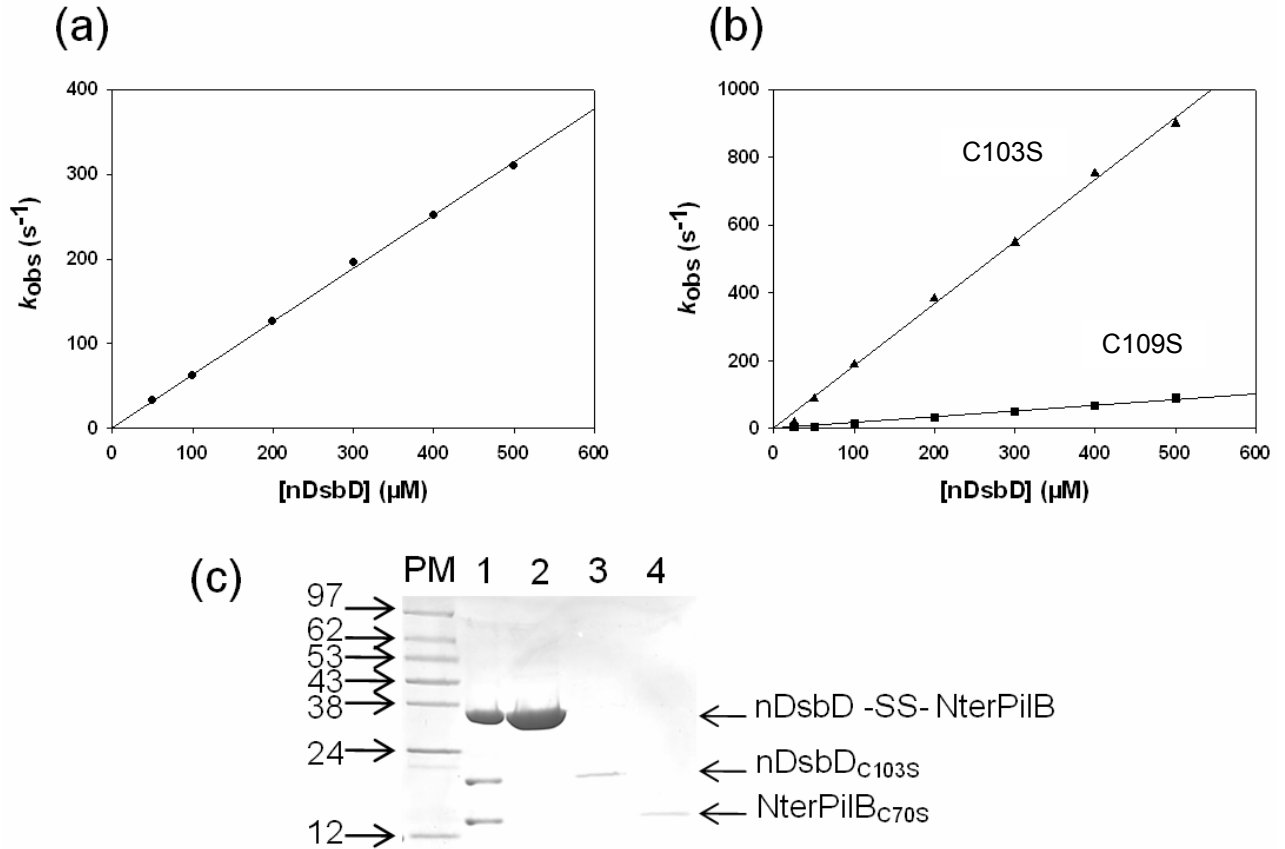


Figure 49 : Cinétique de réduction de *NterPilB_{ox}* par *nDsbD* sauvage (a), par les mutants *C103S* et *C109S* de *nDsbD* (b) et gel de purification du complexe *nDsbD-SS-NterPilB* réalisé entre les mutants *nDsbD_{C103S}* et *NterPilB_{C70S}*

III. Attribution séquentielle du complexe covalent *nDsbD-SS-NterPilB*

Tout comme il a été expliqué précédemment, l'étape d'attribution séquentielle du complexe est nécessaire à la résolution de la structure tridimensionnelle et à l'analyse dynamique. Cela a nécessité la production de plusieurs échantillons tels que décrits ci-dessous.

III.1. Production des échantillons

La stratégie employée étant celle d'un complexe covalent, il a fallu travailler avec des mutants inactifs de *NterPilB* et de *nDsbD*. En effet, si cette précaution n'est pas prise, il est impossible d'obtenir un complexe stable, dans la mesure où les cystéines de régénération (Cys70 et Cys103 respectivement pour *NterPilB* et *nDsbD*) réagiraient avec le pont disulfure. Ce dernier n'aura alors qu'une durée de vie transitoire, incompatible avec les échelles de temps employées dans les techniques mises en œuvre en RMN. Ainsi, le complexe covalent a été synthétisé entre le mutant C70S de *NterPilB* (*NterPilB_{C70S}*) et le mutant C103S de *nDsbD* (*nDsbD_{C103S}*). La taille de ce complexe est de 271 résidus.

Un échantillon simplement marqué ^{15}N de NterPilB_{C70S} a tout d'abord été produit et a servi pour l'attribution de ce mutant. Le domaine nDsbD_{C103S} a, quant à lui, été précédemment attribué. En ce qui concerne le complexe covalent, nous avons travaillé sur deux échantillons distincts pour éviter un taux de superpositions trop important sur les spectres RMN :

- le premier échantillon est un complexe où seul NterPilB_{C70S} est doublement marqué ^{13}C et ^{15}N : aucun signal provenant de nDsbD_{C103S} ne sera alors visible.
- le second consiste en un complexe où seul nDsbD_{C103S} est doublement marqué ^{13}C et ^{15}N : aucun signal provenant de NterPilB_{C70S} n'apparaîtra.

De façon à pallier le problème d'élargissement des raies généré par la taille importante du complexe, des échantillons similaires à ceux décrits précédemment, mais triplement marqués ^2H , ^{13}C et ^{15}N , ont été produits. Pour plus de sensibilité, les expériences RMN sur ces échantillons particuliers ont été enregistrées en ayant recours au spectromètre 800 MHz du laboratoire de RMN de l'ICSN (Gif sur Yvette).

III.2. Premiers spectres

L'échantillon NterPilB_{C70S} a été préparé à une concentration de 1 mM à pH 7,0 (20 mM de KH_2PO_3), en présence de 50 mM de dithiothréitol pour empêcher l'oxydation des groupes thiol de l'enzyme ; les spectres ont été enregistrés à 600 MHz et à une température de 298 K. Le spectre HSQC ^1H - ^{15}N de NterPilB_{C70S} à l'état non lié, présente un bon taux de dispersion des signaux et quelques variations comparativement à celui des formes réduite ou oxydée de NterPilB sauvage (Figure 50).

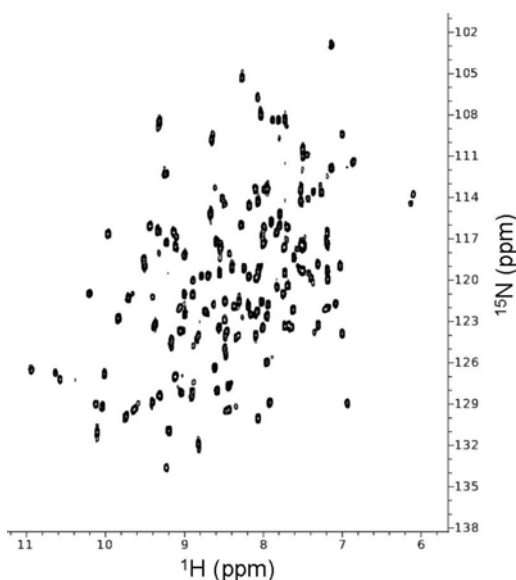


Figure 50 : Spectre HSQC ^1H - ^{15}N du mutant C70S de NterPilB de *Neisseria meningitidis* enregistré à 600MHz, 298 K.

Les échantillons doublement et triplement marqués du complexe covalent ont été préparés à une concentration de 0,8 mM à pH 7,0 (20 mM de KH_2PO_3) ; les spectres ont été enregistrés à 600 et 800 MHz et à une température de 298 K. Les spectres bidimensionnels HSQC ^1H - ^{15}N , de part la dispersion des

signaux, suggèrent un bon taux de structuration (Figure 51). Comme attendu, des différences notables de profil spectral apparaissent avec la formation du complexe.

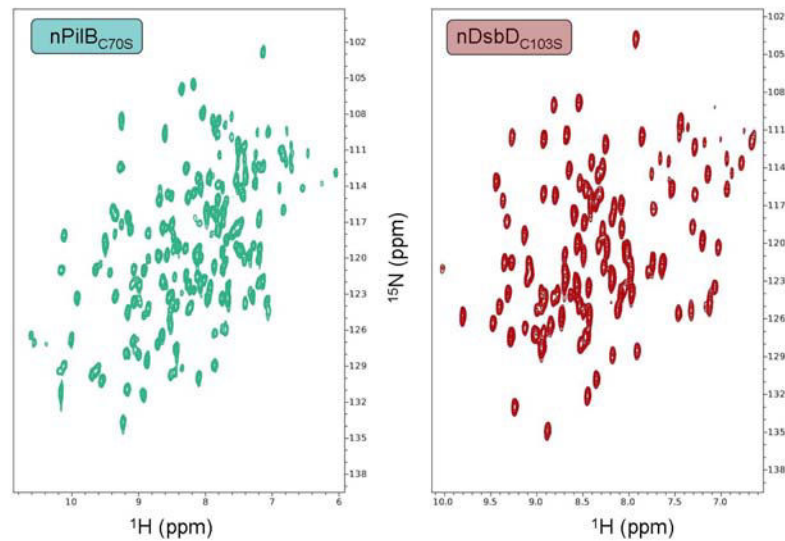


Figure 51 : Spectres HSQC ^1H - ^{15}N des composantes NterPilB_{C70S} et nDsbD_{C103S} de *Neisseria meningitidis* dans le complexe covalent. Les spectres sont enregistrés à 600MHz, 298 K.

III.3. Résultats

III.3.1. Attribution du mutant C70S de NterPilB

L'attribution séquentielle des fréquences de résonance de NterPilB_{C70S} à l'état non-lié, a été réalisée grâce à un spectre NOESY-HSQC ^{15}N avec comme point de départ, l'attribution des formes oxydée et réduite de NterPilB sauvage. La majorité des signaux ^1H , ^{13}C et ^{15}N est restée inchangée comparativement à la forme sauvage réduite de NterPilB (Figure 52). Cependant quelques perturbations apparaissent à proximité du motif $_{67}\text{CXXC}_{70}$. Ces données suggèrent que les éventuelles modifications conformationnelles dues à la mutation sont peu importantes.

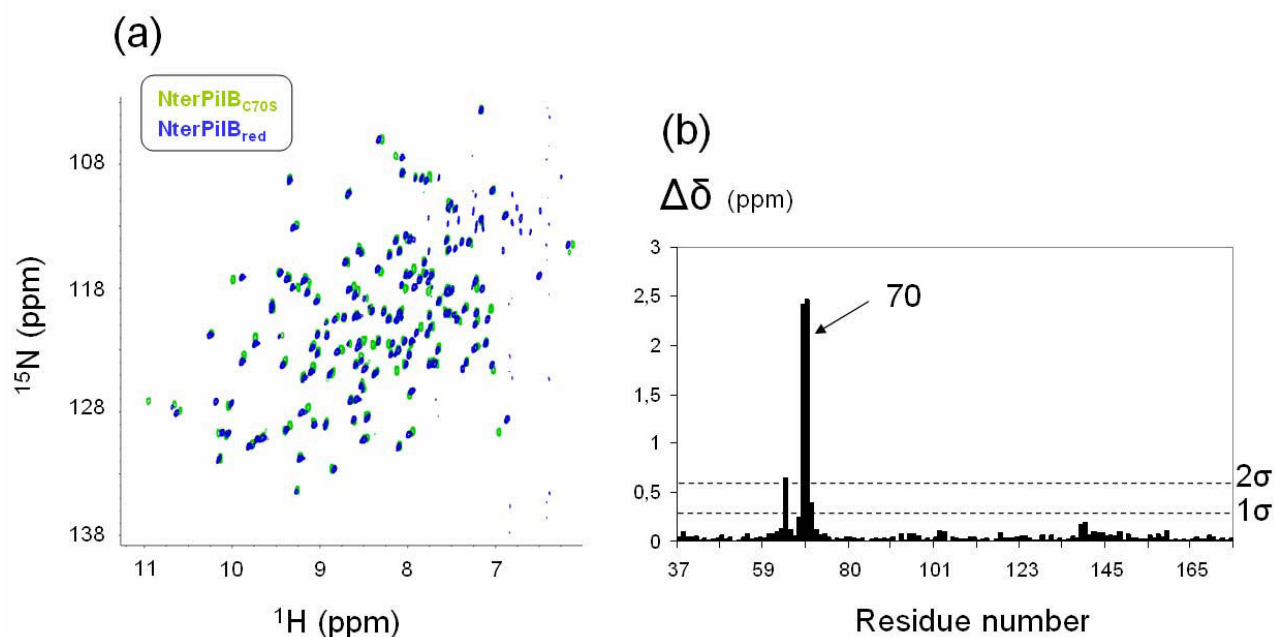


Figure 52 : Superposition des spectres HSQC ^1H - ^{15}N du mutant C70S de NterPilB (vert) et de la forme réduite sauvage de NterPilB (bleu) (a). Cartographie des variations de déplacements chimiques des groupements HN du squelette peptidique établie entre le mutant C70S de NterPilB et la forme réduite sauvage de NterPilB (b).

III.3.2. Attribution du complexe covalent nDsbD-SS-NterPilB

L'attribution des squelettes et des chaînes latérales de chaque composante du complexe nDsbD-SS-NterPilB a été un vrai pari puisqu'elle a nécessité de recourir à des échantillons deutérés et à un spectromètre de très haut champ (800 MHz).

Pour la composante nDsbD_{C103S}, le taux final d'attribution est très bon puisque tous les résidus, identifiés à l'état monomérique, ont été réattribués. Les variations des fréquences de résonance de certains signaux sont très significatives, notamment au niveau de la région $\beta 6$ - $\beta 7$ où squelette et chaînes latérales présentent des changements d'amplitude importante (résidu Glu69 à Val76). Des variations similaires sont observées dans la région $\beta 10$ - $\beta 11$ qui contient la cystéine 109 liée covalamment à NterPilB_{C70S} (Gly102, Ser103, Val108, Cys109, Tyr110 et Val113). Ces données suggèrent des modifications conformationnelles d'envergure (i) au niveau de la région « couvercle » de nDsbD_{C103S} et (ii) à proximité du pont disulfure intermoléculaire (Figure 53 a et b). Il faut prendre en compte que l'introduction du pont disulfure engendre des modifications d'environnement chimique locales pouvant être à l'origine de variations de déplacements chimiques importantes mais n'impliquant pas nécessairement des changements structuraux majeurs. C'est le cas par exemple des deux formes rédox de NterPilB.

Pour la composante NterPilB_{C70S}, la majorité des résidus, identifiés à l'état monomérique, a pu être réattribuée mais des ambiguïtés ont persisté pour les résidus Leu69, Cys70, Leu71, Thr124 et Tyr139. Ces résidus (excepté Thr124) forment le site actif de NterPilB. Leur identification est d'autant plus difficile qu'ils se trouvent à l'interface formée par les deux composantes du complexe. En effet, cette situation particulière

peut être à l'origine de temps de relaxation transversale T_2 très courts et, par-là même, d'un élargissement important des signaux RMN. Toutefois, des variations de position des signaux RMN sont observées pour les résidus Ser65, Trp66, Cys67, Ser73, Glu74, Val138 et Gly157 (Figure 53 c et d). Cela montre que l'environnement proche du motif ${}_{67}\text{CXXC}_{70}$ est modifié et que des résidus, présents dans les boucles $\beta 4$ - $\alpha 4$ et $\alpha 5$ - $\beta 5$, semblent subir des modifications conformationnelles dans le complexe covalent.

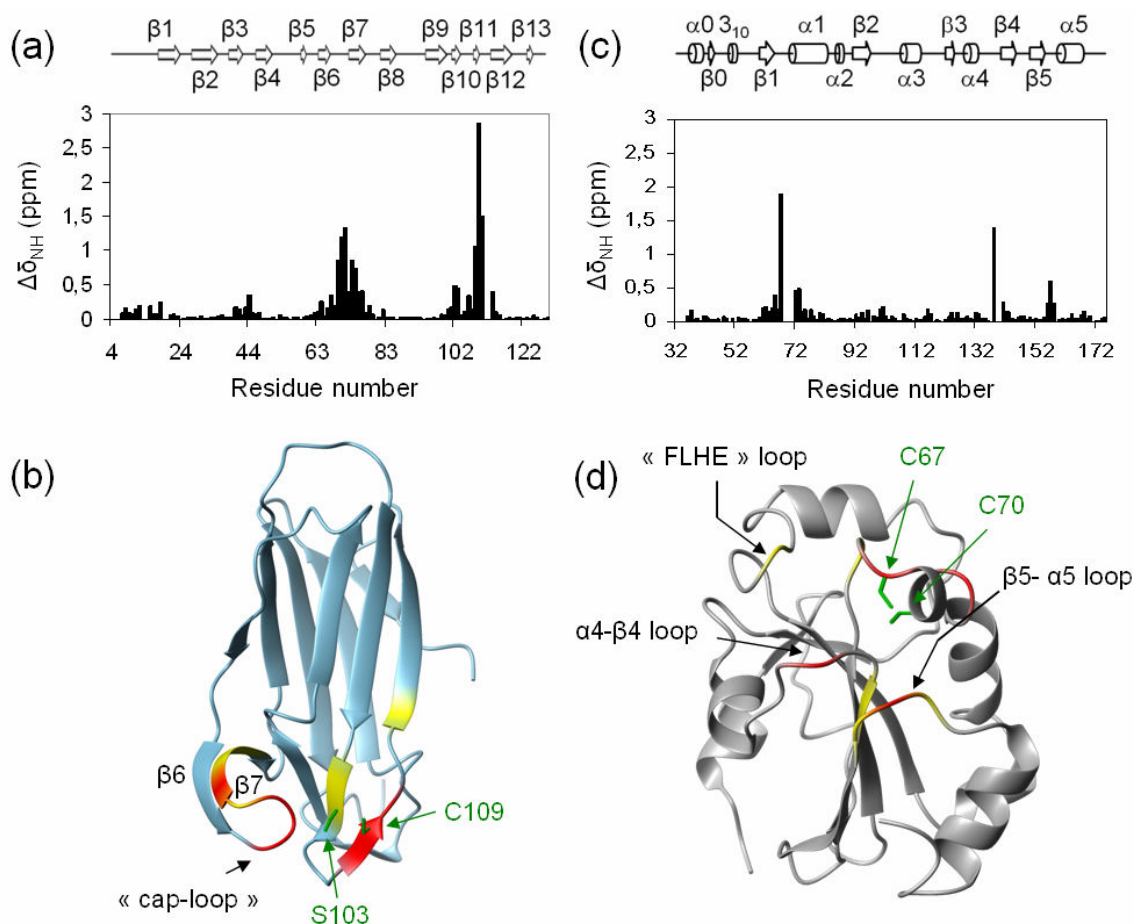


Figure 53 : Variations des déplacements chimiques, figurées par le paramètre $\Delta\delta$, des groupements NH du squelette peptidique de $n\text{DsbD}_{\text{C}103\text{S}}$ (a) et de NterPilB (c) suite à la formation du complexe covalent. Ces variations sont représentées sur les structures RMN les plus représentatives de $n\text{DsbD}_{\text{C}103\text{S}}$ (b) et de $\text{NterPilB}_{\text{ox}}$ (d). Les variations comprises entre 1 et 2 écart-types sont colorées en jaune, les variations supérieures à 2 écart-types, en rouge.

Ces données de variations de déplacements chimiques sont utilisées pour générer des contraintes ambiguës dans un protocole de docking. En effet, elles permettent de mettre en évidence les résidus jouant un rôle dans l'interaction entre les deux composantes du complexe.

Des expériences RMN de noesy filtrées ont été entreprises sur chacun des échantillons de complexes non-deutérés. Elles permettent d'identifier les protons à l'interface des deux partenaires du complexe. Une acquisition et une exploitation correctes de ces spectres sont cependant difficiles. Toutefois, quelques contraintes non-ambiguës ont pu être extraites de ces spectres.

IV. Etude de la structure et de la dynamique interne du complexe covalent nDsbD-SS-NterPilB

IV.1. Modélisation de la structure

IV.1.1. Méthodes pour le calcul des structures

Le docking a été réalisé avec HADDOCK2.0 couplé à une version recompilée de CNS1.2 (selon les recommandations des auteurs de ces programmes). Les structures de départ ont été la structure RMN la plus représentative de la forme réduite de NterPilB et la structure RMN la plus représentative de nDsbD_{C103S}. Pour donner de la liberté à la boucle « cap-loop » de nDsbD_{C103S}, ce segment a été défini comme flexible dans un protocole utilisant HADDOCK2.0 comme outil de dynamique moléculaire. En effet, de part son mode de fonctionnement, HADDOCK2.0 est incapable d'induire par lui-même de larges mouvements pour cette boucle lors des étapes dites de semi-flexibilité et de flexibilité. Ainsi, comme recommandé par les concepteurs du programme, il convient de réaliser une étape préliminaire de dynamique moléculaire en définissant les zones importantes comme flexibles. Cette étape préliminaire se justifie (i) par l'étude précédente des paramètres dynamiques de la « cap-loop » de nDsbD_{C103S} (cf chapitre 1) et (ii) par l'étude bibliographique portant sur nDsbD et qui montre une ouverture systématique de cette région dans les complexes impliquant nDsbD. Ainsi, nous avons abouti à un ensemble de 4 structures pour nDsbD_{C103S}. Cet ensemble ainsi que la structure de NterPilB sous forme réduite servent de base pour le protocole de docking.

Les contraintes ambiguës introduites dans ce protocole (AIRs) dérivent de la cartographie de variations de déplacement chimique et de l'analyse de l'accessibilité des résidus au solvant par NACCESS et MOLMOL. Ces données ont aussi permis de définir les régions flexibles dans chacune des composantes du complexe. Les contraintes non-ambiguës dérivent, quant à elles, de l'attribution des expériences de noesy filtrée. Le pont disulfure a été introduit comme une contrainte grâce à la fonction « DISU » de CNS1.2. Un ensemble de 1000 structures a été calculé lors de l'étape initiale, dite « rigid-body », puis les 300 structures de plus basses énergies ont été soumises à un protocole de recuit simulé qui tient compte de la flexibilité des chaînes latérales définies comme étant mobiles. Finalement, ces 300 structures ont été regroupées par famille en utilisant une valeur seuil pour le RMSD fixée à 1.2 Å.

IV.1.2. Analyse de la structure du complexe nDsbD-SS-NterPilB

HADDOCK2.0 a permis d'obtenir un ensemble de 10 structures pour le complexe covalent entre nDsbD et NterPilB (Figure 54).

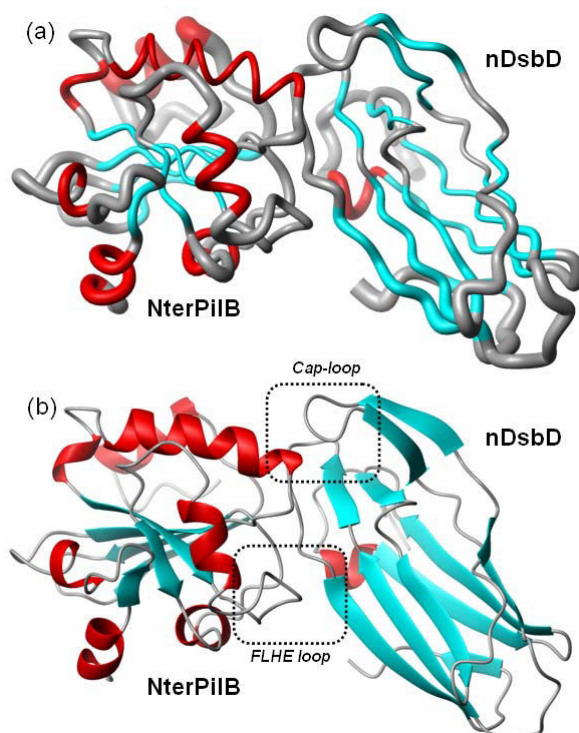


Figure 54 : Représentation de l'ensemble des 10 meilleures structures de nDsbD-SS-NterPilB généré par HADDOCK2.0 (a). La taille du boudin est proportionnelle à la valeur du rmsd calculé pour ces 10 structures. Représentation de la structure moyenne de nDsbD-SS-NterPilB (b). Pour chaque dessin, les structures secondaires sont représentées en bleu (brin β) et en rouge (hélice).

Globalement, la structure de chacun des partenaires est conservée. La « cap-loop » de nDsbD s'ouvre et se positionne au-dessus de l'hélice $\alpha 1$ de NterPilB. La boucle FLHE se positionne à proximité du flanc de nDsbD formé par les brins $\beta 10$ et $\beta 12$. Le segment Gly107-Pro111 de nDsbD contenant la Cys109 interagit avec les segments $\alpha 4$ - $\beta 4$ et $\beta 5$ - $\alpha 5$ de NterPilB.

IV.2. Etude de la dynamique interne

L'analyse des mouvements internes de nDsbD-SS-NterPilB est basée sur l'étude de la densité spectrale et les modèles de Lipari et Szabo (grâce au logiciel Tensor2).

Pour chaque partenaire, les zones présentées comme étant mobiles dans les formes libres conservent un profil dynamique similaire. Toutefois, pour le partenaire nDsbD, il apparaît que les segments 63-66 (situé dans la région de la « cap-loop ») et 109-112 (situé à proximité immédiate du pont S~S) gagnent en mobilité suite à la formation du complexe. Pour le partenaire NterPilB, une diminution discrète de la valeur du paramètre d'ordre S^2 peut être observée pour les segments 62-69 (situé au niveau du motif

CXXC), 74-85 (situé juste en aval du motif CXXC), 139-150 (situé dans la région du brin β 4) et 163-167 (situé dans la région de l'hélice α 5). Sa boucle FLHE demeure toutefois rigide.

IV.3. Discussion

Il existe trois structures RX de complexes impliquant nDsbD. Nous montrons avec cette quatrième structure, issue des données RMN, que la boucle FLHE de NterPilB induit une augmentation de la surface d'interaction entre les deux partenaires. Les caractéristiques de séquence, structurale et dynamique du partenaire Trx-like de nDsbD ont été examinées avec attention de façon à dégager les facteurs responsables dans la reconnaissance sélective.

Même si les chaînes latérales des résidus Leu100 et His101 de la boucle FLHE de NterPilB entre en contact avec le flanc défini par les brins β 9 et β 12 de nDsbD, il n'est pas si clair que cette boucle joue un rôle dans la reconnaissance des deux partenaires. En effet, la boucle FLHE ne montre pas de grandes variations d'ordre structural ou dynamique lorsque l'on compare, pour NterPilB, les états libre et complexé à nDsbD. De plus, l'orientation du partenaire Trx-like est la même dans le cas des complexes nDsbD-SS-NterPilB et nDsbD-SS-DsbE et l'équipe du MAEM a su montrer que, chez *Neisseria meningitidis*, la réduction de DsbE et de NterPilB par nDsbD se faisait avec des efficacités comparables. L'ensemble de ces données laissent alors envisager un rôle prépondérant de cette boucle pour d'autres partenaires tels que les domaines Msr de PilB.

En ce qui concerne la « cap-loop » de nDsbD de *Neisseria meningitidis*, nous montrons que celle-ci s'ouvre dans le complexe pour se positionner au-dessus de l'hélice α 1 de NterPilB. Cette boucle conserve des propriétés dynamiques remarquables. En regard de l'absence de séquence consensus déterminée entre les partenaires Trx-like de nDsbD, nous proposons que cette flexibilité aide justement cette boucle à s'adapter à un nombre de partenaires importants. De plus, comme l'ouverture de cette boucle doit se faire avant la formation du pont disulfure intermoléculaire afin d'éviter toute entrave stérique, nous pensons que la « cap-loop » ne doit pas posséder, elle aussi, un rôle premier et discriminant dans la sélectivité de nDsbD.

Une autre zone d'interaction présente des caractéristiques intéressantes dans le complexe nDsbD-SS-NterPilB ; il s'agit de la région du pont S~S formée, d'une part, par les boucles α 4- β 4 et β 5- α 5 ainsi que par l'hélice α 1 de NterPilB, et, d'autre part, par les segments Pro13-Glu15 et Gly107-Pro111 de nDsbD. Comme observé sur les complexes résolus par RX, cette région est stabilisée par une liaison hydrogène entre le groupement carbonyle du résidu 139 et le groupement amide de la cystéine 109. En outre, nous mettons en évidence, dans le cas du complexe nDsbD-SS-NterPilB, la création d'une poche hydrophobe stabilisatrice pour le résidu Val138 de NterPilB, qui, dans les autres partenaires Trx-like de nDsbD, est une glycine. Cette région possède un comportement dynamique particulier qui pourrait aider, là aussi, à l'adaptabilité du substrat mais l'analyse des séquences des partenaires Trx-like de nDsbD ne permet pas vraiment d'y dégager un réel consensus. C'est pourquoi nous proposons que ce soit l'agencement

structural, dessiné par les boucles α 4- β 4 et β 5- α 5 et la partie N-terminale de l'hélice α 1 incluant la signature CXXC (et non pas la présence d'un certain type de résidus d'acides aminés), qui soit le moteur de la reconnaissance entre les deux partenaires. De plus, l'analyse dynamique faite sur le complexe nDsbD-SS-NterPilB suggère qu'un transfert de mouvements pourrait s'opérer entre la « cap-loop » de nDsbD et l'hélice α 1 de NterPilB. Ce phénomène pourrait jouer un rôle dans l'étape de rupture du complexe.

En conclusion, l'ensemble de nos données permettent de proposer une sorte de chemin réactionnel pour l'interaction entre nDsbD et son partenaire Trx-like. Nous savons désormais que la dynamique intrinsèque de nDsbD sous sa forme libre peut être un facteur clef pour l'ouverture de sa « cap-loop ». De fait, la forme ouverte de nDsbD pourrait reconnaître l'agencement structural particulier des partenaires Trx-like. Les paramètres dynamiques observés dans le complexe, au niveau de la « cap-loop » et du segment Gly107-Pro111 de nDsbD et au niveau des boucles α 4- β 4 et β 5- α 5 de NterPilB faciliteraient le positionnement relatif des deux partenaires. Ainsi, la liaison hydrogène intermoléculaire conservée pourrait s'établir. Tous ces phénomènes permettraient alors le positionnement correct des cystéines 67 de NterPilB et 109 de nDsbD et la formation du pont S~S. Un transfert de dynamique entre nDsbD et le partenaire Trx-like aiderait à la déstabilisation ultérieure du complexe.

IV.4. Publication

Pour obtenir plus de détails sur l'analyse structurale et dynamique par RMN de nDsbD-SS-NterPilB, il convient de se rapporter au manuscrit ci-après. Celui-ci sera prochainement soumis.

Formation of the complex between DsbD and PilB N-terminal domains from *Neisseria meningitidis* necessitates a powerful adaptability of nDsbD

Marc Quinternet^{1,†}, Pascale Tsan^{1,†}, Laure Selme-Roussel^{2,†}, Christophe Jacob², Sandrine Boschi-Muller², Guy Branlant^{2*} and Manh-Thong Cung^{1*}

¹Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire UMR 7568 CNRS-INPL, Nancy Université, 1 rue Grandville, B.P. 20451, 54001 Nancy cedex, France.

²Maturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, UMR 7567 CNRS-UHP, Nancy Université, Faculté des Sciences et Techniques, Bld des Aiguillettes, B.P. 239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

*To whom correspondence should be addressed. Phone: (33) 3 83 17 51 07. Fax: (33) 3 83 37 99 77. E-mail: Manh-Thong.Cung@ensic.inpl-nancy.fr; Phone: (33) 3 83 68 43 04. Fax: (33) 3 83 68 43 07. E-mail: guy.branlant@maem.uhp-nancy.fr.

†These three authors contributed equally to this work.

Running title: NMR structure and dynamics of nDsbD-SS-NterPilB

Subject categories: proteins; structural biology

Keywords: nDsbD; NterPilB; dynamics; docking; chemical shift perturbation; mixed disulfide covalent complex; protein-protein interaction.

SUMMARY

DsbD transmembrane protein dispatches electrons to periplasmic Trx/DsbE-like partners *via* specific interactions with its N-terminal domain, nDsbD. In the present study, PilB N-terminal domain (NterPilB) is shown to accept efficiently electrons coming from nDsbD from *Neisseria meningitidis*. Using NMR driven docking approach, we have modeled the structure of a mixed disulfide complex between NterPilB and nDsbD. We show the needed opening of nDsbD cap-loop whereas NterPilB FLHE loop does not seem essential in the formation and stabilization of the complex. Relaxation analysis performed on backbone amide groups highlights a dynamics transfer from nDsbD cap-loop on NterPilB α 1 helix, suggesting that a mobility contribution is required not only for the formation of the mixed disulfide complex, but for its disruption too. Taking into account previous X-ray data on covalent complexes involving nDsbD, a cartoon of interactions between Trx-like partners and nDsbD is proposed which illustrates the powerful adaptability of nDsbD.

INTRODUCTION

DsbD transmembrane protein catalyzes the transport of two electrons from the cytoplasmic thioredoxin (Trx) towards various periplasmic targets through disulfide bond protein exchanges (Stewart et al., 1999). Indeed, it distributes electrons: (i) to the periplasmic DsbC, which is involved in the disulfide isomerization and in the chaperoning system, (ii) to DsbE/CcmG belonging to the cytochrome *c* biogenesis pathway, (iii) and to DsbG, a putative DsbC paralogue of unknown function yet (Porat et al., 2004). DsbD is an inner membrane protein composed of three domains: an N-terminal periplasmic domain (nDsbD), a central transmembrane domain (tDsbD) and a C-terminal periplasmic domain (cDsbD) (Chung et al., 2000). Electrons from Trx successively pass through tDsbD, cDsbD and nDsbD before being dispatched to DsbD periplasmic partners (Katzen and Beckwith, 2000). Acting like a “redox hub”, nDsbD is therefore the DsbD domain responsible for the electron distribution towards its protein targets with which it should interact specifically (Stirnemann et al., 2006).

The structures of the oxidized form of *Escherichia coli* nDsbD (Goulding et al., 2002) and of its mixed disulfide complexes with either cDsbD (Rozhkova et al., 2004) or the downstream *in vivo* partners DsbC (Haebel et al., 2002) and CcmG (Stirnemann et al., 2005) were determined recently by X-ray crystallography. *E. coli* nDsbD displays an immunoglobulin fold; a cap-loop region (residues D68-G72) appears to cover the two active cysteines (C103 and C109) in the oxidized form while it undergoes a complete opening upon formation of a covalent complex between nDsbD and CcmG/DsbE and adopts an intermediate conformation in the complex with

DsbC. Although around 90% of the nDsbD interface is conserved in the three complexes, significant differences in the mode of interaction are observed (Stirnemann et al., 2006). For instance, the thioredoxin-like fold of DsbC adopts in its complex with nDsbD an orientation differing by around 20° from that encountered in the case of the complexes with cDsbD and CcmG. Besides, the nDsbD-SS-DsbC complex exhibits an additional binding interface and therefore a much larger overall binding area than in the nDsbD-SS-cDsbD complex. Moreover, the recognition of CcmG involves the N-terminal segment of nDsbD which establishes intermolecular hydrogen-bond with a specific tyrosine, at position 141, in CcmG.

nDsbD from *Neisseria meningitidis* was recently isolated by our group and the structure and dynamics of the C103S nDsbD were characterized in solution by NMR (Quinternet et al., 2008b). The results showed that the cap-loop keeps a closed conformation in the reduced state but with some mobility. As shown in the present study, the oxidized form of the N-terminal domain of PilB from *N. meningitidis* (NterPilB) under disulfide state is efficiently reduced by the *N. meningitidis* nDsbD domain. NterPilB is a Trx-like protein exhibiting disulfide oxidoreductase activity towards the PilB methionine sulfoxide reductase (Msr) domains (Wu et al., 2005) and belongs to the DsbE structural family (Ranaivoson et al., 2006). The X-ray diffraction and NMR (Quinternet et al., 2008a) studies of NterPilB highlighted the presence of a rigid specific ${}_{99}\text{FLHE}_{102}$ loop covering one edge of the active site in its oxidized and reduced states. This additional loop is found neither in Trxs, nor in DsbEs and other cytochrome maturation proteins (CMPs). It has been postulated that this loop plays a structural discriminating recognition role relative to Msrs (Ranaivoson et al., 2006).

In that context, we have characterized by NMR the mode of interaction between *N. meningitidis* nDsbD and NterPilB in order to get insight, not only into the structural elements involved in the recognition between both partners, but also into the dynamics factors, which can not be easily extracted from X-ray diffraction studies. Prior to these studies, we have shown that C109 of the nDsbD is probably the cysteine involved in the formation of the interdisulfide transient intermediate with NterPilB. We have consequently formed the mixed disulfide complex between the C103S nDsbD and the C70S NterPilB (nDsbD-SS-NterPilB) and, using NMR, modeled its structure by docking and characterized its dynamics. The dynamic results have been obtained for each of the two partners within the covalent complex, nDsbD_{cx} and NterPilB_{cx}. They are compared to those previously reported by us for both free proteins, nDsbD_{free} (Quinternet et al., 2008b) and NterPilB_{free} (Quinternet et al., 2008a), having in mind to focus

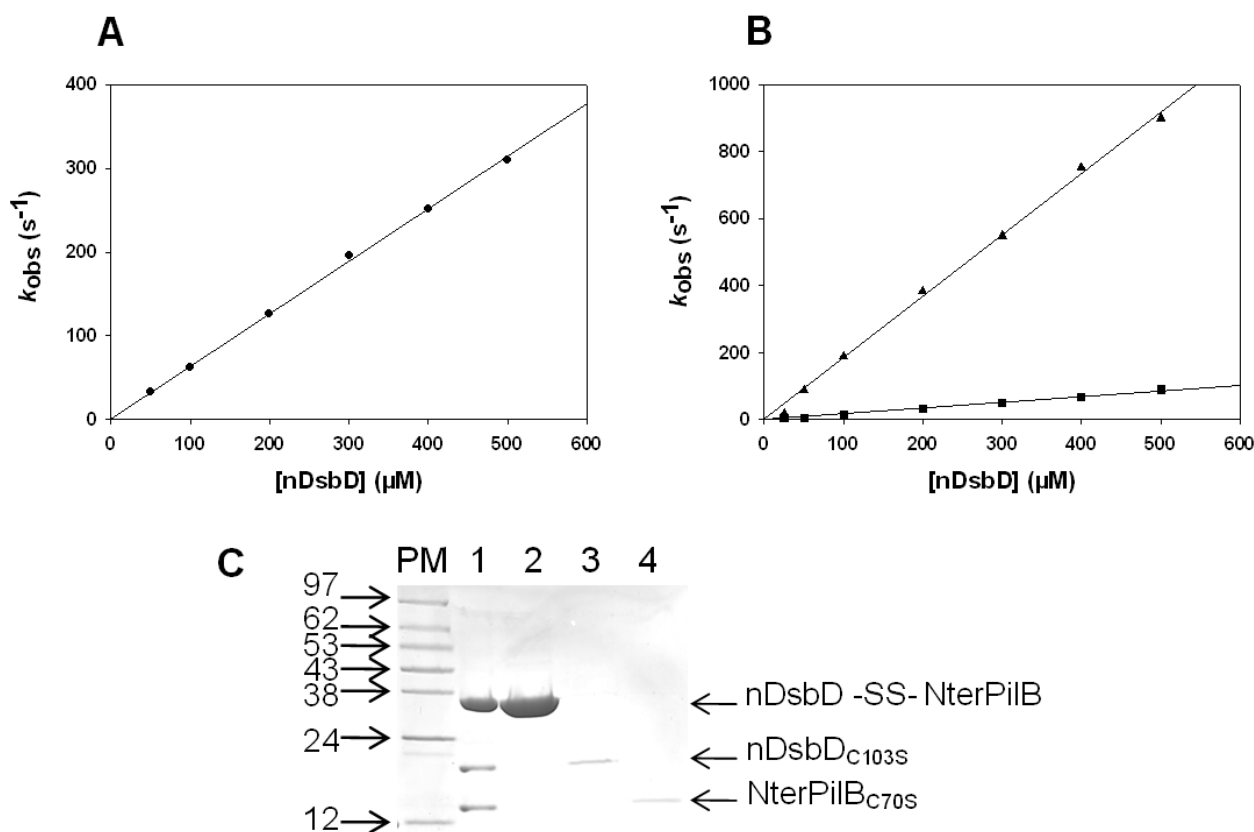


Figure 1. Efficient reduction of NterPilB by nDsbD. Kinetics of the reduction of the NterPilB by the wild-type (A), C103S and C109S (B) nDsbDs and analysis of the nDsbD-SS-NterPilB complex purification on 12.5% SDS-PAGE (C). (A, B) The increase of the NterPilB fluorescence intensity associated with its disulfide bond reduction was recorded on a stopped-flow apparatus at 25 °C in buffer A, pH 8. NterPilB final concentration was 10 μM. Excitation wavelength was set at 293 nm and emitted light was collected above 320 nm using a cutoff filter. Data were fit to linear regression equation, which gave k_2 values of $(6.3 \pm 0.1) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ with wild-type nDsbD (●), $(1.85 \pm 0.04) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ with C103S nDsbD (▲), and $(1.78 \pm 0.05) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ with C109S nDsbD (■). (C) Activated NterPilB_{C70S}-TNB was incubated with equimolar concentration of C103S nDsbD in TE buffer, pH 8. Purification of the reaction products (lane 1) was achieved by gel filtration, which allows the isolation of the nDsbD-SS-NterPilB complex (lane 2) from the nDsbD_{C103S} (lane 3) and NterPilB_{C70S} (lane 4) species. The positions at which nDsbD-SS-NterPilB complex, nDsbD_{C103S} and NterPilB_{C70S} migrate are indicated by arrows on the right. The position of the marker proteins (lane PM) are indicated on the left in kDa.

on the perturbations caused by the complex formation. The contact area within the complex and the role of the cap-loop and the FLHE loop are also discussed in regards to the other nDsbD complexes reported so far.

RESULTS

NterPilB is Efficiently Reduced by nDsbD

The rate of reduction of oxidized NterPilB by nDsbD was determined by following selectively the enhancement of the fluorescence emission of the Trp residues of the NterPilB, associated with the reduction of its C67/C70 disulfide bond (Wu et al., 2005). Indeed, whereas the NterPilB contains five tryptophanes, in particular W66 located before the CXXC motif, the nDsbD has no Trp residue and thus this explains why it displays no variation in its fluorescence message whatever its state *i.e.* reduced or oxidized form (spectra not shown). For each concentration of nDsbD, the curves fitted to a monoexponential equation and a k_{obs} value was determined. No kinetic saturation effect was observed up to 500 μM nDsbD. The slope of the curve, k_{obs} versus

nDsbD concentration, provided a k_2 value of $6.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Figure 1A). This k_2 value is high and is in the range of those determined for nDsbD with its known periplasmic protein targets (Rohzkova et al., 2004; Stirnimann et al., 2005). Therefore, nDsbD is the physiological reductant of the NterPilB domain as recently proposed (Brot et al., 2006).

Moreover, the fact that no kinetic saturation was observed up to 500 μM nDsbD argues for a low affinity between the two partners. Thus, the only way to obtain a stable complex between nDsbD and NterPilB was to form a covalent complex representative of the transient inter-disulfide complex that occurs upon the NterPilB-recycling process.

Characterization of the Cysteine Residue of nDsbD that Forms a Transient Disulfide Intermediate with NterPilB

In contrast to that was shown for *E. coli* nDsbD (Rohzkova et al., 2004), C103 and C109 in wild type, C109 in C103S nDsbD and C103 in C109S

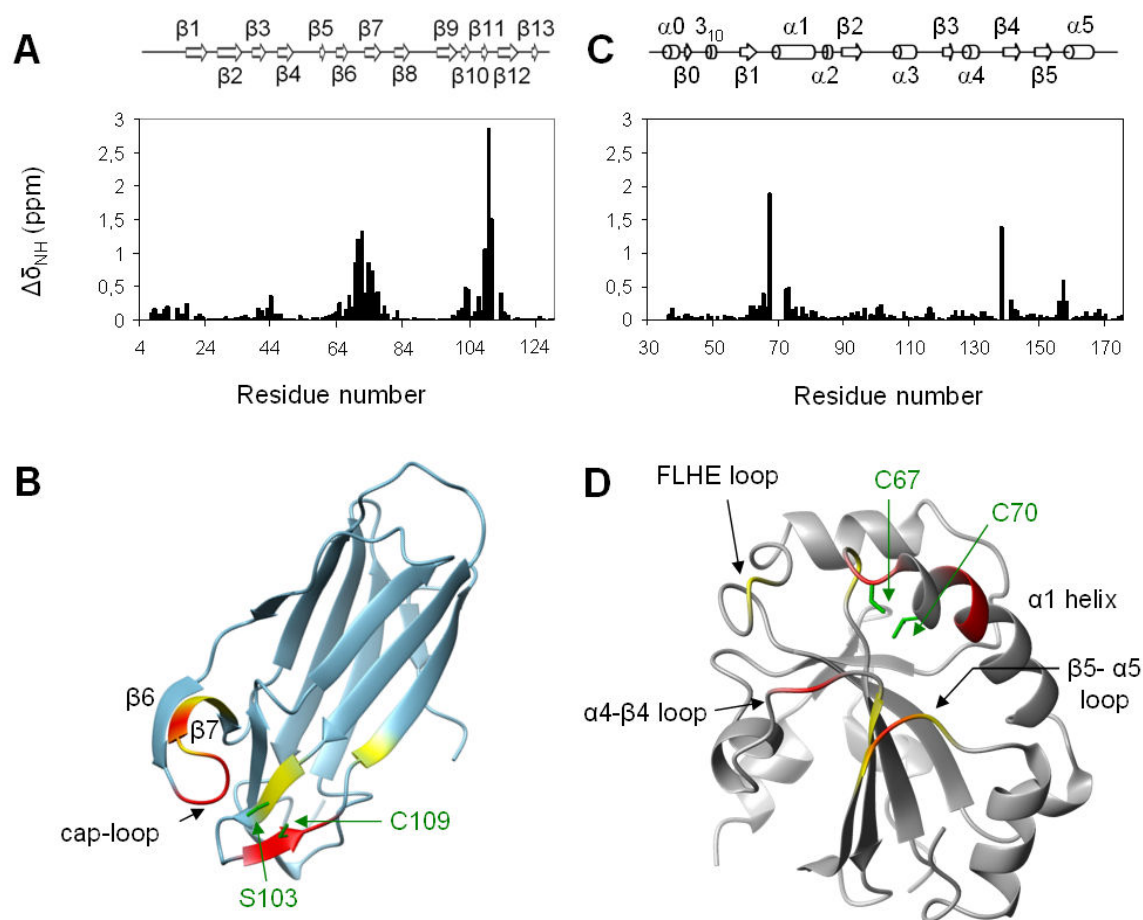


Figure 2. Chemical shift perturbations upon complexation. Plot of the amide chemical shift change $\Delta\delta_{\text{NH}}$ between nDsbD_{free} and nDsbD_{cx} versus the residue number (A) and its representation on the NMR structure (pdb code 2k0r) (B). Plot of the amide chemical shift change $\Delta\delta_{\text{NH}}$ between NterPilB_{C70S} and NterPilB_{cx} (C) and its representation on the NMR structure of the reduced form (pdb code 2jzs) (D). For (A) and (C), $\Delta\delta_{\text{NH}}$ is defined as follow $\Delta\delta_{\text{NH}} = \Delta\delta(^1\text{H}) + \Delta\delta(^{15}\text{N})/f$ where f is the correction factor calculated from the ratio of the dispersion of the backbone ^{15}N resonances and that of the ^1H signals (Williamson, 1997). The correction factor f was calculated separately for glycine residues and for all other residues. For (B) and (D), the residues exhibiting variations $\sigma < \Delta\delta_{\text{NH}} < 2\sigma$ and $\Delta\delta_{\text{NH}} > 2\sigma$ are respectively colored in yellow and red. The side chains of the catalytic cysteines and of the recycling cysteine mutated into serine are displayed in green.

nDsbD from *N. meningitidis* are reactive towards the Ellman's reagent (data not shown). Therefore, to characterize the cysteine residue of nDsbD that selectively forms a transient mixed disulfide with NterPilB, the catalytic efficiency (k_2 value) of the two single-cysteine variants, C103S and C109S nDsbDs, towards NterPilB was determined using the same approach as for the nDsbD wild type. As shown in Figure 1B, formation of the inter disulfide bond with NterPilB is 10-fold more efficient with C103S nDsbD compared to C109S nDsbD. This is a strong argument in favor of the implication of C109 in the formation of the transient disulfide intermediate between nDsbD and NterPilB. Moreover, the fact that: (i) the NterPilB belongs to the DsbE family and has a Trx-like fold and, (ii) the catalytic cysteine of DsbEs and Trxs was shown to be the cysteine involved in the formation of transient disulfide bond with its protein targets, supports a similar role for the catalytic C67 of the NterPilB with its protein partners such as nDsbD. Therefore, the reduction of the oxidized form of the NterPilB by nDsbD probably passes through

formation of a transient disulfide intermediate via C67 and C109 of NterPilB and nDsbD, respectively. Consequently, the covalent disulfide complex between C103S nDsbD and C70S NterPilB was prepared and used to characterize the interactions between NterPilB and nDsbD (Figure 1C).

Assignment of the nDsbD-SS-NterPilB Complex and Chemical Shift Mapping

Assignment was obtained for all of the backbone amide nuclei, except for the N-terminal residues M4, A5 and L6 in nDsbD_{cx} and for residues V33, H35, L69, C70, L71 and Y139 in the NterPilB_{cx}. Assignment of most side-chain protons has been obtained with a similar proportion to the assignments reported previously for each partner, except for the side-chains of the complex residues that the NH group assignment is missing.

Table 1. List of Interacting Residues and Structural Analysis of the HADDOCK2.0 Results

	NterPilB	nDsbD
<i>Chemical shift perturbation</i>		
Occurrence	10	14
Residue sequence number	65, 67, 69 to 73, 138, 139, 157	69 to 76, 102, 103, 108 to 110, 113
<i>Docking</i>		
Active residues (occurrence)	9	8
Residue sequence number	67 to 72, 138, 139, 157	69 to 72, 108, 109, 110, 113
Passive residues (occurrence)	9	10
Residue sequence number	66, 73, 74, 100, 101, 137, 140, 156, 158	43 to 45, 73, 74, 106, 107, 111, 112, 114
Flexible segments	65 to 74, 99 to 102, 137 to 141, 156 to 159	43 to 45, 68 to 74, 106 to 114
nDsbD-SS-NterPilB		
<i>Ambiguous restraints (occurrence)</i>		
Coming from NterPilB	9	
Coming from nDsbD	8	
<i>Unambiguous restraints (occurrence)</i>		
Coming from nDsbD	6	
<i>RMSD from the mean structure (Å)</i>		
All backbone atoms	1.01	
All heavy atoms	1.19	
Flexible interface backbone atoms	0.65	
Flexible interface heavy atoms	1.04	
<i>Energies (kcal.mol⁻¹)^a</i>		
E _{inter}	-111 ± 32	
E _{intr}	-51 ± 3	
E _{ext}	-134 ± 30	
E _{amb}	72 ± 7	
Number of AIR violation (>0.3 Å)	2.9 ± 0.3	
Buried surface area (Å ²) ^b	1475 ± 80	
<i>Ramachandran statistics (PROCHECK-NMR)</i>		
Residues in the most favorable region (%)	82.1	
Residues in additionally allowed regions (%)	16.6	
Residues in generously allowed regions (%)	0.9	
Residues in disallowed regions (%)	0.4	

^a The non-bonded energies were calculated with the OPLS parameters using a 8.5 Å cut-off

^b The buried surface area was calculated with CNS using a 1.4 Å radius water probe and an accuracy of 0.075 Å.

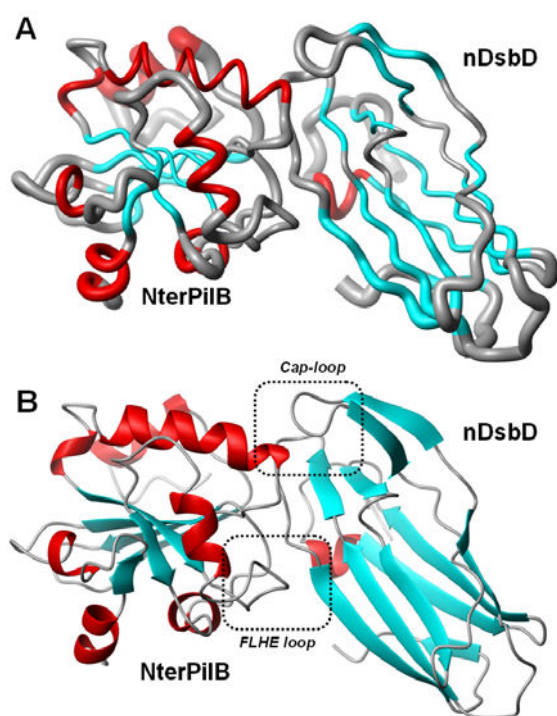


Figure 3. Structures of the mixed disulfide complex nDsbD-SS-NterPilB generated by HADDOCK2.0. The ensemble of the ten best structures is represented using a spline representation (A). The radius of the tube is proportional to the backbone rmsd of each residue. The FLHE loop of NterPilB and the “cap-loop” of nDsbD are indicated on the mean structure (B). For both drawings, the secondary structures are indicated in red for helices and in blue for β strands. The figure was generated with MOLMOL.

Compared to the free form assignment of both partners (Beaufils et al., 2006; Quinternet et al., 2007; Quinternet et al., 2008c), significant amide chemical shift changes upon complex formation are observed in the E69-V76, G102-S103 and V108-V113 segments of nDsbD_{cx} and in the S65-E73, V138-Y139 segments and Y157 residue of NterPilB_{cx}, as displayed in Figure 2A and 2B. Figures 2C and 2D show that these residues are located near the active sites. In DsbD_{cx}, they concern not only the segments around the C109 active cysteine and the recycling cysteine mutated into serine at position 103, but also the cap-loop comprised between strand $\beta 6$ and $\beta 7$ and part of strand $\beta 7$. In NterPilB_{cx}, the largest variations are found in the $\beta 1$ - $\alpha 1$ loop and the $\alpha 1$ helix bearing the active site, while smaller changes are observed in the $\alpha 4$ - $\beta 4$ and $\beta 5$ - $\alpha 5$ proximal loops. Considering side-chain protons of NterPilB_{cx} and nDsbD_{cx}, significant chemical shift changes are observed too, in a similar way to those observed for their corresponding backbone amide groups.

Modeling of the Complex by Docking

Chemical shift mapping combined with filtered noesy data have permitted to obtain a total of 6 ambiguous and 17 unambiguous restraints which have been used to drive the docking protocol performed by HADDOCK2.0. The segments S65-E73, F99-E102, S137-S141 and K156-I159 of NterPilB_{cx} and the segments Q43-K45, D68-G72 and A106-D114 of nDsbD_{cx} were defined as semi-flexible and flexible. The cut-off value of 1.2 Å for clustering of solutions permits to define 2 clusters of structures which size was superior to 20 structures. The cluster with the lowest haddock score was chosen as the best representative cluster (Figure 3). The table I summarized the docking input parameters and the statistical analysis done for the ensemble of the ten best structures of nDsbD-SS-NterPilB, which have been deposited in the *RCSB Protein Data Bank* (www.rcsb.org/pdb) under access code 2k9f.

One can immediately notice that the overall Trx and immunoglobulin folds of NterPilB_{cx} and nDsbD_{cx}, respectively, are conserved in the ensemble of structures obtained after the docking procedure. All of the input parameters contribute to a favored orientation of each component of the mixed-disulfide complex in which the $\beta 6$ - $\beta 7$ and $\beta 10$ - $\beta 11$ regions of nDsbD_{cx} are located over and under the $\alpha 1$ helix of NterPilB_{cx}, respectively, the NterPilB_{cx} C67 and nDsbD_{cx} C109 being engaged in a intermolecular disulfide bond (Figure 4A). A second interface area is defined by the characteristic FLHE loop of NterPilB_{cx} and the side of nDsbD_{cx} displaying the strands $\beta 10$ and $\beta 12$ (Figure 4B). A third interface area in the SS-bond region is defined by the $\alpha 4$ - $\beta 4$ and $\beta 5$ - $\alpha 5$ loops of NterPilB_{cx} and the segments P13-E15 and G107-P112 of nDsbD_{cx} (Figure 4C).

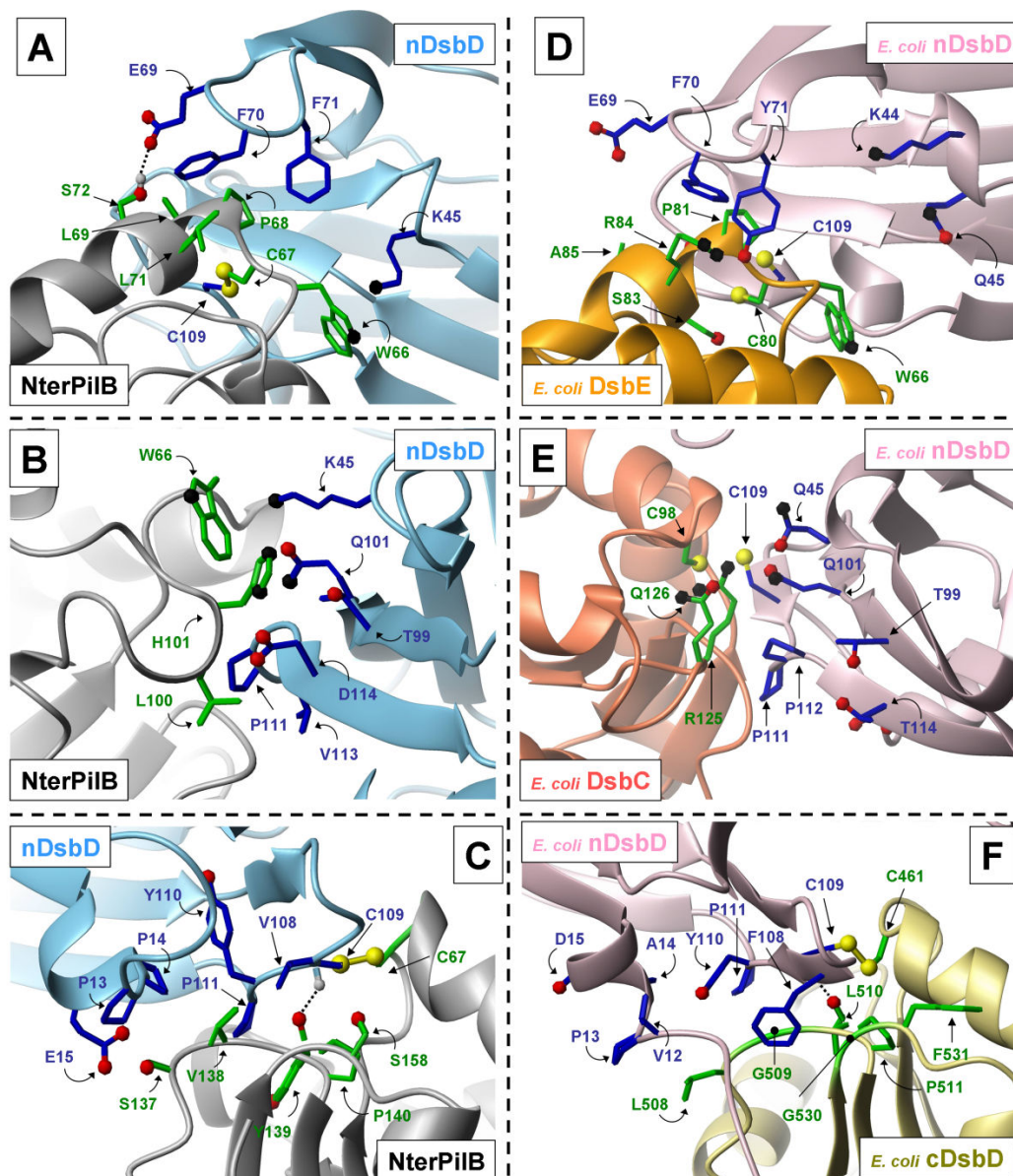


Figure 4. Interaction areas between nDsbD and its Trx-like partners. Close-up into the cap-loop region of nDsbD (A), into the FLHE loop region of NterPilB (B) and into the SS bond region (C) figured on the ribbon representation of nDsbD-SS-NterPilB best structure. Close-up into the cap-loop region of nDsbD-SS-DsbE (D), into the β 10- β 12 side of nDsbD-SS-DsbC (E) and into the SS bond region of nDsbD-SS-cDsbD (F). The side-chains of the residues are drawn using blue (nDsbD) and green (Trx-like) sticks. Only heavy atoms are represented. Nitrogen, oxygen and sulfur atoms are respectively represented with black, red and yellow balls. Hydrogen bonds are indicated with a dotted line.

Such a conformation of the mixed-disulfide complex imposes the cap-loop region of nDsbD_{cx} to adopt an opened form in which the aromatic ring of F70 does not block the cavity entrance of nDsbD_{cx}. The mean distance between C ^{β} atoms of F70 and C109 increases *de facto* from a value of 7.0 Å in nDsbD_{free} to 11.3 Å in nDsbD_{cx}. This aromatic ring remains on the surface of NterPilB_{cx}, this permitting interaction between nDsbD_{cx} E69 and NterPilB_{cx} S72. Moreover, the aromatic ring of nDsbD_{cx} F71 rocks around the C ^{β} -C ^{δ} bond to come closer to the aliphatic side-chains of NterPilB_{cx} L71 and P68. In the FLHE loop region, the conformation of the complex

is stabilized by close interactions between the imidazole ring of NterPilB_{cx} H101 and the side-chains of nDsbD_{cx} T99 and D114, and by hydrophobic contacts between nDsbD_{cx} P111 and V113 and NterPilB_{cx} L100. In the SS-bond region, such hydrophobic interactions take place between P13, P14, V108 and P111 of nDsbD_{cx} and V138 of NterPilB_{cx}. Close contacts are notably observed between nDsbD_{cx} K45 and Q101 and NterPilB_{cx} W66.

Relaxation Parameters Analysis

The ¹⁵N longitudinal relaxation rate (R_1), ¹⁵N transverse relaxation rate (R_2) and the steady-state

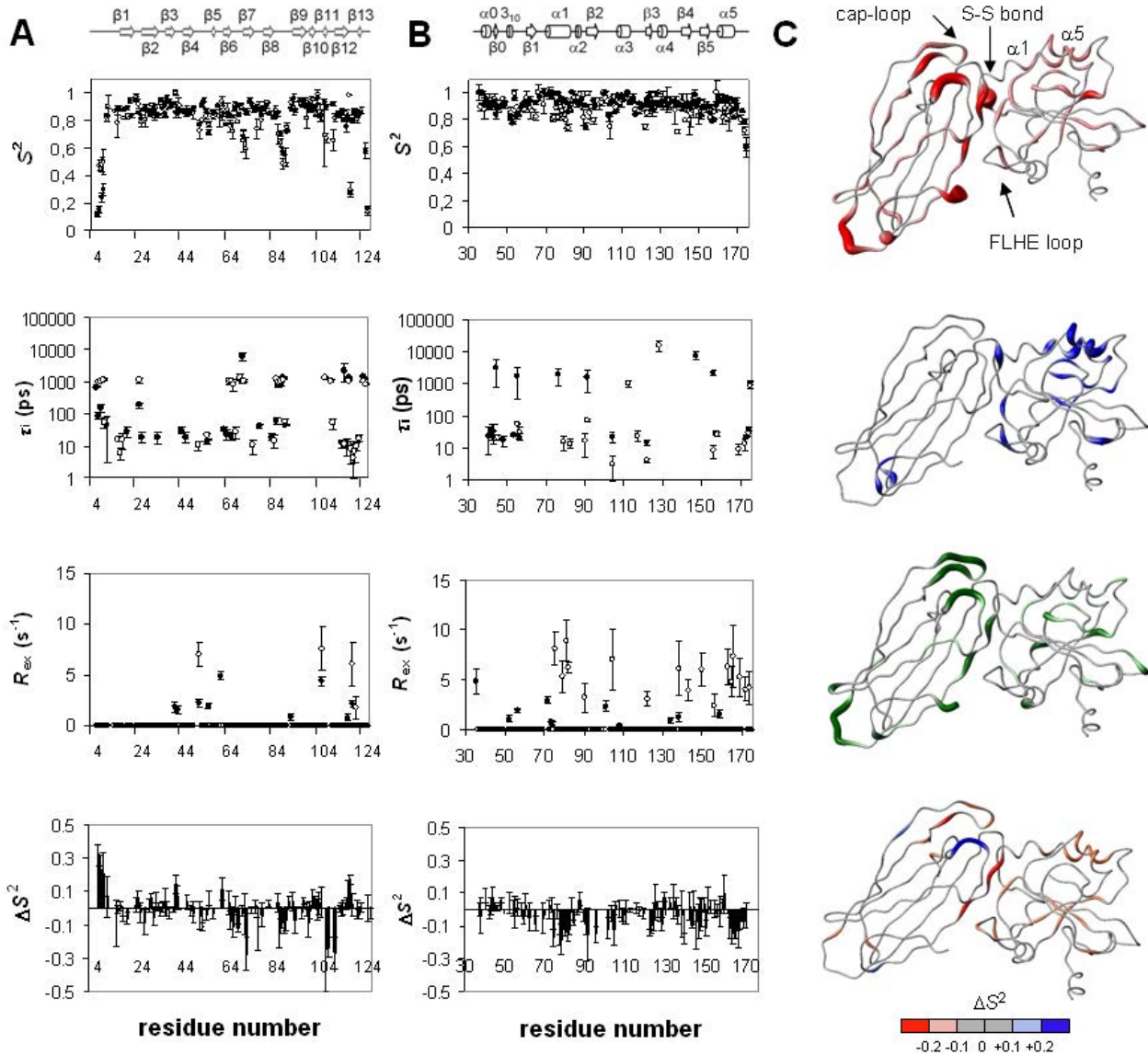


Figure 5. Internal mobility in nDsbD-SS-NterPilB. Model-free internal mobility parameters of (A) nDsbD_{cx} (○) compared to those of nDsbD_{free} (●) and of (B) NterPilB_{cx} (○) compared to those of NterPilB_{free} in its oxidized form (●): order parameter S^2 , internal correlation time τ_i and exchange term R_{ex} are plotted versus the amino acid sequence. ΔS^2 is the difference of order parameter between the bound form and the free form. The secondary structure elements are shown at the top. (C) Representation of nDsbD-SS-NterPilB mobility parameters on the best structure with a spline width and color intensity proportional to their values (proportional to $\log \tau_i$ for the internal correlation time).

$\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N heteronuclear NOE values were measured for 93 and 109 backbone NH groups, respectively in the nDsbD_{cx} and the NterPilB_{cx} (see Supplemental Data S1). The unanalyzed residues were either unassigned or overlapped. The average values for the backbone ^{15}N -nuclei of nDsbD_{cx} are: $\langle R_1 \rangle = 0.79 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$, $\langle R_2 \rangle = 19.7 \pm 1.3 \text{ s}^{-1}$, $\langle \text{NOE} \rangle = 0.71 \pm 0.04 \text{ s}^{-1}$. Those of the backbone ^{15}N -nuclei of NterPilB_{cx} are: $\langle R_1 \rangle = 0.76 \pm 0.05 \text{ s}^{-1}$, $\langle R_2 \rangle = 22.2 \pm 2.3 \text{ s}^{-1}$, $\langle \text{NOE} \rangle = 0.80 \pm 0.07 \text{ s}^{-1}$. Thus, R_1 and R_2 significantly decrease and increase, respectively, due to the slower overall tumbling rate (larger size) of the complex compared to the free constitutive proteins (see Supplemental Data S1). The mean NOE values of both components are unchanged, indicating that they remain well structured globally in the complex.

The relaxation parameters plotted versus the protein sequence globally display similar profiles to those observed in the free proteins. However, interestingly, a few differences can be underlined such as the clear drop of the NOE values of residues K66 up to G72, while they were barely below the average value in nDsbD_{free}. This suggests an increased flexibility in the complex for this segment which precisely corresponds to the cap-loop. Concerning NterPilB_{cx}, the only remarkable changes observed in the bound state are the relatively low R_1 together with high R_2 values in the L74-A81 segment. No striking difference is noticed in the FLHE loop.

Reduced Spectral Density Mapping

Reduced spectral density mapping, which does not require any model for the global motion and for the internal motion, was used first to analyze the relaxation data. The $J_{eff}(0)$, $J(\omega_N)$ and $\langle J(\omega_H) \rangle$ obtained values are given in Supplemental Data S2.

In nDsbD_{cx}, a sharp decrease of $J_{eff}(0)$ compensated for a large increase of $\langle J(\omega_H) \rangle$ is observed in both states within the N-terminus, C-terminus, the segment K89-E93 and for G121. This indicates that the large flexibility at both extremities of the protein, as well as in the β 8- β 9 loop and for G121 is conserved in the complex. The $J(\omega_H)$ values calculated for the complex are, in average, lower than those in the unbound protein because of the slower tumbling of the molecule and generally, they follow a similar profile. However, they increase much more largely for segment K66-G72 and even exceed the values observed for nDsbD_{free}. Increased $J(\omega_N)$ values are observed at the nDsbD_{cx} extremities, in the β 6- β 7 and the β 8- β 9 loop. Regarding NterPilB_{cx}, a small increase of $\square J_{eff}(0)$ values is observed in α 5 helix and for H101 in the FLHE loop. Nevertheless, the latter case is more likely explained, as in the free protein, by a protonation/deprotonation exchange at the H101 side-chain, rather than by conformational exchange (Quintern et al., 2008a). Besides, the L74-K79 segment exhibits slightly lowered $J(\omega_N)$ values compensated for by higher $\square J_{eff}(0)$, indicating dynamic changes both at slow and fast time-scales.

Model-Free Analysis

The global overall tumbling of the complex was characterized from the analysis of the relaxation parameters by means of the Tensor2 software (Dosset et al., 2000) based on Lipari-Szabo approach (Lipari and Szabo, 1982a and 1982b). This was performed using the model of the complex obtained by docking and the R_2/R_1 ratios of the residues involved in secondary structures. An anisotropic rotational diffusion tensor was obtained from the nDsbD_{cx} and NterPilB_{cx} relaxation data. The principal components are $D_x = 0.85 \pm 0.02 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$, $D_y = 0.94 \pm 0.02 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$, and $D_z = 1.22 \pm 0.02 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ which give a global correlation time of 16.6 ns. This latter value is much higher than those observed for the free proteins, as one should expect from the formation of the complex. The principal components of the inertia tensor of the complex are in the ratios 1:0.88:0.43. The D -tensor large axial anisotropy ($2D_z/(D_x+D_y) = 1.36$) and slight rhombicity $D_x/D_y = 0.90$ are in agreement with those of the inertia tensor, and the direction of the principal axes are fairly close in the two tensors (angle deviations of 22°, 21° and 6° respectively for the x-, y- and z-axes).

The results for the internal mobility are represented in Figure 5. The mean order parameters S^2 are respectively 0.82 ± 0.17 and 0.89 ± 0.06 for nDsbD_{cx} and NterPilB_{cx}. These values are very close to the ones reported for the free proteins (0.81 ± 0.14 nDsbD_{free} and 0.92 ± 0.07 NterPilB_{free}). This indicates that the proteins globally remain equally structured after complex formation.

In nDsbD_{free}, three main regions show particularly weak S^2 values: the N- and C-terminal extremities and the region A90-E93. In the bound form, these regions are flexible too, although the degree of flexibility is somewhat reduced at the N-terminus (see Figure 5A and 5C). Besides, two additional segments exhibit lower order parameters, G63-H79 and C109-V113, *i.e.* around the cap-loop and the catalytic cysteine. This is associated to an internal correlation time around 1 ns in the V108-P112 region and in an extended segment around the cap-loop, stretching out along the extremities of the neighboring the β 6 and β 7 sheets, while most residues displayed much shorter internal correlation time in the free form (< 40 ps, except for R73). A few other isolated residues show τ_i or R_{ex} differences compared to the free form.

In NterPilB_{cx}, a slight decrease of S^2 and the presence of R_{ex} terms can be observed in the α 1 and α 5 helices (see Figure 5B and 5C). The order parameters remain high in the ₉₉FLHE₁₀₂ loop (above 0.88) and decrease slightly only in the next residues K103 and K104.

DISCUSSION

To date, three structures of complexes involving the N-terminal domain of DsbD from *E. coli* (*E. coli* nDsbD_{cx}) with cDsbD, DsbC or Ccmg/DsbE, are available (PDB access numbers: 1vrs, 1zjd and 1z5y). All these structures have been determined using X-ray diffraction radiocrystallography and their resolution factors lie between 1.94 and 2.85 Å. In the present study, we have obtained a robust model using a NMR driven docking approach for the structure of the mixed disulfide complex between the NterPilB and nDsbD from *N. meningitidis*. This latter complex shares structural homologies with the former three X-ray complexes but possesses its own specificities.

Amino acid sequences and three dimensional structures for the Trx-like partner have been analyzed carefully in order to reveal the determining structural factors responsible for the complex formation with nDsbD. When excluding the interactions from the second Trx-like subunit of DsbC in the nDsbD-SS-DsbC complex, the same segments of the Trx-like partner have been identified involved in the interaction in all complexes, namely the segments corresponding to the α 4- β 4 and β 5- α 5 loops and to the α 1 helix of NterPilB_{cx} containing the CXXC motif (Figure 6). In nDsbD-SS-NterPilB, the additional FLHE loop of NterPilB_{cx} forms a secondary interface increasing the main buried surface area mean value observed in X-ray structures from 1350 Å² to 1475 Å².

The FLHE Loop of NterPilB from *N. meningitidis*

The FLHE loop was postulated to play a discriminating structural role in Msr recognition (Ranaivoson et al., 2006). Indeed, like *E. coli* Trx1, the reduced form of NterPilB (NterPilB_{red}) can reduce the oxidized form of the Msr domains of *N. meningitidis* PilB. But, unlike *E. coli* Trx1, NterPilB_{red} is unable to regenerate the reduced

forms of the Msrs from *E. coli* while the oxidized form of NterPilB (NterPilB_{ox}) is not reduced by *E. coli* Trx reductase (Wu et al., 2005). Characterization of the interactions within the nDsbD-SS-NterPilB complex in the present study shows that the NterPilB_{cx} L100 and H101 side-chains come close to the β 10- β 12 side of nDsbD_{cx}. NterPilB_{cx} L100 is located in a hydrophobic region ensured by nDsbD_{cx} P111 and V113 whereas the imidazole ring of NterPilB_{cx} H101 interacts with the nDsbD_{cx} D114 carboxyl group and comes close to nDsbD_{cx} T99. A structural alignment between NterPilB, DsbC, cDsbD and DsbE reveals that only DsbC possesses a little segment ₁₂₅RQG₁₂₇, that could be possibly considered as equivalent to the FLHE loop of NterPilB (Figure 6). However the side-chains of this segment do not interact at all with *E. coli* nDsbD T99 and T114 but with *E. coli* nDsbD K45 and Q101 in the nDsbD-SS-DsbC complex (Figure 4B and 4E). Therefore, it is not clear whether the FLHE loop of NterPilB is essential in the recognition of the nDsbD. This is reinforced by the fact that the structural homolog *N. meningitidis* DsbE (32% of identity and no FLHE loop), which has been recently purified and characterized by our group, is efficiently reduced by the nDsbD domain with a k_2 value in the range of that determined for the NterPilB domain (Gand et al., unpublished results). Moreover, the superimposition of the structures of nDsbD-SS-DsbE and nDsbD-SS-NterPilB reveals that the orientation of the Trx partner in both complexes does not differ (Supplemental Data S3). Therefore, it seems probable that the NterPilB FLHE loop does not really act as a determining structural recognition element in the complex formation and consequently can not be considered as a driving force element for the complex formation. This is also supported by the absence, in this loop, of large chemical shift variations, conformational or dynamic changes compared to the free protein. The fact that the *N. meningitidis* DsbE is not capable to reduce the Msr domains of PilB (Gand et al., unpublished results) whereas NterPilB efficiently does, rather argues for a discriminating structural role of the FLHE loop in the recognition of PilB Msrs.

The Cap-Loop of nDsbD from *N. meningitidis*

Compared to the three previously resolved complexes, structural homologies appear in this new nDsbD-SS-NterPilB complex structure. As also seen for the three other X-ray resolved complexes, the cap-loop of nDsbD_{cx} is opened to permit specific interactions with its Trx-like partner, here NterPilB (Figure 4A and 4D). This opening involves large conformational changes of nDsbD_{cx}

residues E69, F70 and F71. We have previously shown that nDsbD_{free} displays some particular backbone dynamics in the cap-loop region. This inner flexibility is here translated with the opening of the cap-loop in nDsbD_{cx}. The dynamics measurements of the nDsbD-SS-NterPilB complex show that its flexibility is significantly increased, as seen from the drop of NOE values and of the order parameter and from the larger increase of $J(\omega_N)$ and $\langle J(\omega_H) \rangle$ values. Moreover, it affects a wider segment, extending up to the β 7- β 8 loop, and is mainly characterized by longer internal correlation time around 1 ns. These dynamic changes are probably required to allow the cap-loop to open sufficiently in order to permit formation of an efficient catalytic nDsbD-SS-NterPilB complex. The position of the cap-loop residues is quite similar to what is observed in other complexes and is stabilized by means of a hydrogen bond between the nDsbD_{cx} E69 carboxylate and the NterPilB_{cx} S72 hydroxyl (Figure 4A). As observed for the nDsbD-SS-DsbE and nDsbD-SS-cDsbD complexes, the aromatic ring of nDsbD_{cx} F70 is parallel to the axis of the α 1 helix of the Trx-like partner, in nDsbD-SS-NterPilB. In nDsbD-SS-DsbC complex, this ring is rather perpendicular to the axis of this conserved α 1 helix. Interestingly, the aromatic of nDsbD_{cx} F71 points toward the backbone of NterPilB_{cx} and not toward the cavity of the partial β -barrel as observed in nDsbD_{free} (See Supplemental Data S4). Whereas the equivalent aromatic ring of Y71 is already quite solvent exposed in the free form of *E. coli* nDsbD and consequently close to the backbone of its Trx-like partner in the *E. coli* nDsbD_{cx}, it seems necessary that a swing of nDsbD_{cx} F71 occurs for the complex with NterPilB to be formed.

For the complex to be made, the opening of the cap should occur prior to the disulfide bond formation to avoid steric occlusions. In all complexed structures, the cap-loop of nDsbD_{cx} covers the α helix including the CXXC motif of the Trx-like partner (Figure 4A and 4D). Analysis of the amino-acid sequences of the α helix reveals no consensus sequence (Figure 6). Moreover, the Trx-like partners do not share any common electrostatic potential features in this region. This suggests that the first step of recognition does not involve the cap-loop. Thus, the cap-loop would not have a discriminating role in the interaction with the Trx-like but essentially a protecting role in the free form of nDsbD. In that context, the driving force which leads to the opening of the cap loop remains to be identified.

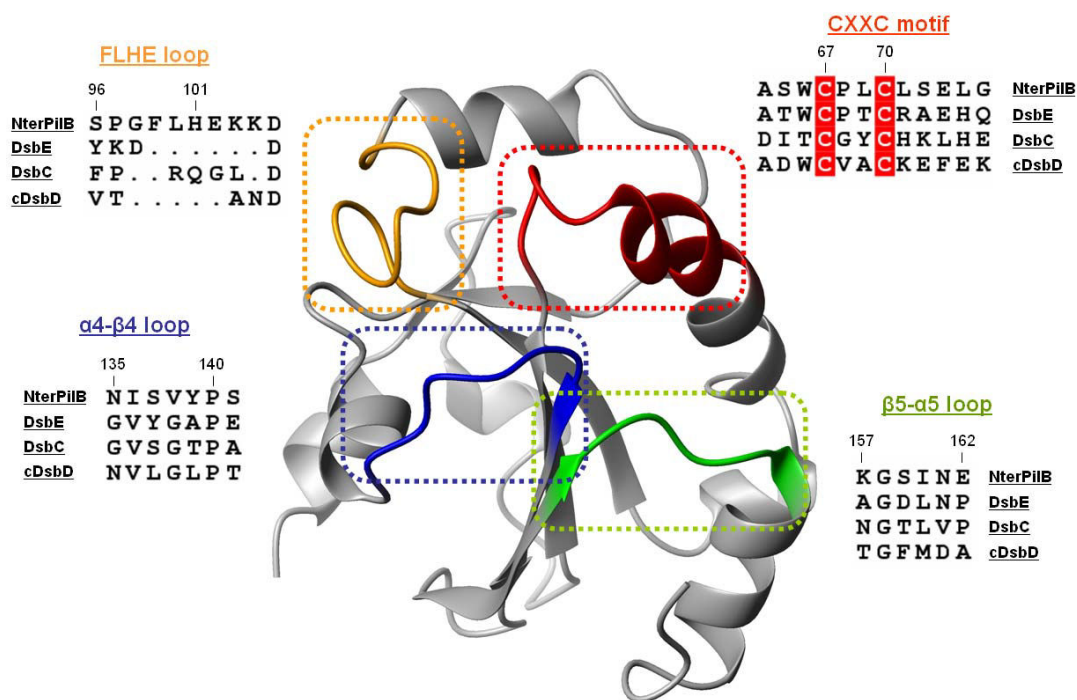


Figure 6. Interaction areas on the Trx-like partner of nDsbD. The segments participating to the interaction with nDsbD have been highlighted on the structure of NterPilB using red for the CXXC region, green for the $\beta 5$ - $\alpha 5$ loop region, blue for the $\alpha 4$ - $\beta 4$ loop region and orange for the FLHE loop region. The corresponding amino acid sequence of each structurally characterized Trx-like partners of nDsbD has been reported. The sequence numbering and the segment denomination are the ones of NterPilB.

The SS Bond Region

The third interaction area is located near the SS bond and comprises, on one hand, the CXXC motif, the N135-S141 ($\alpha 4$ - $\beta 4$) and K157-E162 ($\beta 5$ - $\alpha 5$) loops of NterPilB_{cx} and, on the other hand, the segments P13-E15 and G107-P111 of nDsbD_{cx} (Figure 4C and 4F). The segments around the active site exhibit the largest chemical shift and dynamic variations upon binding. They become flexible in both proteins and slow conformational exchange is found in the NterPilB_{cx} $\alpha 1$ helix. The $\alpha 4$ - $\beta 4$ loop experiences smaller but significant changes: it retains some slow motion exchange terms but displays additional fast time-scale flexibility. The $\beta 5$ - $\alpha 5$ loop of NterPilB_{cx} remains flexible, as in NterPilB_{free}.

However, some perturbations seem to be propagated to the $\alpha 1$ helix and to a lower extent to the $\alpha 5$ helix. An increase of R_2 values together with a slight decrease of R_1 is observed. This leads to slightly higher $J_{eff}(0)$ values, lower S^2 order parameter and the presence of R_{ex} terms and suggests a loss of rigidity and the presence of slow conformational exchange in the complex. Nevertheless, these mobility parameters should be interpreted prudently, as the Lipari-Szabo analysis of the R_1 and R_2 values is depending on the orientation of the NH vectors relative to the diffusion tensor. The latter are therefore sensitive to the variation of this tensor between the complexed and the free states and more importantly to the orientation of these helices in the complex. A slight reorientation of these helices could bias the mobility parameters, especially for the $\alpha 5$ helix for which very little changes are observed on the relaxation parameters.

The variation of dynamics parameters and the increase of $J_{eff}(0)$ are clearer in $\alpha 1$ helix, and likely reflect actual increased mobility, although a slight reorientation of the helix upon complex formation can not be excluded either. Indeed, $\alpha 1$ helix exhibits close interactions with nDsbD_{cx} cap-loop and might be also slightly displaced in the complex.

As far as the structural features are concerned, the SS-bond region is stabilized by at least one intermolecular hydrogen bond between the nDsbD_{cx} C109 H^N atom and the backbone carbonyl group of NterPilB_{cx} Y139. This hydrogen bond is systematically found in the other X-ray complexes. Moreover, in nDsbD-SS-DsbE complex, Y141, a conserved residue in DsbEs, was described as interacting with the S9 and F11 residues of the *E. coli* nDsbD_{cx} N-terminal tail and thus, stabilizes this region. In nDsbD-SS-NterPilB, this Y141 residue is replaced by S137 close to nDsbD_{cx} E15, which provides a favorable electrostatic environment. Furthermore, the presence in NterPilB of V108, instead of a glycine in DsbE, DsbC and cDsbD, should provide more specific and favorable interactions in a hydrophobic pocket formed by nDsbD_{cx} P14, V108 and P111. Considering all the ten structures of nDsbD-SS-NterPilB, this hydrophobic pocket seems more important for the stabilization of the SS-bond region in nDsbD-SS-NterPilB than the interaction between NterPilB_{cx} S137 and nDsbD_{cx} E15.

It is also interesting to note that flexibility is induced in the segment C109-V113 of nDsbD upon complex formation. That means that structural adjustment seems to be possible in this region which is

found opposite to the $\alpha 4$ - $\beta 4$ and $\beta 5$ - $\alpha 5$ loops of NterPilB_{cx}. An illustration of this adaptability is found in nDsbD-SS-NterPilB. Whereas NterPilB V138 is replaced by Gly in all other Trx-like partners of *E. coli* nDsbD_{cx} (Figure 6), we can notice that in the *N. meningitidis* nDsbD_{cx}, V108 is found opposite to the NterPilB_{cx} V138 (Figure 4C and 4F). We have seen that *N. meningitidis* nDsbD_{cx} forms a hydrophobic pocket able to shelter NterPilB_{cx} Val138 (Figure 4C) and we propose that the dynamics of nDsbD_{cx} helps adapting this pocket.

The Recognition Factors of the Trx-Like Partners of nDsbD

In contrast to the $\alpha 1$ helix, the $\alpha 4$ - $\beta 4$ and $\beta 5$ - $\alpha 5$ loops of NterPilB display more identities in their sequence with the other Trx-like partners. The residue P140 is conserved in all Trx-like partners as well as G158 and they could act as recognition signal. Indeed, the *cis* amide form of P140 assumes a favorable orientation of the carbonyl group of the previous residue 139 in order to form a conserved hydrogen bond with the backbone H^N proton of nDsbD_{cx} C109. The Trx-like partner G158 increases the flexibility of the peptidic chain in the $\beta 5$ - $\alpha 5$ loop and makes possible an opposite orientation of this loop with regard to the $\alpha 4$ - $\beta 4$ loop. We propose that these two loops, together with the N-terminal part of the $\alpha 1$ helix including the CXXC motif, constitutes a particular structural motif insuring the first interaction areas in the approach of the nDsbD partner. Regardless of the sequence, this is the shared structural layout of these three segments which could induce the mutual recognition. Based on the structure of all the complexes involving nDsbD, it prompts us to propose such a conserved Trx-like motif as an initial guiding element in the recognition of both partners.

Studies of protein-ligand interaction often show that the recognition sites become more rigid on binding (see Boehr et al., 2006 for a review). However, similar flexibility and a few cases of increased flexibility are also reported, associated or not with μ s-ms time scale R_{ex} variations. Very few dynamics data are available for protein-protein interactions (see references in Bouguet-Bonnet and Buck, 2008), and none for disulfide bond exchange protein-protein systems, to our knowledge. Our study of a mixed-disulfide covalent complex provides then a new dynamics insight into an intermediate state occurring during the disulfide bond exchange mechanism. We have found in the nDsbD-SS-NterPilB complex that increased mobility is observed in the main regions involved in interaction and is balanced by decreased flexibility spread out throughout the rest of the proteins, which gives a negligible net difference of order parameter in both proteins globally. The regions around the active sites, nDsbD_{cx} cap-loop, NterPilB_{cx} $\alpha 1$ helix indeed gain mobility in the complex, as suggested by lowered order parameter and additional exchange terms eventually. This probably confers possibilities of structural adjustment in all the nDsbD_{cx} segments neighboring the intermolecular disulfide bond. A transfer of mobility might be induced from the cap-loop of nDsbD_{cx} to Nter-PilB $\alpha 1$ helix, quite

similarly to what observed from transcriptional activator factor N κ B to some ankyrin repeat domains (Sue *et al.*, 2008). Moreover, the mobility in the complex, and notably the one appearing on NterPilB_{cx} compared to its globally rigid free forms (*i.e.* the reduced and oxidized states), may contribute to favor the dissociation of the NterPilB_{red} from its complex with nDsbD. Indeed, some regions of the NterPilB_{red}, in particular the $\alpha 1$ helix has to retrieve its rigid properties and thus could be a driving force for the complex dissociation. Whether this can be extended to the three other identified Trx-like partners of nDsbD remains to be determined.

CONCLUSION

Taking into account all the structural and dynamics data both on free and complex states of each partner of nDsbD-SS-NterPilB, a route leading to formation of the transient covalent complexes between nDsbD and its different Trx-like partners is proposed. As shown in the present study, nDsbD_{free} displays in the $\beta 6$ - $\beta 7$ region a particular dynamics which is probably a key factor for the opening of its cap-loop under complex formation. The opened form of nDsbD could specifically recognize the $\alpha 4$ - $\beta 4$ / $\alpha 5$ - $\beta 5$ / $\alpha 1$ helix structural motif of the Trx-like partner. This specific recognition is likely facilitated by the dynamics of the cap-loop and of the $\beta 11$ region, which permits the nDsbD to adapt its conformation to the $\alpha 1$ helix and to the $\alpha 4$ - $\beta 4$ / $\alpha 5$ - $\beta 5$ loops of its Trx-like partner. This conformational adaptation should be a prerequisite for forming a competent catalytic complex that leads, then, to formation of the interdisulfide bond between C109 of nDsbD and the catalytic Cys of the Trx-like partner. Several specific stabilizing interactions including the invariant intermolecular hydrogen bond between nDsbD_{cx} C109 H^N atom and the carbonyl group of the residue 139 of the Trx-like partner, should facilitate formation of the interdisulfide bond in the different transient complexes. A dynamics transfer, that could then take place between nDsbD and the Trx-like partner, in particular its $\alpha 1$ helix, would be a key factor for the next step which leads to the dissociation of the two partners.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Sample Preparation of the Free Proteins

Plasmids. Plasmid pETnDsbD_{C103S} encodes the variant C103S of the *N. meningitidis* nDsbD (nDsbD_{C103S}) (Quinternet et al., 2008). The C70S variant of the N-terminal domain of the PilB protein was constructed from the pETNterPilB plasmid (Wu et al., 2005) using a site-directed mutagenesis approach to substitute the C70 by a Ser (NterPilB_{C70S}).

Production and purification. ¹⁵N and ¹⁵N/¹³C nDsbD_{C103S} and NterPilB_{C70S} proteins were produced and purified as described previously (Quinternet et al., 2008a and 2008b). For the production of the ²H/¹³C/¹⁵N nDsbD_{C103S} and NterPilB_{C70S} proteins, *E. coli* transformed cells were cultivated in a minimal medium containing deuterium oxide (99.85 %D; Euriso-top[®]) at 37°C for 36 h after IPTG induction at DO₆₀₀ ~ 0.6.

Kinetics of NterPilB Reduction by nDsbD and of Interdisulfide Formation Between Oxidized NterPilB and C103S or C109S nDsbD

Kinetic measurements were determined on a stopped-flow apparatus by following selectively the enhancement of the fluorescence emission intensity of the Trp residues of NterPilB, associated with reduction of its C67/C70 disulfide bond or formation of an interdisulfide bond, as previously described (Wu et al., 2005). Briefly, the excitation wavelength was set at 293 nm, and the emitted light was collected above 320 nm, using a cut-off filter. One syringe contained the oxidized NterPilB in buffer A (10 μ M final concentration after mixing), and the other one contained reduced wild type, C103S or C109S nDsbD at various concentrations in buffer A, *i.e.* up to 500 μ M final concentration after mixing. An average of six runs was recorded for each concentration of nDsbD. Rate constants, k_{obs} , were obtained by fitting fluorescence traces with the mono exponential equation $y = a e^{-k_{\text{obs}} t} + c$, in which c represents the endpoint, a the amplitude of the fluorescence increase (< 0) and k_{obs} the rate constant. The slope (k_2) of the rate constant (k_{obs}) plotted against the nDsbD concentration was obtained by linear fitting.

Isolation of nDsbD-SS-NterPilB Complex

NterPilB_{C70S} was activated under its TNB disulfide form, referred to as NterPilB_{C70S}-TNB. Activation was carried out by mixing 100 μ M mutated NterPilB with 500 μ M DTNB in TE buffer (Tris-HCl 50 mM, EDTA 2mM, pH 8.0). After 30 min of incubation at room temperature, activated NterPilB_{C70S}-TNB was passed through an Econo-Pac 10 DG desalting column (Bio-Rad) equilibrated with TE buffer, in order to remove TNB⁻ and excess DTNB. The nDsbD-SS-NterPilB complex formed *via* the DTNB activation process was obtained by mixing NterPilB_{C70S}-TNB with nDsbD_{C103S} in equimolar quantities in TE buffer, and was applied to a gel filtration column Superdex 75 26/60, equilibrated with TE pH 8.0. Fractions containing pure nDsbD-SS-NterPilB complex were dialyzed against 20 mM phosphate buffer, pH 7.0. The final concentration of each NMR sample was about 0.5-1 mM (90% H₂O, 10% D₂O) in 20 mM phosphate buffer at pH 7.0. The sample purity and molecular mass were checked by SDS-PAGE and electrospray mass spectrometry, respectively.

Four samples were prepared as described above. [²H/¹³C/¹⁵N]-nDsbD-SS-NterPilB-[no-labeled] and [no-labeled]-nDsbD-SS-NterPilB-[²H/¹³C/¹⁵N] were used for backbone resonance assignments. [¹³C/¹⁵N]-nDsbD-SS-NterPilB-[no-labeled] and [no-labeled]-nDsbD-SS-NterPilB-[¹³C/¹⁵N] were used for relaxation studies as well as backbone and side-chain resonance assignments.

NMR Spectroscopy

For non-deuterated and deuterated mixed-disulfide complex samples, classical three-dimensional heteronuclear NMR experiments were acquired at 298 K on Bruker Avance DRX 600 MHz and Avance 800 MHz spectrometers equipped with a TCI cryoprobe. The NMR

experiments, as well as the processing and analysis steps permitting to access to backbone and side-chain resonance frequencies of each partner of the nDsbD-SS-NterPilB complex, are described in Supplemental Data S5. To visualize intermolecular NOEs, F_1 -[¹⁵N,¹³C]-filtered NOESY experiments were run on both complexes samples using the standard Bruker pulse sequences with a mixing time of 120 ms (Zwahlen et al., 1997). These experiments permit to differentiate correlations between ¹²C and ¹⁴N bonded protons and ¹³C or ¹⁵N bonded protons.

As described in Supplemental Data S5, ¹⁵N relaxation experiments and backbone dynamics analysis have been performed similarly to the free proteins studies (Quinternet et al., 2008a and 2008b), except that shorter T_2 delay values and more transients/increments were used in the relaxation experiments.

Docking using Haddock2.0

Docking of the NterPilB-SS-nDsbD mixed-disulfide complex was performed using HADDOCK2.0 (Dominguez et al., 2003; de Vries et al., 2007) coupled to CNS1.2 (Brunger, 2007). The starting structures were the best structure extracted from the ensembles of NMR solution structures obtained previously (i) for the reduced form of NterPilB_{free} (PDB access number: 2jzs) and (ii) for nDsbD_{free} (PDB access number: 2k0r). The most representative NMR structure of NterPilB_{free} in its reduced form could be used as a representative form of the C70S NterPilB since no dramatic amide chemical shift perturbation appears with the mutation on the backbone amide groups (see Supplemental Data S6). In order to give more liberty to the cap-loop of nDsbD_{free}, a first HADDOCK run, defining this loop as a semi-flexible and flexible segments, was performed only on the best NMR structure of nDsbD_{free} to collect a water-refine ensemble of four structures. This ensemble was then used as input structures for the docking.

Accessibility to the solvent, checked with NACCESS (Hubbard et al., 1997) and MOLMOL (Koradi et al., 1996), and chemical shift perturbation Data were used to obtain a set of ambiguous restraints (AIR) in regard to the recommendations notified in the HADDOCK2.0 manual. The upper limit for AIR has been fixed up to 2.0 Å. Moreover, this has permitted to define a list of active and passive residues and the length of semi-flexible and flexible segments. Ambiguous and unambiguous restraints, the latter being derived from filtered NOESY experiments, were taken into account from the first rigid-body step till the water-refine step, this corresponding to the end of the docking process. The random exclusion of AIR restraint has been turned off. The restraint induced by the disulfide bond has been introduced using the "DISU" patch of CNS1.2. A total of 1000 structures were calculated in the it0 rigid-body step and the 300 structures with the lowest energy have been selected for the it1 and it1-water refinement steps. Results were analyzed using the clustering approach of HADDOCK2.0. A cut-off value of 1.2 Å has been defined to select the most well-resolved ensembles of

structures for the mixed-disulfide complex nDsbD-SS-NterPilB

SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental data are available online at <http://www.structure.org>.

ACKNOWLEDGEMENTS

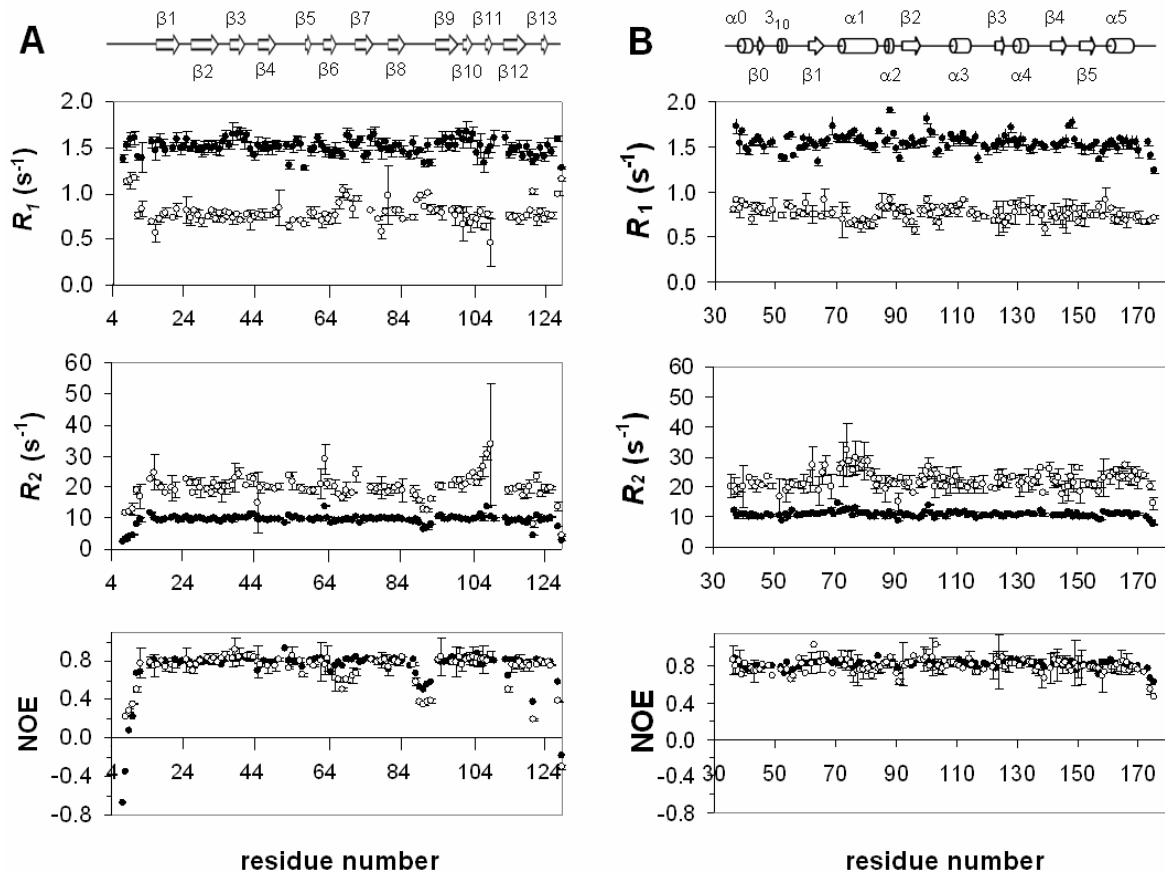
This research was supported by the CNRS, the Universities of Nancy I and INPL and the IFR 111 Bioingénierie. M. Q. and L. S.-R. gratefully thank the French Ministry of Research, the CNRS, and the Région Lorraine for financial support. The accesses to the Bruker DRX 600 (NMR facilities of the Service Commun de Biophysicochimie des Interactions, Nancy I) and to the Bruker DRX 800 (Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Gif/Yvette) were deeply appreciated. We thank Chrystel Beaufils for technical support on the Bruker DRX 600, Dr. G. Bechade and Dr. S. Sanglier-Cianferani for mass spectrometry analyses.

REFERENCES

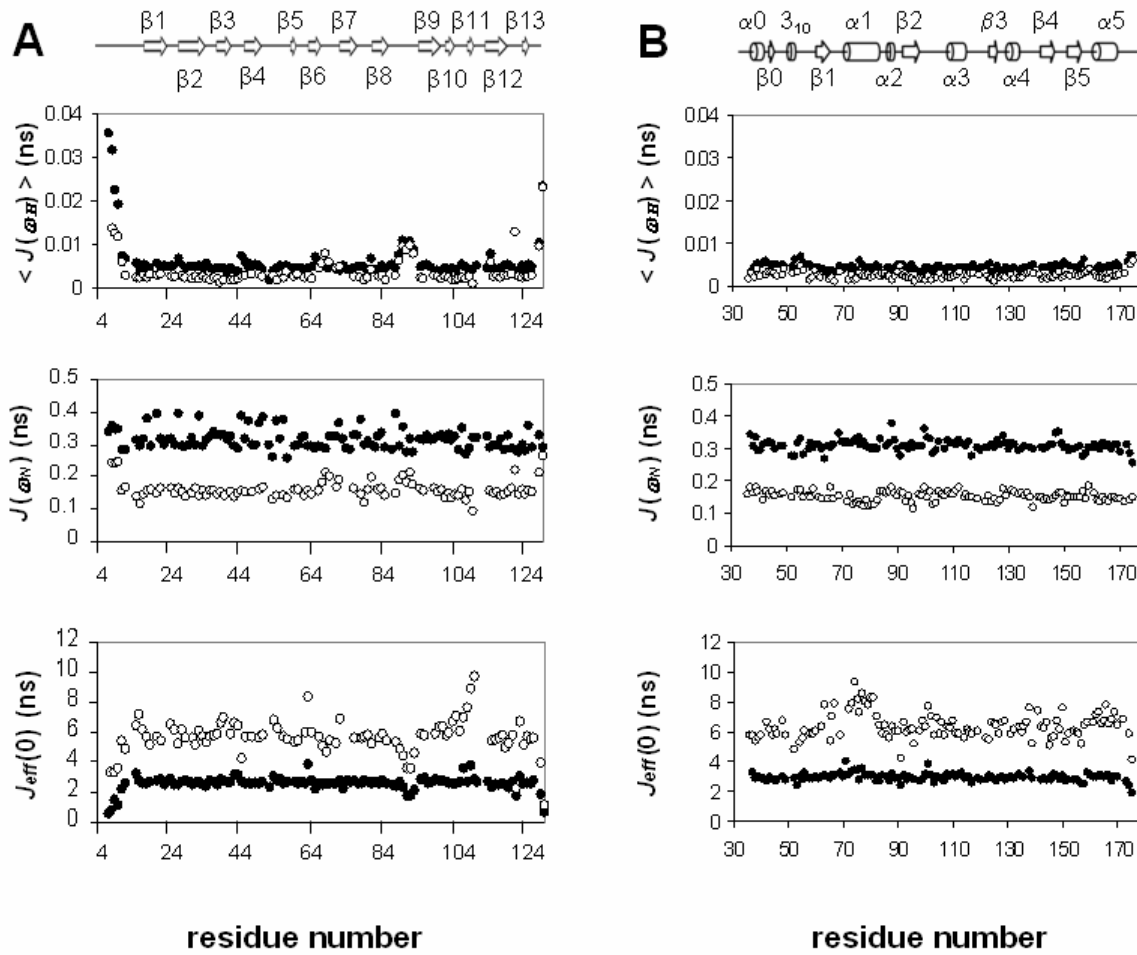
- Beaufils, C., Neiers, F., Coudeville, N., Boschi-Muller, S., Averlant-Petit, M. C., Branlant, G., and Cung, M. T. (2006) ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignment of the N-terminal domain of PilB from *Neisseria meningitidis*. *J. Biomol. NMR* 36, 6.
- Boehr, D. D., Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2006) An NMR perspective on enzyme dynamics. *Chem. Rev.* 106, 3055-3079.
- Bouguet-Bonnet, S., and Buck, M. (2008) Compensatory and long-range changes in picosecond-nanosecond main-chain dynamics upon complex formation: ^{15}N relaxation analysis of the free and bound states of the ubiquitin-like domain of human plexin-B1 and the small GTPase Rac1. *J. Mol. Biol.* 377, 1474-1487.
- Brot, N., Collet, J. F., Johnson, L. C., Jönsson, T. J., Weissbach, H., and Lowther, W. T. (2006) The thioredoxin domain of *Neisseria gonorrhoeae* PilB can use electrons from DsbD to reduce downstream methionine sulfoxide reductases. *J. Biol. Chem.* 281, 32668-32675.
- Brunger, A. T. (2007) Version 1.2 of the Crystallography and NMR System. *Nature Protocols* 2, 2728-2733.
- Chung, J., Chen, T., and Missiakas, D. (2000) Transfer of electrons across the cytoplasmic membrane by DsbD, a membrane protein involved in thiol-disulfide exchange and protein folding in the bacterial periplasm. *Mol. Microbiol.* 35, 1099-1109.
- De Vries, S. J., van Dijk, A. D. J., Krzeminski, M., van Dijk, M., Thureau, A., Hsu, V., Wassenaar, T., and Bonvin, A. M. J. J. (2007) HADDOCK versus HADDOCK: New features and performance of HADDOCK2.0 on the CAPRI targets. *Proteins: Struct. Funct. and Bioinformatic* 69, 726-733.
- Dominguez, C., Boelens, R., and Bonvin, A. M. J. J. (2003) HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical and/or biophysical information. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 1731-1737.
- Dosset, P., Hus, J. C., Blackledge, M., and Marion, D. (2000) Efficient analysis of macromolecular rotational diffusion from heteronuclear relaxation data. *J. Biomol. NMR* 16, 23-28.
- Goulding, C. W., Sawaya, M. R., Parseghian, A., Lim, V., Eisenberg, D., and Missiakas, D. (2002) Thiol-disulfide exchange in an immunoglobulin-like fold: structure of the N-terminal domain of DsbD. *Biochemistry* 41, 6920-6927.
- Haebel, P. W., Goldstone, D., Katzen, F., Beckwith, J., and Metcalf, P. (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, 4774-4784.
- Hubbard, T. J. P., Murzin, A. G., Brenner, S. E., and Chothia, C. (1997) A structural classification of proteins database. *Nucleic Acids Res.* 25, 236-239.
- Katzen, F., and Beckwith, J. (2000) Transmembrane electron transfer by the membrane protein DsbD occurs via a disulfide bond cascade. *Cell* 103, 769-779.
- Koradi, R., Billeter, M., and Wüthrich, K. (1996) MOLMOL: a program for display and analysis of macromolecular structures. *J. Mol. Graph.* 14, 51-55.
- Lipari, G., and Szabo, A. (1982a) Model-free approach to the interpretation on nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 4546-4559.
- Lipari, G., and Szabo, A. (1982b). Model-free approach to the interpretation on nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results. *J. Am. Chem. Soc.* 104, 4560-4570.
- Porat, A., Cho, S. H., and Beckwith, J. (2004) The unusual transmembrane electron transporter DsbD and its homologues: a bacterial family of disulfide reductases. *J. Res. Microbiol.* 155, 617-622.
- Quinternet, M., Beaufils, C., Neiers, F., Tsan, P., Boschi-Muller, S., Averlant-Petit, M. C., Branlant, G., and Cung, M. T. (2007) ^1H , ^{13}C and ^{15}N backbone resonance assignment of the oxidized form (Cys₆₇-Cys₇₀) of the N-terminal domain of PILB from *Neisseria meningitidis*. *Biomol. NMR Assign.* 1, 143-145.
- Quinternet, M., Tsan, P., Neiers, F., Beaufils, C., Boschi-Muller, S., Averlant-Petit, M. C., Branlant, G., and Cung, M. T. (2008a) Solution structure and backbone dynamics of the reduced and oxidized forms of the N-terminal domain of PilB from *Neisseria meningitidis*. *Biochemistry* 47, 8577-8589.
- Quinternet, M., Tsan, P., Selme, L., Beaufils, C., Jacob, C., Boschi-Muller, S., Averlant-Petit, M. C., Branlant, G., and Cung, M. T. (2008b) Solution structure and backbone dynamics of the C103S mutant of the N-terminal domain of DsbD from *Neisseria meningitidis*. *Biochemistry*; doi: 10.1021/bi801343c.
- Quinternet, M., Selme, L., Tsan, P., Beaufils, C., Jacob, C., Boschi-Muller, S., Averlant-Petit, M. C., Branlant, G., and Cung, M. T. (2008c) ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignment of the C103S mutant of the N-terminal domain of DsbD from *Neisseria meningitidis*. *Biomol. NMR Assign.* 2, 85-87.
- Ranaivoson, F. M., Kauffmann, B., Neiers, F., Wu, J., Boschi-Muller, S., Panjekar, S., Aubry, A., Branlant, G., and Favier, F. (2006) The X-ray structure of the N-terminal domain of PILB from *Neisseria meningitidis* reveals a thioredoxin-fold. *J. Mol. Biol.* 358, 443-454.
- Rozhkova, A., Stirnimann, C. U., Frei, P., Gauschopf, U., Brunisholz, R., Gruetter, M. G., Capitani, G., and Glockshuber, R. (2004) Structural basis and kinetics of inter- and intramolecular disulfide exchange in the redox catalyst DsbD. *EMBO J.* 23, 1709-1719.
- Stewart, E. J., Katzen, F., and Beckwith, J. (1999) Six conserved cysteines of the membrane protein DsbD are required for the transfer of electrons from the cytoplasm to the periplasm of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 18, 5963-5971.
- Stirnimann, C. U., Grütter, M. G., Glockshuber, R., and Capitani, G. (2006) nDsbD: a redox interaction hub in the *Escherichia coli* periplasm. *Cell Mol. Life Sci.* 63, 1642-1648.
- Stirnimann, C. U., Rozhkova, A., Gauschopf, U., Gruetter, M. G., Glockshuber, R., and Capitani, G. (2005) Structural Basis and Kinetics of DsbD-Dependent Cytochrome c Maturation. *Structure* 13, 985-993.
- Sue, S. C., Cervantes, C., Komives, E. A., and Dyson, H. J. (2008) Transfer of flexibility between ankyrin repeats in IkappaB* upon formation of the NF-kappaB complex. *J. Mol. Biol.* 380, 917-931.
- Williamson, R. A., Carr, M. D., Frenkiel, T. A., Feeney, J., and Freedman, R. B. (1997) Mapping the binding site for matrix metalloproteinase on the N-terminal domain of the tissue inhibitor of metalloproteinases-2 by NMR chemical shift perturbation. *Biochemistry* 36, 13882-13889.
- Wu, J., Neiers, F., Boschi-Muller, S., and Branlant, G. (2005) The N-terminal domain of PILB from *Neisseria meningitidis* is a disulfide reductase that can recycle methionine sulfoxide reductases. *J. Biol. Chem.* 280, 12344-12350.
- Zwahlen, C., Legault, P., Vincent, S., Greenblatt, J., Konrat, R., and Kay, L.E. (1997) Methods for Measurement of Intermolecular NOEs by Multi-Nuclear NMR Spectroscopy: Application to an N-peptide:boxB RNA Complex. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 6711-6721.

Supplemental data

Supplemental Data S1. ^{15}N longitudinal relaxation rates R_1 , ^{15}N transverse relaxation rates R_2 and steady-state $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N heteronuclear NOE values of (A) nDsbD_{cx} (○) compared to those of nDsbD_{free} (●) (B) and of NterPilB_{cx} (○) compared to those of NterPilB_{free} in its oxidized form (●) are plotted *versus* the amino acid sequence. Experiments were recorded on a Bruker DRX 600 MHz at pH 7.00, 25°C. The secondary structure elements extracted from the mean structure are shown at the top.

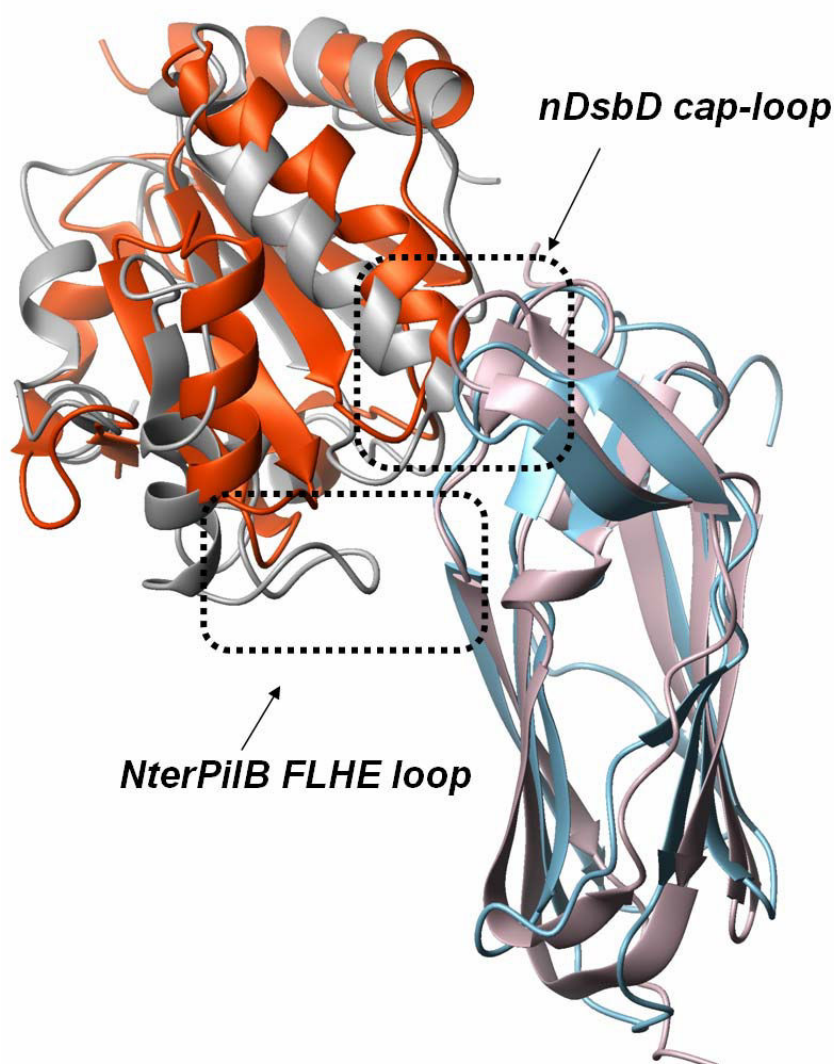


Supplemental Data S2. Reduced spectral density function at $\langle J(\omega_H) \rangle$, $J(\omega_N)$ and $J_{eff}(0)$ for (A) nDsbD_{cx} (○) compared to those of nDsbD_{free} (●) (B) and of NterPilB_{cx} (○) compared to those of NterPilB_{free} in its oxidized form (●).



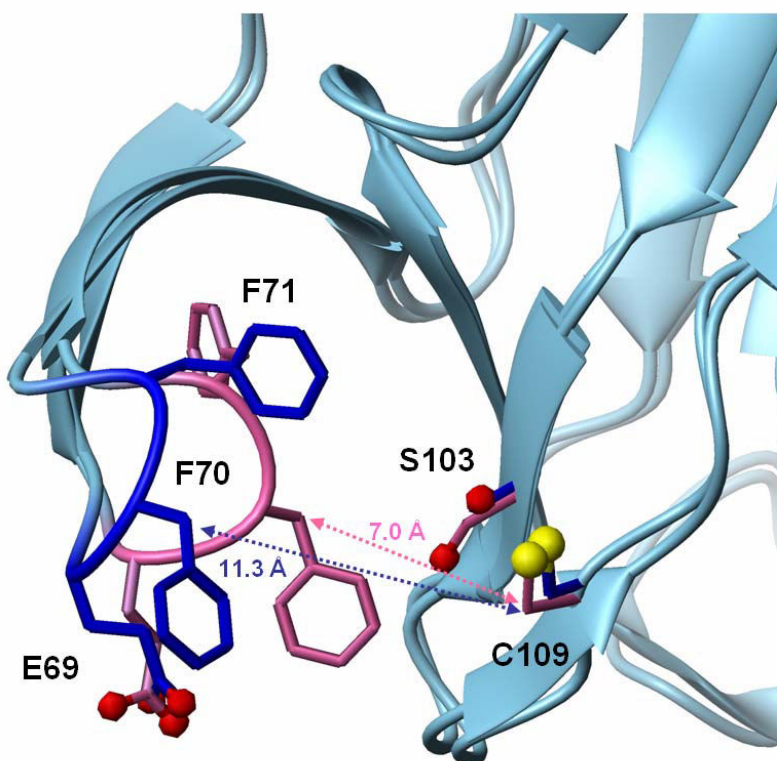
Supplemental Data S3. Superimposition of the X-ray Structure of nDsbD-SS-DsbE with the NMR Modeled Structure of nDsbD-SS-NterPilB.

The superimposition has been done considering C^α atoms in the nDsbD partner of both complexes. The structures are represented using blue ribbon for the nDsbD partner of nDsbD-SS-NterPilB, a grey ribbon for the NterPilB_{CX} subunit of nDsbD-SS-NterPilB, a pink ribbon for the nDsbD partner of nDsbD-SS-DsbE and an orange ribbon for the DsbE partner of DsbD-SS-DsbE. The cap-loop of nDsbD and the FLHE loop of NterPilB are highlighted in dotted black boxes. The figure has been generated by MOLMOL.



Supplemental Data S4. Superimposition of *N. meningitidis* nDsbD_{free} and nDsbD_{cx}.

The heavy atoms of the side-chains for residues E69, F70 and F71 are figured using blue (nDsbD_{cx}) and violet (nDsbD_{free}) sticks. Oxygen and sulfur atoms are respectively represented with red and yellow balls. The C^β...C^β distance between F70 and C109 is indicated with a blue (nDsbD_{cx}) or violet (nDsbD_{free}) dotted line and reported on the drawing.



Supplemental Data S5. NMR Spectroscopy for Assignment and ^{15}N Relaxation of the Mixed Disulfide Complex Between nDsbD and NterPilB from *Neisseria Meningitidis*.

All spectra were acquired at 298 K on Bruker Avance DRX 600 MHz and Avance 800 MHz spectrometers, both equipped with a TCI cryoprobe. Spectra were processed using the program XWINNMR (Bruker) and analyzed with the program CARA (Keller, 2004). Trimethylsilylpropionic- 2,2,3,3-*d*4 acid sodium salt (TSP-*d*4, Euriso-top) was used as an internal reference for ^1H chemical shift whereas indirect referencing was used for ^{13}C and ^{15}N chemical shifts (Wishart *et al*,1995).

For both selectively labeled mixed-disulfide complex samples, backbone $^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{15}N , $^{13}\text{C}^{\alpha}$, $^1\text{H}^{\alpha}$, $^{13}\text{C}'$, and side-chain ^1H , ^{13}C resonances were assigned using ^1H - ^{15}N HSQC, HNCO, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, HNCACB, CBCA(CO)NH, and HNHA experiments. HCCH-TOCSY and ^1H - ^{15}N -, ^1H - ^{13}C - HSQC-NOESY spectra at two different mixing times (70 and 120 ms) were also performed for side-chain assignments.

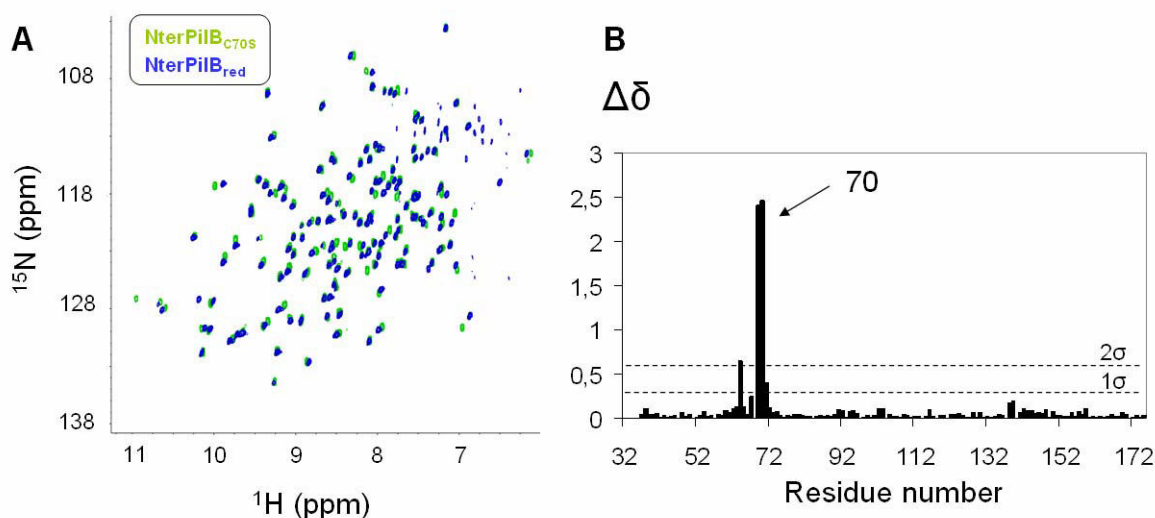
The ^{15}N longitudinal relaxation rate (R_1), ^{15}N transverse relaxation rate (R_2) and the steady-state $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N heteronuclear NOE experiments were recorded at 298K on a Bruker Avance 600 MHz spectrometer, using the usual pulse sequences (Farrow *et al*, 1994). 128 (^{15}N) and 2048 (^1H) complex points were collected for the R_1 and R_2 experiments, with 16 transients/increment and a recycle delay of 5 s. Ten inversion recovery delays of 2, 50, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000 and 1200 ms were used for R_1 measurements, whereas eight delays of 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56 and 64 ms were typically used during the CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) period of the R_2 experiments. $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE spectra were recorded in an interleaved way with and without proton saturation during relaxation delay, using 128 \times 2 (^{15}N) and 2048 (^1H) complex points and 96 transients/increment typically. The ^1H saturation was achieved by the application of 120 $^\circ$ ^1H pulses separated by 5 ms, for a period of 4 s. Spectral widths for all heteronuclear experiments were 2433 Hz (^{15}N) and 8389 Hz (^1H) with carrier frequencies at 117.6

and 4.70 ppm, respectively. Data were processed using XWINNMR (Bruker). They were zero-filled in the ^{15}N dimension and apodized with shifted square sine-bell window in both dimensions.

NMRVIEW software version 6.6.2 (Johnson *et al*, 1994) was used to measure the peak heights of the ^{15}N - ^1H cross-peaks and to determine the R_1 and R_2 values from a fit to a single-exponential decay function and also the $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N heteronuclear NOE from the ratio between the intensities of a peak in the spectra collected with and without proton saturation, respectively. All experiments were performed twice to provide an estimation of the uncertainty on R_1 , R_2 and NOE values.

R_1 , R_2 and NOE relaxation parameters were analyzed by means of reduced spectral density mapping at $J_{eff}(0)$, $J(\omega_N)$ and $\langle J(\omega_H) \rangle$ values (Farrow *et al*, 1995; Ishima *et al*, 1995a and 1995b; Lefevre *et al*, 1996), using a chemical shift anisotropy of -160 ppm for the backbone amide group (Hiyama *et al*, 1988) and a NH bond length of 1.02 Å. $J_{eff}(0)$ denotes that the exchange contribution to R_2 is not explicitly considered (Peng *et al*, 1995). $\langle J(\omega_H) \rangle$ is the average of $J(\omega_H)$, $J(\omega_H + \omega_N)$ and $J(\omega_H - \omega_N)$ which can be approximated by $J(0.87\omega_H)$ (Farrow *et al*, 1995). Tensor2 (Dosset *et al*, 2000) was used for the Lipari-Szabo analysis (Lipari and Szabo, 1982a and 1982b) of the backbone ^{15}N relaxation parameters. Only residues in secondary structure elements and outside the interaction area (as defined in text) were used for determination of the overall tumbling.

Supplemental Data S6. Chemical Shift Perturbation Between the Reduced Form and the C70S Variant of NterPilB.



¹H-¹⁵N HSQC spectra of the reduced form (blue) and the C70S variant (green) of NterPilB are superimposed (A) and the chemical shift perturbation has been calculated using the consensual value $\Delta\delta$ (B). Backbone amide group assignment of NterPilB_{C70S} was performed using ¹H-¹⁵N HSQC and ¹H-¹⁵N HSQC-NOESY spectra at two different mixing times (70 and 120 ms). The almost-complete assignments of reduced and oxidized forms of NterPilB, reported previously, were used as a starting point for the reassignment of the variant (Beaufils *et al*, 2006; Quinternet *et al*, 2007).

The C70S variant of the N-terminal domain of the PilB protein was constructed from the pETNterPilB plasmid (Wu *et al*, 2005) using a site-directed mutagenesis approach to substituted the C70 by a serine (NterPilB_{C70S}). ¹⁵N NterPilB_{C70S} protein was produced and purified as described previously (Quinternet *et al*, 2008 and Wu *et al*, 2005). The NMR sample contained 0.5 mM protein concentration (95% H₂O, 5% D₂O) in 10 mM phosphate buffer at pH 7.0.

All spectra were acquired at 298 K on Bruker Avance DRX 600 MHz spectrometer equipped with a TCI cryoprobe. Spectra were processed using the program XWINNMR (Bruker) and analyzed with the program CARA (Keller, 2004). The mutant assignment was obtained for all of its backbone amide groups except for the N-terminal residues M32, V33, P34, H35 and S137.

The ^1H - ^{15}N HSQC spectra comparison between the mutant and the reduced wild type form of NterPilB shows that the substitution Cys \rightarrow Ser does not cause any major structural modification. Even if significant changes appear in the chemical shift variation plot, they are located around the substitution, suggesting that it is the consequence of a local change of the chemical environment due to the presence of an OH group instead of a SH group.

Supplemental References

- Beaufils, C., Neiers, F., Coudevylle, N., Boschi-Muller, S., Averlant-Petit, M. C., Branlant, G., and Cung, M. T. (2006) ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignment of the N-terminal domain of PilB from *Neisseria meningitidis*. *J. Biomol. NMR* *36*, 6.
- Dosset, P., Hus, J. C., Blackledge, M., and Marion, D. (2000) Efficient analysis of macromolecular rotational diffusion from heteronuclear relaxation data. *J. Biomol. NMR* *16*, 23-28.
- Farrow, N. A., Muhandiram, R., Singer, A. U., Pascal, S. M., Kay, C. M., Gish, G., Shoelson, S. E., Pawson, T., Forman-Kay, J. D., and Kay, L. E. (1994). Backbone dynamics of a free and phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by ^{15}N NMR relaxation. *Biochemistry* *33*, 5984-6003.
- Farrow, N. A., Zhang, O., Szabo, A., Torchia, D. A., and Kay, L. E. (1995) Spectral density function mapping using ^{15}N relaxation data exclusively. *J. Biomol. NMR* *6*, 153-162.
- Hiyama, Y., Niu, C., Silverton, J. V., Bavoso, A., and Torchia, D. A. (1988) Determination of ^{15}N chemical shift tensor via ^{15}N - ^2H dipolar coupling in Boc-glycylglycyl[^{15}N glycine]benzyl ester. *J. Am. Chem. Soc.* *110*, 2378-2383.
- Ishima, R., Yamasaki, K., Saito, M., and Nagayama, K. (1995a) Spectral densities of nitrogen nuclei in *Escherichia coli* ribonuclease HI obtained by ^{15}N NMR relaxation and molecular dynamics. *J. Biomol. NMR* *2*, 217-220.
- Ishima, R., and Nagayama, K. (1995b) Protein backbone dynamics revealed by quasi spectral density function analysis of amide N-15 nuclei. *Biochemistry* *34*, 3162-3171.
- Johnson, B. A., and Blevins, R. A. (1994) NMRView: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. *J. Biomol. NMR* *4*, 603-614.
- Keller, R. (2004) Optimizing the process of nuclear magnetic resonance spectrum analysis and computer aided resonance assignment. Ph.D. Thesis, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland.
- Lefevre, J. F., Dayie, K. T., Peng, J. W., and Wagner, G. (1996) Internal mobility in the partially folded DNA binding and dimerization domains of GAL4: NMR analysis of the N-H spectral density functions. *Biochemistry* *35*, 2674-2686.
- Lipari, G., and Szabo, A. (1982a) Model-free approach to the interpretation on nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 1. Theory and range of validity. *J. Am. Chem. Soc.* *104*, 4546-4559.
- Lipari, G., and Szabo, A. (1982b). Model-free approach to the interpretation on nuclear magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of experimental results. *J. Am. Chem. Soc.* *104*, 4560-4570.
- Peng, J. W., and Wagner, G. (1995) Frequency spectrum of NH bond in eglin c from spectral density mapping at multiple fields. *Biochemistry* *34*, 16733-16752.
- Quinternet, M., Beaufils, C., Neiers, F., Tsan, P., Boschi-Muller, S., Averlant-Petit, M. C., Branlant, G., and Cung, M. T. (2007) ^1H , ^{13}C and ^{15}N backbone resonance assignment of the oxidized form (Cys₆₇-Cys₇₀) of the N-terminal domain of PILB from *Neisseria meningitidis*. *Biomol. NMR Assign.* *1*, 143-145.
- Quinternet, M., Selme, L., Tsan, P., Beaufils, C., Jacob, C., Boschi-Muller, S., Averlant-Petit, M. C., Branlant, G., and Cung, M. T. (2008c) ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignment of the C103S mutant of the N-terminal domain of DsbD from *Neisseria meningitidis*. *Biomol. NMR Assign.* *2*, 85-87.
- Wishart, D. S., Bigam, C. G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H. J., and Oldfield, E. (1995) ^1H , ^{13}C and ^{15}N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J. Biomol. NMR* *6*, 135-140.
- Wu, J., Neiers, F., Boschi-Muller, S., and Branlant, G. (2005) The N-terminal domain of PILB from *Neisseria meningitidis* is a disulfide reductase that can recycle methionine sulfoxide reductases. *J. Biol. Chem.* *280*, 12344-12350.

- Partie 3 -

Conclusion générale et perspectives

Conclusions

Grâce à plusieurs techniques propres à la RMN, nous avons déterminé la structure d'un complexe covalent entre les protéines nDsbD et NterPilB de *Neisseria meningitidis* impliquées, indirectement *via* les domaines Msr de PilB, dans la voie de réparation des résidus méthionine oxydés sous la forme sulfoxyde. Dans notre approche par docking, la condition préalable était la résolution des structures en solution de chacune des protéines pour aboutir finalement à la structure tridimensionnelle recherchée.

L'étude du variant C103S du domaine N-terminal de DsbD de *N. meningitidis* (nDsbD_{C103S}) s'est révélée intéressante à plus d'un titre. Nous avons pu mettre en évidence des différences structurales significatives en comparaison avec son homologue chez *E. coli*. En effet, la topologie globale des deux protéines diffère notamment par l'assemblage de leurs brins β . De plus, des changements structuraux locaux montrent que le site actif est plus large dans le cas de nDsbD_{C103S}. L'étude dynamique de cette protéine nous a renseignés quant aux capacités d'ajustement structural de la région $\beta 6$ - $\beta 7$. Cette dernière forme une « région couvercle » (« cap-loop ») protégeant les cystéines et demeure particulièrement mobile. Cela laisse sous-entendre un rôle important joué par la dynamique dans la reconnaissance du substrat.

L'étude des formes réduite et oxydée de la protéine NterPilB a été entreprise dans le but de mettre en évidence, éventuellement, des différences d'ordres structural et dynamique entre les deux états rédox de la protéine. Jusqu'à présent, seule la structure de la forme réduite, résolue par diffraction RX, était disponible. L'utilisation de la RMN a permis de montrer que les différences entre les deux formes de la protéine étaient réelles mais mineures. Notre attention s'est surtout focalisée sur la boucle FLHE (qui est spécifique de cette protéine en comparaison avec DsbE), mais sans pouvoir observer des changements notables que ce soit d'un point de vue dynamique ou structural. Même si un terme d'échange conformationnel important semblait apparaître au niveau de l'histidine de cette boucle, une étude des paramètres de relaxation de la protéine NterPilB en fonction du pH nous a permis de conclure que l'équilibre chimique protonation/déprotonation de la chaîne latérale de l'histidine est majoritairement responsable de l'apparition de ce terme d'échange.

Pour aller plus loin dans l'étude du comportement des boucles FLHE de NterPilB et « cap-loop » de nDsbD, caractéristiques de chacune de ces protéines, il convenait de résoudre la structure d'un complexe entre ces deux partenaires biologiques. Etant donnée la faible affinité entre ces deux protéines (au mieux de 10^{-4} M), notre stratégie a consisté à étudier un complexe covalent où chacun des partenaires a été sélectivement muté au niveau de sa cystéine de régénération. La possibilité d'obtenir un tel complexe, excluant la présence en solution des formes libres des protéines, facilite *de facto* les études par RMN. A travers son analyse, nous avons voulu savoir si chacune des boucles FLHE et « cap-loop » subissait des changements structuraux et dynamiques suite à la formation du complexe.

Le fait le plus marquant est l'ouverture de la « cap-loop » de nDsbD qui vient se positionner au dessus de l'hélice $\alpha 1$ de NterPilB. Ce changement structural majeur, bien qu'attendu d'après la littérature,

n'avait pas été mis en évidence jusqu'à présent pour la protéine nDsbD de *N. meningitidis*, dont le site actif est pourtant plus large. Nous montrons aussi que la région $\beta 6$ - $\beta 7$ de la protéine nDsbD conserve des propriétés de mobilité, même à l'état complexé. Ce comportement est en accord avec la multiplicité de substrats capables d'interagir efficacement avec nDsbD et démontre une étonnante adaptabilité fonctionnelle de la protéine.

De tels bouleversements n'ont pas été observés au niveau de la boucle FLHE de la protéine NterPilB. Bien que proche de nDsbD, les réarrangements structuraux de cette région sont mineurs lorsque l'on compare les formes libre et complexée de NterPilB. D'un point de vue dynamique, le comportement de cette boucle ne varie pas significativement. Cela traduit la faible implication de cette boucle dans la reconnaissance de nDsbD. Toutefois, l'analyse des paramètres de relaxation de la protéine suggère un gain de mobilité au niveau de l'hélice $\alpha 1$ de NterPilB, cette même hélice étant recouverte par la « cap-loop » de nDsbD. Ce transfert de flexibilité de nDsbD vers NterPilB pourrait être un moteur dans la séparation des deux partenaires dans l'étape qui suit la formation du pont disulfure intermoléculaire.

Nos résultats structuraux et dynamiques, ainsi que les données bibliographiques disponibles sur les structures des complexes impliquant nDsbD, nous ont permis de proposer un chemin général conduisant à la formation du complexe covalent entre nDsbD et son partenaire Trx-like. Ce chemin implique la reconnaissance, par la forme « ouverte » de nDsbD, d'un motif structural particulier sur le partenaire Trx-like et composé des deux boucles $\alpha 4$ - $\beta 4$ et $\beta 5$ - $\alpha 5$ et de la partie N-terminale de l'hélice $\alpha 1$ (ou des segments équivalents de DsbC, cDsbD ou DsbE). Les mouvements observés, (i) à l'interface entre les boucles $\alpha 4$ - $\beta 4$ et $\beta 5$ - $\alpha 5$ (ou segments équivalents) du partenaire Trx-like et le segment Gly107-Pro111 de nDsbD et, (ii) à l'interface entre la « cap-loop » de nDsbD et la partie N-terminale de l'hélice $\alpha 1$ (ou segment équivalent) du partenaire Trx-like, permettent aux deux partenaires protéiques du complexe d'ajuster leur conformation l'une par rapport à l'autre. Il y a ainsi formation d'une liaison hydrogène conservée entre le groupement amide du résidu Cys109 de nDsbD et le groupement carbonyle du résidu du partenaire Trx-like précédant le résidu *cis*-Pro conservé. Ceci doit avoir comme conséquence une activation de la cystéine 109 de nDsbD et le positionnement adéquat de cette Cys 109 vis-à-vis du pont disulfure des partenaires à réduire. Tout cela permettrait alors la formation correcte du pont disulfure intermoléculaire entre la Cys109 de nDsbD et la cystéine catalytique des partenaires.

Le fait que la nDsbD reconnaisse ses trois autres partenaires aussi efficacement que le domaine NterPilB suggère un modèle commun d'interaction entre la nDsbD et ses partenaires. C'est ainsi qu'un motif structural de reconnaissance commun à tous les partenaires Trx-like de nDsbD a pu être montré. Cependant, il est à noter que dans le cas du complexe avec l'homodimère DsbC, la partie catalytique « Trx » de DsbC (impliquée dans la formation du pont S~S intermoléculaire) possède une orientation différente de celle observée pour DsbE, cDsbD et NterPilB. De plus, la forme complexée à nDsbD de DsbC montre un resserrement du sillon en forme de V défini par ses deux sous-unités (cf Figure 24, page 37). Pour expliquer une spécificité de substrat, même large, de nDsbD envers les repliements de type Trx, il est possible que la reconnaissance entre nDsbD et DsbC implique aussi la sous-unité catalytique de DsbC (et

non pas sa seconde sous-unité, impliquée dans la formation d'un pont salin avec nDsbD). Cette hypothèse, si elle s'avère correcte, implique que l'étape de reconnaissance entre nDsbD et son partenaire Trx-like se fait, dans tous les cas, avec le même angle « d'attaque » de nDsbD sur le motif structural de son partenaire. Une superposition des structures 3D de tous les complexes impliquant nDsbD montre d'ailleurs que la position du motif structural de reconnaissance supposé par rapport au site actif de nDsbD est toujours la même. En effet, même si la sous-unité Trx-like catalytique de DsbC possède une orientation globale par rapport à nDsbD différente de celle observée dans les autres complexes (orientation des feuillets différant de 20° environ), l'orientation locale des boucles et hélice constituant le site actif est identique. De plus, l'analyse de la structure 3D de la forme libre de DsbC (dont le sillon en forme de V est plus large qu'à l'état complexé) montre qu'il n'y a pas de barrières stériques qui empêcheraient « l'attaque » de nDsbD avec une orientation similaire à celle trouvée dans les complexes impliquant cDsbD, DsbE et NterPilB. Pour toutes ces raisons, on peut supposer que le resserrement du sillon de DsbC, ainsi que la réorientation de sa sous-unité catalytique, soient deux phénomènes qui interviennent après la reconnaissance par nDsbD du motif structural commun aux Trx-like. La Figure 55 illustre cette hypothèse.

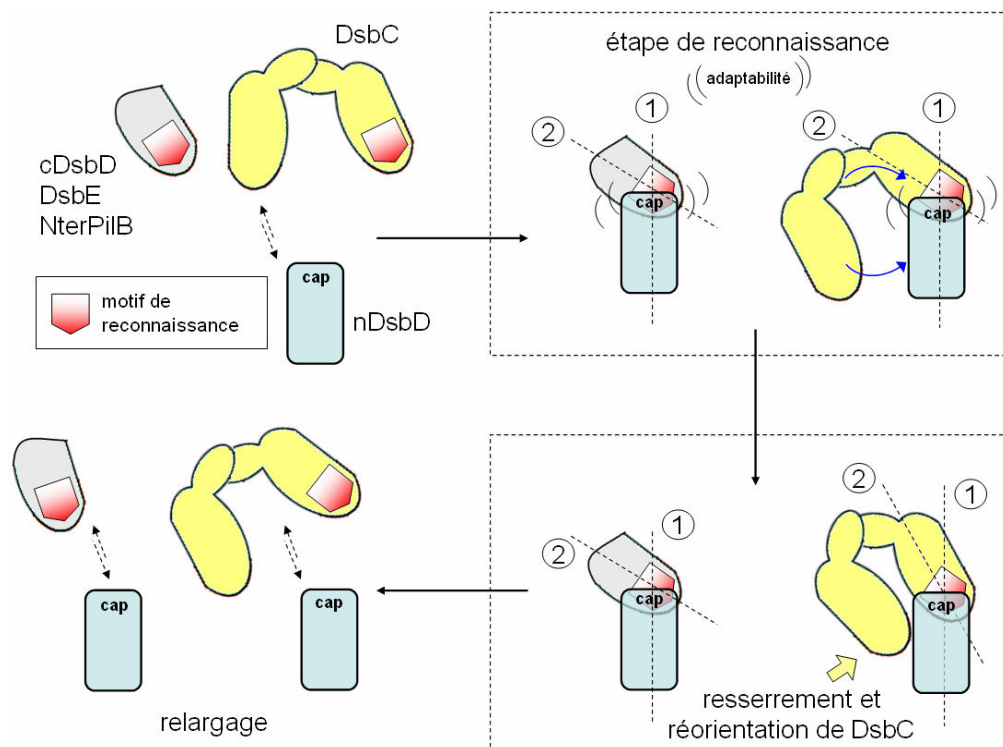


Figure 55 : Représentation schématique proposée de la reconnaissance entre nDsbD et ses partenaires Trx-like. Les protéines DsbC, cDsbD, DsbE et NterPilB partagent un motif de reconnaissance commun figuré par un pentagone rouge. Comme le montre les axes numérotés 1 et 2, la reconnaissance par nDsbD de son partenaire se fait avec un angle d'attaque similaire dans tous les cas, la sous-unité catalytique de DsbC étant reconnue la première. L'adaptabilité de nDsbD s'exprime durant cette étape. S'en suivent les étapes de resserrement et de réorientation globale de l'homodimère DsbC (schématisée par les flèches bleues et traduites par les axes 1 et 2). Le motif de reconnaissance des Trx-like reste orienté de la même façon dans tous les cas de figure. Un « transfert » de dynamique pourrait alors avoir lieu et faciliter la séparation des deux partenaires

Perspectives

Des questions demeurent cependant quant au rôle joué par la boucle FLHE de NterPilB. Nos données, ainsi que les données biochimiques apportées par l'équipe « Enzymologie Moléculaire » du MAEM, suggèrent que cette boucle n'est pas un facteur discriminant dans l'interaction avec nDsbD. En effet, l'efficacité catalytique de la formation du complexe covalent entre nDsbD et NterPilB délétée de la boucle FLHE (mesurée par la constante k_2 qui intègre une constante d'affinité), n'est diminuée que d'un facteur 7 par rapport au NterPilB sauvage. La structure que nous proposons pour le complexe nDsbD-SS-NterPilB est en accord avec ces données biochimiques. En effet, la boucle FLHE ne semble pas apporter de gêne stérique dans la formation du pont disulfure intermoléculaire. De plus, elle ne paraît pas animée de mouvements qui pourraient soit défavoriser, soit favoriser la reconnaissance entre les deux partenaires.

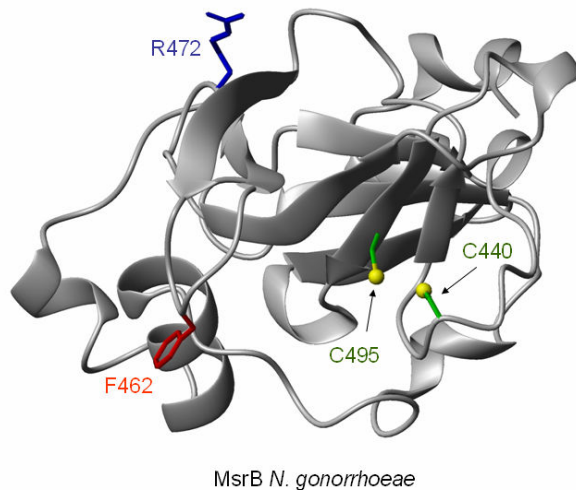
Cependant, si cette boucle ne joue pas de rôle discriminant vis-à-vis de nDsbD, elle en joue un comparativement à DsbE qui ne possède pas de signature FLHE. En effet, DsbE de *N. meningitidis*, contrairement à NterPilB, ne réduit pas les domaines Msr de PilB, sans pour autant que l'on sache si cela est lié à un problème de reconnaissance inefficace. L'ensemble de ces données ouvre des perspectives intéressantes d'études des propriétés structurales et dynamiques d'un complexe covalent entre NterPilB et, par exemple, le domaine MsrB de PilB (ce dernier étant celui qui est réduit le plus efficacement par NterPilB) afin d'y observer le comportement de la boucle FLHE. Cette étude pourrait être étendue à l'étude d'un complexe covalent entre MsrB et DsbE. L'approche que nous avons utilisée pour le complexe nDsbD-SS-NterPilB est adaptable à ces études, le domaine MsrB ayant une taille comparable à NterPilB (146 résidus). Cependant la structure du domaine MsrB de PilB de *N. meningitidis* est encore inconnue à ce jour. Une alternative consisterait à utiliser la structure obtenue par diffraction RX du domaine MsrB de PilB de *N. gonorrhoeae*. Ce dernier présente un très fort taux d'identité avec la MsrB de *N. meningitidis* puisque les séquences ne divergent que de deux résidus. De plus, ces résidus sont spatialement éloignés des cystéines actives (Figure 56).

```

MsrB N. meningitidis  -----TYKKPSDAELKRTLTEEQYQVTONSATEYAFSHEYDHLFKPGIYDVVSGEPLF
MsrB N. gonorrhoeae  GSHMAATYKKPSDAELKRTLTEEQYQVTONSATEYAFSHEYDHLFKPGIYDVVSGEPLF
*****
MsrB N. meningitidis  SSADKYDSGCGWPSFTRPIDAKSVTEHDDFSYNMRRTEVRSHAADSHLGHVFPDGPRDKG
MsrB N. gonorrhoeae  SSADKYDSGCGWPSFTRPIDAKSVTEHDDFSYNMRRTEVRSHAADSHLGHVFPDGPRDKG
*****
MsrB N. meningitidis  GLRYCINGASLKFIPLEQMDAAGYGA-----
MsrB N. gonorrhoeae  GLRYCINGASLKFIPLEQMDAAGYGALKGEVK
*****

```

Figure 56 : Alignement des séquences des domaines MsrB de PilB de *Neisseria meningitidis* et de *Neisseria gonorrhoeae* (en haut). Les résidus divergents sont encadrés, les cystéines actives sont indiquées par des flèches. Représentation de la structure RX du domaine MsrB de PilB de *Neisseria gonorrhoeae* (résolue par Lowther et al., 2002 - code d'accès PDB : 111d) (en bas). Les cystéines sont représentées en vert, les résidus divergents Phe462 et Arg472 sont représentés respectivement en rouge et en bleu.



On peut donc supposer que la structure du domaine MsrB de PilB est identique chez *Neisseria meningitidis* et *Neisseria gonorrhoeae*. L'attribution du spectre HSQC ^1H - ^{15}N du domaine MsrB de PilB de *Neisseria meningitidis* est déjà connue (Thureau et al., " ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignment of the methionine sulfoxide reductase B from *Neisseria meningitidis*". *J Biomol NMR.*, 2004, 30:223-4.).

Ainsi, il semble possible d'établir une cartographie des variations de déplacements chimiques en faisant une nouvelle attribution des groupements HN d'un complexe covalent entre NterPilB et MsrB de *Neisseria meningitidis*. Nous pourrions donc définir les résidus à l'interface et tenter de modéliser par docking ce complexe covalent. Cependant, les études RMN menées jusqu'à présent sur MsrB se sont révélées compliquées. En effet, les travaux d'Aurélien Thureau menés au cours de sa thèse ont montré, que l'attribution des protons des chaînes latérales des résidus de MsrB était très difficile. Par ailleurs, des problèmes d'instabilité de la protéine ont été rencontrés en présence d'un substrat. De plus, la seule structure RMN pour MsrB publiée dans la *Protein Data Bank* est très mal définie (structure de MsrB de *B. subtilis* déterminée par l'équipe américaine du Pr. Montelione). Tout cela indique que des efforts, en vue d'optimiser des conditions permettant de stabiliser la protéine, devront être faits avant d'entreprendre l'analyse structurale d'un complexe impliquant MsrB.

Si de bonnes conditions de mesure sont établies, des techniques non encore utilisées au laboratoire, telle que la mesure de couplages dipolaires résiduels, pourraient servir à l'établissement de contraintes orientationnelles améliorant le résultat final. De même, l'utilisation de contraintes issues des courbes de SAXS (Small Angle X-ray Scattering ou diffraction des rayons X aux petits angles) s'appliquent bien à l'étude des complexes protéine-protéine. Nous pourrions ainsi caractériser le rôle de la boucle FLHE de NterPilB dans la reconnaissance de son partenaire Msr.

- Partie 4 -

Annexe

Lettre à l'éditeur de *Journal of Biomolecular NMR* traitant de l'attribution des fréquences de résonances de la forme réduite du domaine N-terminal de PilB de *N. meningitidis*.

--

Journal of Biomolecular NMR (2006) 36:6

© Springer 2006

Letter to the Editor

¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignment of the N-terminal domain of PilB from *Neisseria meningitidis*

DOI 10.1007/s10858-005-4737-x

Neisseria meningitidis bacteria possess several antioxidant defence mechanisms that protect them against their host environment among which the PilB protein is postulated to be involved. PilB is composed of three domains including the N-terminal part that was recently shown to reduce the oxidized forms of methionine sulfoxide reductase and belongs to the thioredoxin-fold family (Wu et al., 2005). We report the nearly complete ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignments of the N-terminal domain of PilB from *N. meningitidis* (143 amino acids). 2D and 3D NMR experiments were performed with uniformly ¹⁵N-, ¹³C-labelled protein. More than 95% of backbone H^N, N, C^α, C^γ and side chain C^β nuclei have been assigned. Secondary structure determination using CSI method and TALOS lead to the prediction of 5 α -helical and 5 β -sheet segments. BMRB deposit with accession number 6709.

Reference: Wu et al. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 12344–12350.

Chrystel Beaufile^a, Fabrice Neiers^b, Nicolas Coudeville^a, Sandrine Boschi-Muller^b, Marie-Christine Averlant-Petit^a, Guy Branlant^b & Manh-Thong Cung^{a,*}

^aLCPM, UMR 7568 CNRS-INPL, 1 rue Grandville, B.P. 20451, 54001, Nancy Cedex, France; ^bMAEM, UMR CNRS-UHP 7567, Faculté des Sciences, Bld des Aiguillettes, B.P. 239, 54506, Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: Manh-Thong.Cung@ensic.inpl-nancy.fr
Supplementary material is available in electronic format at <http://dx.doi.org/10.1007/s10858-005-4737-x>.

--

Letter to the Editor: ^1H , ^{13}C and ^{15}N resonance assignment of the N-terminal domain of PilB from *Neisseria meningitidis*

Chrystel Beaufigli^a, Fabrice Neiers^b, Nicolas Coudeville^a, Sandrine Boschi-Muller^b, Marie-Christine Averlant-Petit^a, Guy Branlant^b and Manh-Thong Cung^{a,*}

^aLaboratoire de Chimie-Physique Macromoléculaire, UMR 7568 CNRS-INPL, Groupe ENSIC, 1 rue Grandville, B.P. 451, 54001 Nancy Cedex, France.

^bMaturation des ARN et Enzymologie Moléculaire, UMR CNRS-UHP 7567, Faculté des Sciences, Bld des Aiguillettes, B.P. 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail : Manh-Thong.Cung@ensic.inpl-nancy.fr

Key words: N-terminal domain of PilB, *Neisseria meningitidis*, resonance assignment

Biological context

Neisseria meningitidis and *Neisseria gonorrhoeae* are the only two pathogenic members of the *Neisseria* family of Gram-negative bacteria. These bacteria possess several antioxidant defence mechanisms that protect them against their host environment among which the PilB protein is postulated to be involved. Indeed, the secreted form of Pilb, which is bound to the outer membrane, was recently shown to be implied in survival of the *N. gonorrhoeae* in the presence of oxidative damage (Skaar *et al.*, 2002). PilB is composed of three domains. The central and the C-terminal domains display methionine sulfoxide reductase (Msr) A and B activities, respectively (Oly *et al.*, 2002) while the N-terminal part was recently shown to reduce the oxidized forms of MsrA and MsrB. The biochemical properties of the N-terminal domain also suggest a fold belonging to the thioredoxin-fold family (Wu *et al.*, 2005).

Comparison of the primary structure of the N-terminal domain with those of the known and putative proteins in the public data bases shows however no significant identity with any protein, excepted for some thiol-disulfide interchange proteins like CcmG/DsbE implicated in cytochrome C-type biogenesis (from 20 to 24 % identities). The only peculiar feature is the presence of a CXXC signature. Therefore, the N-terminal domain appears as a good target to selectively block the invasion of these pathogens. For that, knowledge of the three-dimensional structure appears as a prerequisite. We report here the backbone and side-chain atom nearly complete assignment of the N-terminal domain of PilB from *N. meningitidis* (143 amino acids), which only differs from its *N. gonorrhoeae* counterpart by four amino acids. The probable secondary structures are also presented.

Methods and experiments

The *E. coli* strain used for N-terminal domain (Δ_{33-175}) of PilB production was BL21-DE3 pLysS transformed with a pETNterPilB plasmid. ^{15}N - and $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -labelled samples were prepared by growing cells in a minimal

media with $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ as the sole nitrogen source and with glucose, ^{13}C -labelled or not, as the only carbon source. The N-terminal domain production was induced at an OD_{600} of 0.6 by addition of 1 mM IPTG and harvested after 4 h for the $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ protein and 16 h for the ^{15}N protein. Purification was done as described by Wu *et al.* (2005). Sample purity and molecular mass were checked by SDS-PAGE and electrospray mass spectrometry, respectively.

The NMR sample contained 1 mM protein concentration (95% H_2O , 5% D_2O) in 10 mM phosphate buffer and 50 mM 1,5-dithiotreitol- d_{10} at pH 7.1. All spectra were acquired at 298 K on a Bruker DRX 600 MHz spectrometer equipped with a 3-axis gradient TXI probe. Spectra were processed using the program XWINNMR (Bruker) and analyzed with the program XEASY (Bartels *et al.*, 1995). Backbone amide $^1\text{H}^{\text{N}}$, ^{15}N , $^{13}\text{C}^{\alpha}$, $^1\text{H}^{\alpha}$, $^{13}\text{C}'$, and side chain ^1H , ^{13}C resonances were assigned using ^1H - ^{15}N HSQC, HNCO, HN(CA)CO, HNCA, HN(CO)CA, CBCANH, CBCA(CO)NH and HNHA experiments. HCCH-TOCSY, H(CCCO)NH, CC(CO)NH and ^1H - ^{15}N -, ^1H - ^{13}C - 3D HSQC-NOESY spectra were also performed for side-chain assignments.

Torsion angles (ϕ , ψ) and secondary structure prediction are based on H^{N} , H^{α} , N , C^{α} , C^{β} and C' chemical shifts using the TALOS program (Cornilescu *et al.*, 1999).

Extent of assignments and data deposition

The ^1H - ^{15}N TROSY spectrum for the N-terminal domain of PilB is shown in Figure 1. More than 95% of backbone H^{N} , N , C^{α} , C' and C^{β} nuclei have been assigned (*i.e.*, 127/134 ^{15}N - H^{N} sites, 139/144 C^{α} , 139/144 C' , 130/135 C^{β}). Proton and carbon chemical shift data for the majority of side chain groups were determined using a combination of 3D spectra. Evaluation of the obtained H^{α} , C' , C^{α} and C^{β} chemical shifts by the CSI program (Wishart and Sykes, 1994) lead to the prediction of five α -helical and five β -sheet segments longer than four residues : $\beta 1$ (P57-F62), αA (L69-W80), αB (A84-S87), $\beta 2$ (A89-P97), αC (D107-A113), $\beta 3$ (L120-N126), αD (T129-L134), $\beta 4$ (S137-I145), $\beta 5$ (R153-K156), αE (E161-R169). In addition, the TALOS program predicts also the presence of several secondary structure elements, composed by segments shorter than four residues, in the N-terminal part and in the 147-160 fragment of the protein. The predicted secondary structures of the N-terminal domain are near of those of the CcmG/DsbE from *Bradyrhizobium japonicum* and differ only by the length of the β -strands and the α -helices (Edeling *et al.*, 2002).

Chemical shifts were deposited in the BioMagResBank under the access number BMRB 6709 (<http://www.bmrb.wisc.edu>).

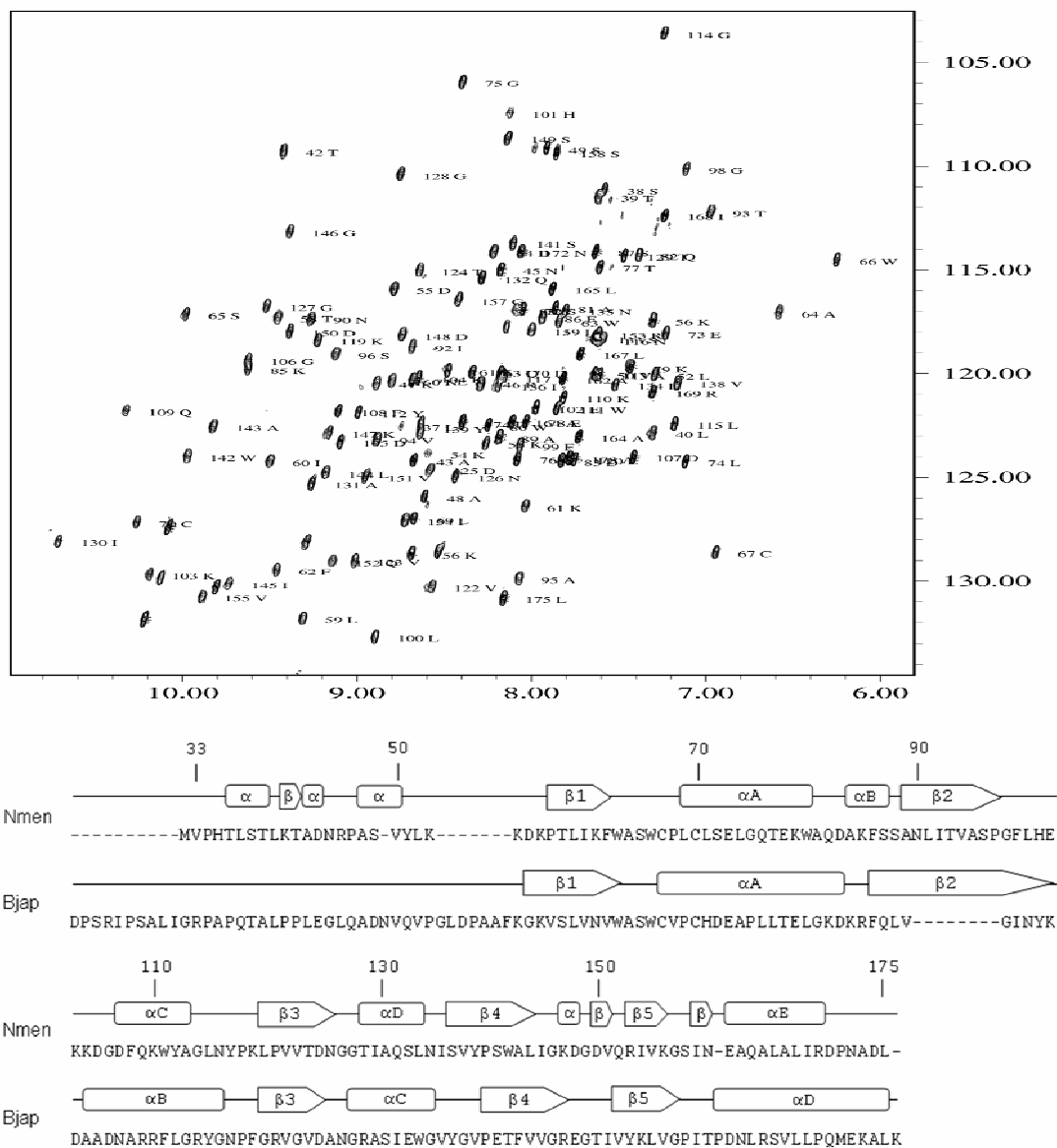
Acknowledgements

This research was supported by the CNRS, the Ministère délégué à la Recherche (ACI BCMS047), the Universities of Nancy I and INPL, the IFR 111 Bioingénierie and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC-No 4393). Access to the Bruker DRX 600 NMR facilities of the Service Commun de Biophysicochimie des Interactions Moléculaires, Nancy I was deeply appreciated. We thank Aurélien Thureau and Dr Guy Bousard for their assistance.

References

- Bartels, C., Xia, T., Billeter, M., Güntert, P. and Wüthrich, K. (1995) *J. Biomol. NMR*, **6**, 1-10.
- Cornilescu, G., Delaglio, F. and Bax, A. (1999) *J. Biomol. NMR*, **13**, 289-302.
- Edeling, M.A., Guddat, L.W., Fabianek, R.A., Thony-Meyer, L. and Martin, J.L. (2002) *Structure*, **10**, 973-9.
- Olry, A., Boschi-Muller, S., Marraud, M., Sanglier-Cianferani, S., Van Dorsselear, A. and Branlant, G. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 12016-12022.
- Skaar, E. P., Tobiasson, D. M., Quick, J., Judd, R. C., Weissbach, H., Etienne, F., Brot, N., and Seifert, H. S. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 10108–10113.
- Wishart, D.S. and Sykes, B.D. (1994) *J. Biol. NMR*, **4**: 171–180.
- Wu, J., Neiers, F., Boschi-Muller, S. and Branlant, G. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 12344-12350.

Figure 1: (Top) ^1H - ^{15}N TROSY spectrum of the N-terminal domain of PilB from *Neisseria meningitidis* at 298 K and 600 MHz. (Bottom) Sequences alignment of the N-terminal domain of PilB from *Neisseria meningitidis* (with secondary structure elements predicted by TALOS) with CcmG/DsbE from *Bradyrhizobium japonicum* (with secondary structure elements from the X-ray structure). The numbering of amino acid residues is based on the numbering of the entire PilB (Wu et al., 2005).



AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

oOo

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur Bruno KIEFFER, Professeur, IGBMC, Illkirch

Monsieur Jean-Marc LANCELIN, Professeur, Université Claude Bernard, Lyon1, Villeurbanne

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur QUINTERNET Marc

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Analyse structurale et dynamique par RMN des domaines N-terminaux des protéines
DsbD et PilB de Neisseria meningitidis et de leur interaction"**

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Génie des procédés et des produits** »

Fait à Vandoeuvre, le 25 novembre 2008

Le Président de l'I.N.P.L.

F. LAURENT

Analyse structurale et dynamique par RMN des domaines N-terminaux des protéines DsbD et PilB de *Neisseria meningitidis* et de leur interaction

RESUME

Nous montrons que la structure RMN, en solution, du domaine N-terminal de DsbD de *Neisseria meningitidis* (nDsbD) présente, à l'état réduit, un repliement de type immunoglobuline avec un site actif adoptant une conformation fermée. Toutefois, l'analyse des mouvements internes du squelette peptique de nDsbD montre que la région dite « couvercle » de la protéine et qui protège les résidus actifs dans les formes réduite et oxydée, est dotée de mouvements internes. Cela démontre les capacités intrinsèques d'ajustement structural de nDsbD.

Nous montrons aussi que les structures RMN, en solution, du domaine N-terminal de PilB de *N. meningitidis* (NterPilB) sous ses deux formes, réduite et oxydée, présentent un repliement de type thiorédoxine. Ces deux formes, très proches d'un point de vue structural, apparaissent comme étant globalement rigides. Par conséquent, la boucle FLHE, caractéristique de NterPilB et bordant le site actif de la protéine, ne dévoile pas de nouveaux indices structuraux et/ou dynamiques traduisant son implication dans la spécificité de substrat.

Finalement, nous montrons, grâce à l'étude structurale et dynamique, en solution, d'un complexe entre nDsbD et NterPilB de *N. meningitidis*, que nDsbD fait preuve d'une grande adaptabilité à l'état complexé. La région « couvercle » s'ouvre pour venir se positionner au dessus de l'hélice α qui contient les cystéines actives de NterPilB. Par contre, la boucle FLHE de NterPilB ne semble pas intervenir dans la stabilisation du complexe. Nous proposons que des phénomènes dynamiques puissent faciliter d'une part, l'adaptabilité relative des deux partenaires dans le complexe, et d'autre part, la dissociation finale de ces derniers.

Mots clefs : RMN, nDsbD, PilB, structure, dynamique.

Structural and dynamic NMR analysis of *Neisseria meningitidis* DsbD and PilB N-terminal domains and of their interaction

SUMMARY

We show, on one hand, that the NMR solution structure of DsbD N-terminal domain from *Neisseria meningitidis* (nDsbD) displays, in its reduced state, an immunoglobulin fold with a closed conformation of its active site. Nonetheless, our backbone dynamics study shows that the cap-loop region of the protein, which covers active residues in both oxidized and reduced forms, displays internal motions. This illustrates the inner structural adjustment capacities of nDsbD.

On the other hand, we show that NMR solution structures of the oxidized and reduced forms of *N. meningitidis* NterPilB display a thioredoxin-like fold. These two structures appear to be very similar and globally rigid. Consequently, the NterPilB characteristic FLHE loop, which covers one edge of the active site, does not reveal new structural and/or dynamics properties for its involvement in the substrate specificity.

Finally, we point out, from the structural and dynamics study of a complex between nDsbD and NterPilB from *N. meningitidis*, that nDsbD exhibits a powerful adaptability in its complex state. Its cap-loop region opens and comes over the α helix containing the NterPilB active cysteines. In contrast, the NterPilB FLHE loop does not seem to play a role in the complex stabilization. We propose that internal dynamics should facilitate, on one hand, the relative adaptability between the two partners of the complex and, on the other hand, their subsequent dissociation.

Keywords : NMR, nDsbD, PilB, structure, dynamics