

Etude Structurale de la Glutamate Synthase bactérienne par cryomicroscopie électronique et modélisation moléculaire

Cottevaille M^a, Jonic S^a, Larquet E^a, Svergun D^b, Vannoni MA^c, Boisset N^{a*}

^a Institut de Minéralogie et de Physique des Milieux Condensés, Universités P6, P7, UMR 7590 du CNRS, IPGP, case 115, F-75252 Paris cedex 05, France.

^b European Molecular Biology Laboratory, Hamburg Outstation, EMBL c/o DESY, Notkestrasse 85, D-22603 Hamburg, Germany.

^c Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università degli Studi di Milano, Via Celoria 26, I-20133 Milano, Italy.

Résumé – La glutamate synthase bactérienne comprend plusieurs copies de deux types de sous-unités catalytiques alpha et beta. Jusqu'à présent la stœchiométrie des sous-unités au sein du complexe était inconnue. Nous décrivons comment nous avons obtenu un volume de cryoMET de la NADPH-GltS avec une résolution comprise entre 9,5 Å (FSC_{0.5}) et à 8 Å (FSC_{1/2bit}), et comment nous avons recalé des données atomiques dans ce volume, déterminant ainsi la stœchiométrie du complexe.

1. Introduction

La glutamate synthase (GltS) est un complexe enzymatique qui forme, avec la glutamine synthétase, la principale voie métabolique d'assimilation de l'ammoniac chez les microorganismes et les plantes. La GltS catalyse la synthèse de L-glutamate à partir de 2-oxoglutarate (2-OG) et de L-glutamine. Les bactéries contiennent une forme NADPH-dépendante de l'enzyme (NADPH-GltS), composée de deux types de sous-unités (alpha, 162 kDa, et beta, 52,3 kDa). Une alpha et une beta suffisent à former une forme active, qui contient 1 FAD, 1 FMN, et 3 clusters fer-soufre. Néanmoins un assemblage macromoléculaire de cette enzyme a été découvert, contenant plusieurs copies de ces sous-unités.

La sous-unité beta fonctionne comme une NADPH oxydoréductase FAD-dépendante, en transférant les produits d'oxydoréduction jusqu'au site de synthèse du glutamate situé dans la sous-unité alpha, par l'intermédiaire d'au moins deux des trois clusters Fe-S. Sa structure n'a pas été résolue, mais un modèle par homologie est proposé.

La sous-unité alpha, dont la structure a été résolue par diffraction des rayons X, contient 2 sites catalytiques : l'un où la L-Gln est hydrolysée en L-Glu et NH₃, qui est transféré à travers un "tunnel" jusqu'au deuxième site, où le 2-OG est transformé en 2-iminoglutarate (2-IG), qui donne à son tour une molécule de L-Glu en recevant du FMN des produits d'oxydoréduction.

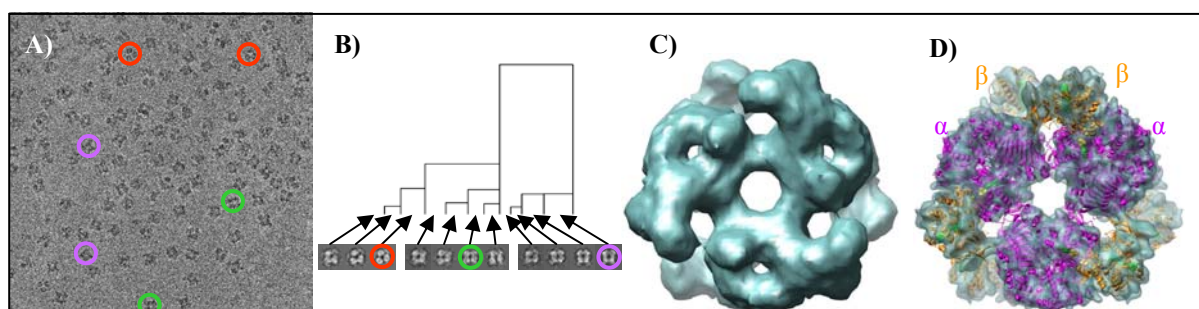


Figure 1. A) Champ typique de CryoMET de la glutamate synthase. B) Onze classes d'images ont été caractérisées, et quatre d'entre elles (cercles de couleur) utilisées pour le calcul de volumes primaires. C) Représentation de surface du complexe à 25 Å sans imposer de symétrie. D) Recalage moléculaire des modèles atomiques des sous-unités alpha et beta sur le volume à 8 - 9.5 Å de résolution de la Glutamate synthase obtenu sur le JEOL 2100F de l'IMPIC.

2. Obtention d'un volume de référence par reconstruction conique aléatoire

Un premier volume de reconstruction (~25 Å) a été calculé à partir de 2x12 champs de cryomicroscopie sous des inclinaisons de 45° and 0° avec un grossissement de $\times 45,000$ (Fig. 1A). Les négatifs ont été numérisés sur un scanner Nikon Coolscan 8000ED, avec un pixel de 4 Å de côté. Au total, 437 images de particules isolées ont été sélectionnées à l'aide des logiciels SPIDER et WEB d'analyse d'images [1], et soumises à la méthode de reconstruction conique aléatoire [2]. Parmi onze classes d'images, quatre ont été sélectionnées pour calculer de volumes primaires (Fig. 1B), qui après alignement 3D et regroupement avec les autres classes d'images ont conduit au calcul d'un premier volume de référence isotrope. A ce stade, nous avons utilisé les techniques

* Auteur à contacter : nicolas.boisset@impic.jussieu.fr – Tel : 01 44 27 45 85

d'alignement itératif par projection 3D [3] pour affiner cette structure. Bien qu'aucune symétrie n'ait été imposée durant les cycles de reconstruction, le complexe laisse apparaître une stoechiométrie de type (α_6, β_6), ainsi qu'une architecture comprenant un axe de symétrie d'ordre 3 et trois axes de symétrie d'ordre 2 (Fig. 1C).

3. Calcul d'un volume à 8 – 9.5 Å de résolution et modélisation moléculaire du complexe

Une nouvelle série d'images du complexe GltS a été obtenue sur le microscope JEOL JEM-2100F, avec un voltage de 200kV, un Cs de 0.5mm, et une gamme de sousfocalisation de -1.7 à -3.2 microns. Après tri semi-automatique des meilleures images en utilisant le nouvel algorithme des « spectres de puissances améliorés » [4] développé au laboratoire, les 13000 meilleures images de particules isolées ont été soumises à de nombreux cycles d'alignement itératif par projection 3D et correction de la fonction de transfert de contraste par filtration de Wiener. Le volume s'est stabilisé sur une structure de résolution comprise entre 9,5 Å (FSC_{0.5}) et à 8 Å (FSC_{1/2bit}), avec une symétrie de type D₃. Les modèles atomiques des sous-unités alpha et beta ont ensuite été recalés à l'aide du logiciel Chimera [5], et sont analysés en détail dans le mémoire de Thèse de Magali Cottevielle [6], ainsi que dans un article soumis à publication.

4. Références

- [1] J. Frank, M. Radermacher, P. Penczek, J. Zhu, Y. Li, M. Ladjadj, A. Leith. *SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields*. J. Struct. Biol. **116** (1996) 190-9.
- [2] M. Radermacher. *Three-dimensional reconstruction of single particles from random and nonrandom tilt series*. J. Electron Microsc. Tech. **9** (1988) 359-94.
- [3] P. Penczek, R. Grassucci, J. Frank, *The ribosome at improved resolution: new techniques for merging and orientation refinement in 3D cryo-electron microscopy of biological particles*. Ultramicroscopy **53** (1994) 251-70.
- [4] S. Jonic, C.O.S. Sorzano, M. Cottevielle, E. Larquet, N. Boisset. *A novel method for improvement of visualization of power spectra for sorting cryo-electron micrographs and their local areas*, J. Struct. Biol. **157** (2007) 156–167.
- [5] E.F. Pettersen, D. Goddard, C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin. *UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis*. J. Comput. Chem. **25** (2004) 1605-12.
- [6] M. Cottevielle. *Etudes structurales de complexes multienzymatiques par cryomicroscopie électronique, reconstruction 3D, modélisation moléculaire et recalage de données atomiques*. Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, Soutenue le 27 Mars 2007, à l'IMPMC.
- [7] Nous remercions la Commission Européenne pour son soutien au réseau d'excellence "3D-EM" contrat LSHG-CT-2004-502828, ainsi que la Région Ile-de-France pour la convention SESAME 2000 E 1435 de support à l'installation du microscope JEOL 2100F à l'IMPMC.