

TITRE (Français)	ETUDES STRUCTURALES DES PROTEINES FIBRILLAIRES PAR SPECTROSCOPIE DE RMN A L'ETAT SOLIDE
TITRE (English)	STRUCTURAL INSIGHTS INTO FIBRILLAR PROTEINS FROM SOLID-STATE NMR SPECTROSCOPY
AUTEUR	Birgit HABENSTEIN
UNIVERSITE	Université Claude-Bernard Lyon 1
DATE	19 octobre 2011
LABORATOIRE	Institut de Biologie et Chimie des Protéines
DIRECTION DE THESE	Dr. Anja Boeckmann
PARRAINAGE	membre de la SFB

La RMN à l'état solide est une méthode de choix pour l'étude des protéines insolubles et des complexes protéiques de haut poids moléculaire. L'insolubilité intrinsèque des protéines fibrillaires, ainsi que leur architecture complexe, rendent difficile voire impossible leur caractérisation structurale par la cristallographie et par la RMN en solution. La RMN à l'état solide n'est pas limitée par le poids moléculaire ou l'absence d'ordre structurale à grande échelle, et constitue donc un outil puissant pour l'étude structurale des protéines fibrillaires.

L'attribution des résonances RMN est le prérequis pour obtenir des informations structurales à résolution atomique. La première partie de ce travail de thèse décrit le développement de méthodes en RMN à l'état solide pour l'attribution des résonances de protéines à haut poids moléculaire. Nous avons appliqué ces méthodes afin d'attribuer le domaine C-terminal du prion Ure2 (33 kDa), qui est à ce jour la plus grande protéine attribuée par RMN à l'état solide. Nos résultats fournissent les bases pour l'étude de protéines à haut poids moléculaire à l'échelle atomique. Ceci est démontré dans la seconde partie de ce travail de thèse avec l'étude structurale de prions dans leurs formes entières à l'état de fibrilles. Nous présentons les premières études RMN à l'état solide des fibrilles des prions Ure2 et Sup35. Nous avons caractérisé la structure de ces prions et décrit l'arrangement des domaines fonctionnels et des domaines prion pour les fibrilles entières ainsi que pour les domaines isolés. La troisième fibrille étudiée dans cette thèse est l' α -synuclein, fibrille associée à la maladie de Parkinson, pour laquelle nous présentons l'attribution des résonances RMN ainsi que la structure secondaire d'un nouveau polymorphe.

En comparant l'architecture des protéines fibrillaires Ure2 et Sup35 à celle de HET-s, qui est à ce jour le seul prion de forme entière étudié, nous démontrons à l'aide de la RMN à l'état solide la grande diversité de comportement de ces trois protéines durant leurs assemblages en complexes de haut poids moléculaires. De plus, le polymorphe de l' α -synuclein que nous décrivons dans ce travail révèle une architecture très différente de celles précédemment reportées, avec la présence d'un domaine N-terminal rigide et ordonné. Les études présentées ici fournissent de nouvelles clés pour comprendre la diversité structurale de l'architecture des fibrilles, en considérant les fibrilles comme entités individuelles d'un point de vue structurale plutôt qu'une famille de protéines homogène.

Solid-state NMR is the method of choice for studies on insoluble proteins and other high molecular weight protein complexes. The inherent insolubility of fibrillar proteins, as well as their complex architecture, makes the application of x-ray crystallography and solution state NMR difficult. Solid-state NMR is not limited by the molecular weight or by the absence of long-range structural order, and is thus a powerful tool for the 3D structural investigation of fibrillar proteins.

The assignment of the NMR resonances is a prerequisite to obtain structural information at atomic level. The first part of this thesis describes the development of solid-state NMR methods to assign the resonances in large proteins. We apply these methods to assign the 33 kDa C-terminal domain of the Ure2p prion which is up to now the largest protein assigned by solid-state NMR. Our results provide the basis to study high molecular weight proteins at atomic level. This is demonstrated in the second part with the structural study of the full-length prions in their fibrillar form. We report the first high-resolution solid-state NMR study of Ure2 and Sup35 prion fibrils. We characterize the prion structures and describe the conformation of the functional domains and prion domains in the full-length fibrils and in isolation. The third fibrillar protein addressed in this work is the Parkinson's disease related α -synuclein whereof we demonstrate the NMR resonance assignment and the secondary structure determination of a new polymorph.

By contrasting the architecture of the fibrillar proteins Ure2, Sup35 between them, as well as with the one obtained for the only other full-length prion studied so far, HET-s, we demonstrate the essentially different

behavior of three proteins upon assembly into high molecular weight complexes revealed by solid-state NMR. Also, the α -synuclein polymorph described here reveals a fundamentally different architecture than the ones described so far, as it includes an ordered, rigid N-terminal part. Thus, the studies described here provide new insights in the structural diversity of fibril architectures, and plead to view fibrils as individuals from a structural point of view, rather than a homogenous protein family.