

Etudes biochimiques et structurales par cryo microscopie électronique d'un canal à potassium humain.

Stage Master M2

Catherine Vénien-Bryan Prof. Sorbonne Université

IMPMC (UMR7590), BiBip Biophysics and Bioinformatique

Team "Structure and dynamics of membrane proteins"

Sorbonne Université, Faculté des Sciences et d'Ingénierie, Campus Jussieu

4 Place Jussieu

75005 Paris

catherine.venien-bryan@sorbonne-universite.fr

Notre équipe s'intéresse à la structure des canaux à potassium humains et notamment le canal à potassium à rectification entrante Kir 2.1. Les canaux à rectification entrante (Kir) appartiennent à une famille de protéines membranaires qui contrôlent sélectivement la perméation des ions K^+ au niveau des membranes cellulaires et régulent ainsi l'excitabilité électrique de la membrane. Ces protéines sont à la base de processus biologiques fondamentaux tels que la propagation d'un signal neuromusculaire, la fréquence cardiaque, le tonus vasculaire, la sécrétion d'insuline.... Leur importance physiologique est sous-tendue par le fait que des mutations dans ces protéines sont à l'origine d'une large gamme de pathologies. Nous avons déterminé la structure à résolution atomique de l'homologue bactérien KirBac3.1 par cristallographie aux rayons X et cryo-microscopie électronique (Cryo-EM) (1,2). Grâce à des études biochimiques couplées à de la dynamique moléculaire, nous avons proposé un mécanisme d'ouverture de ce canal qui permet d'expliquer comment le canal passe d'un état fermé, imperméable aux K^+ à un état ouvert, permettant le passage des K^+ (3).

Notre but est maintenant d'étendre nos connaissances au canal à potassium humain Kir2.1 afin de comprendre le rôle de certaines mutations dans l'apparition de pathologies. En collaboration avec des cliniciens, nous avons identifié un certain nombre de mutants de ce canal Kir2.1 humain qui sont à l'origine du syndrome d'Andersen et nous nous focaliserons sur une de ces mutations pendant le stage de Master2: la mutation Kir2.1 R312H

Le but de ce stage de Master 2 est de :

- a) Optimiser l'expression des protéines humaines Kir2.1 sauvage Kir2.1 et R312H. Produire une protéine très stable.
- b) Caractériser les interactions de cette protéine avec le PIP2, un lipide de la membrane modulateur du mécanisme d'ouverture de ce canal à potassium. La technique de MicroScale Thermophoresis sera utilisée à cet effet. Nous caractériserons aussi les interactions de la protéine mutante R312H avec le PIP2 sachant que cette mutation se situe sur le site de fixation du PIP2.
- c) Effectuer des tests d'électrophysiologie sur la protéine sauvage et mutante avec notre collaborateur électro-physiologiste.
- d) Prendre des clichés en cryo-microscopie électronique de ces protéines au sein de la plateforme de cryo-EM à l'Institut Pasteur
- d) Intégrer ces données à nos études actuelles de traitement d'images afin de déterminer la structure de ce canal à haute résolution.

Notre équipe possède tout l'équipement nécessaire à la biochimie des protéines membranaires eucaryotes : expression et purification. Nous utiliserons les microscopes performants de la plateforme de l'Institut Pasteur. Nous avons au laboratoire tout l'équipement et l'expertise pour analyser ces images prises en condition cryo.

References

1- Bavro VN et al., 2012.. Nat Struct Mol Biol 19:158

2- De Zorzi R, et al., Biophys. J. 2013 105 :398-408

3- Fagnen et al. 2020 Sci Rep