

Université du Québec

**CRÉATION ET CARACTÉRISATION
DU MUTANT TRP
DE LA PROTÉINE *DE NOVO* MB-1**

Mémoire présenté à
l'Université du Québec à Trois-Rivières
Comme exigence partielle de la maîtrise en biophysique

par
Mylène Claude Gagnon

Septembre 2001

20508

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord exprimer mes sincères remerciements à mon directeur de maîtrise Monsieur Marc Beauregard, Ph.D. pour son soutien, son dévouement et pour la passion qui l'habite et qu'il a su nous transmettre. Pour ces raisons et pour sa générosité, je le considère maintenant plus comme un mentor et comme un modèle et je lui en serai reconnaissante à jamais. Je tiens aussi à remercier Monsieur Marc Sirois, Ph.D. pour ses judicieux conseils et pour l'aide qu'il m'a apporté en partageant avec nous son expertise en biologie moléculaire et ce, sans jamais calculer son temps. Je n'oublierais pas, non plus, de remercier mes collègues de laboratoire Martin Williams et Alain Doucet pour leur amitié et les merveilleux échanges que nous avons eu sur tous les sujets et qui m'ont fait grandir. Un sincère merci, aussi, à Jennifer Morrison qui m'a si gentiment initié aux joies et malheurs de la purification des protéines.

J'aimerais également remercier ma famille pour leurs nombreux encouragements et leur soutien. Je tiens aussi à remercier spécialement la famille Deschambeault pour m'avoir chaleureusement accueilli chez elle à la fin de ma maîtrise.

Enfin, il me serait impossible de terminer sans souligner l'importance de tous ces moments partagés avec mes amis et collègues, Sylvie, Fannie, Martin, Mélanie, Caroline, Meghan, Louis, Barbara, Alain et tous les autres, sans lesquels ces dernières années auraient été beaucoup moins amusantes et stimulantes. Je pense entre autres à nos dîners et nos pauses café qui se prolongeaient souvent, à nos parties de Frisbee, à nos discussions philosophiques, à nos soirées de filles et à celles où les gars étaient invités. Parmi ces moments spéciaux, je pense aussi à ces longues soirées et ces fins de semaines de travail qui, à travers nos séances de motivation mutuelles et nos remues-méninges scientifiques, m'ont permis de créer des liens d'amitiés uniques avec Sylvie qui travaillait de l'autre côté du corridor séparant nos laboratoires respectifs.

RÉSUMÉ

La protéine *de novo* MB-1 (ou Milk Bundle-1) a été conçue pour deux fins soit: 1° pour répondre aux besoins nutritionnels particuliers de la vache laitière et 2° pour l'étude fondamentale du plissement des protéines à nœuds d'hélices. Elle a un fort contenu (57%) en méthionine, thréonine, lysine et leucine, des acides aminés essentiels qui sont connus comme déterminants dans la production des protéines laitières. Toutefois, même si elle possède plusieurs attributs de protéines natives, elle n'est pas suffisamment stable, ce qui diminue sa résistance aux protéases du rumen. De plus, la tyrosine 62 est une pauvre sonde spectroscopique de l'état plié et limite les méthodes de caractérisation de notre protéine.

Afin d'augmenter la stabilité de la protéine et aussi afin de lui apporter une meilleure sonde d'intérêt spectroscopique, un résidu tryptophane a été inséré en remplacement d'un résidu tyrosine en position 62. Mes recherches se résument par la création, la purification et la caractérisation de ce mutant: MB-1Trp.

Les résultats des études de caractérisation sont concluants. L'analyse du spectre CD de MB-1Trp confirme que notre nouveau mutant adopte les mêmes structures que la protéine mère MB-1, soit une structure composée principalement d'hélices. Le déplacement du λ_{\max} du tryptophane de 330 à 350 nm après l'ajout de dénaturant (urée) démontre son emplacement dans le noyau hydrophobe et confirme la justesse de notre stratégie. Pour ce qui est de l'effet de la mutation sur la protéine, les résultats sont exceptionnels. MB-1Trp résiste beaucoup mieux aux protéases que MB-1 non mutée. En fait, sa demie-vie dans les conditions du rumen est deux fois plus grande que MB-1 et son comportement de

dégradation est comparable à une protéine naturelle de taille similaire (cytochrome c). La mutation confère aussi une amélioration importante de la stabilité thermique de MB-1; la température de dénaturation de MB-1Trp atteint 55°C, une augmentation significative de 16°C par rapport à la protéine mère.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1.1 Applications biotechnologiques et physiologiques des protéines	1
1.2 Application de la protéine MB-1	1
1.3 Particularités physiologiques de la vache laitière	2
1.3.1 Voies d'approvisionnement en acides aminés	2
1.3.2 Besoins spécifiques des ruminants en acides aminés essentiels	5
1.4 MB-1 : une nouvelle approche pour combler la demande en AAes	7
1.5 MB-1	9
1.5.1 La conception	9
1.5.1.1 L'hélice α	11
1.5.1.2 Le noeud d'hélices	11
1.5.1.3 La séquence de MB-1	12
1.5.2 La caractérisation	16
1.5.3 Les faiblesses	16
1.5.4 Stabilisation conformationnelle et protéolytique de MB-1	17
1.6 Les objectifs de mon mémoire	20

CHAPITRE 2 : STRATÉGIE DE DESIGN DU MUTANT MB-1TRP

2.1	Choix de l'emplacement de la mutation	21
2.2	Comparaison des propriétés de la tyrosine et du tryptophane	23

CHAPITRE 3: ARTICLE SCIENTIFIQUE

3.1	Préface	29
3.2	Replacement of Tyr62 by Trp in the designer protein Milk Bundle-1 results in significant improvement of conformational stability, FEBS Letter 484 (2000).	31
3.2.1	Introduction	33
3.2.2	Materials and methods	35
3.2.2.1	Preparation of MB-1 Trp mutant	35
3.2.2.2	Protein expression and purification	35
3.2.2.3	Protein quantification and electrophoresis	37
3.2.2.4	Conformational investigation by circular dichroism (CD)	37
3.2.2.5	Thermal denaturation	37
3.2.2.6	ANSA fluorescence enhancement	38
3.2.2.7	Intrinsic fluorescence measurements	38
3.2.2.8	SEC / estimation of molecular size	39
3.2.2.9	Proteolytic degradation measurements	39
3.2.3	Results	40
3.2.4	Discussion	42
3.2.5	References	45
3.2.6	Figures legends	47

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

4.1	Optimisation des propriétés de MB-1	55
4.2	Création de MB-1Trp	57
4.3	Caractérisation du mutant MB-1Trp	57
4.4	Comparaison de MB-1Trp avec les autres mutants caractérisés	60
4.5	Applications de MB-1Trp	61
4.6	Avenues de recherche	65

RÉFÉRENCES	66
-------------------	----

ANNEXE : TIRÉ À PART DE L'ARTICLE SCIENTIFIQUE

Replacement of Tyr 62 by Trp in the designer protein Milk Bundle-1 results in significant improvement of conformational stability. FEBS Letter 484 (2000).	69
--	----

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1	Comparaison des propriétés de la tyrosine et du tryptophane.	25
Tableau 4.1	Comparaison de la stabilité de MB-1Trp.	62
Tableau 4.2	Applicabilité de MB-1Trp.	64

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Représentation schématisée du parcours des protéines dans le rumen.	3
Figure 1.2	Voies métaboliques de la digestion et de l'absorption des protéines chez les ruminants.	4
Figure 1.3	Le nœud d'hélices.	10
Figure 1.4	L'hélice α .	13
Figure 1.5	Le nœud d'hélices vu du dessus.	14
Figure 1.6	Le séquence primaire et nucléotidique de MB-1.	15
Figure 2.1	Structure ouverte et aplatie de MB-1.	22
Figure 2.2	Tyrosine vs tryptophane.	24
Figure 2.3	Vue transversale des quatre hélices de MB-1 au niveau de la mutation Trp.	27
Figure 3.1	MB-1's hydrophobic core as predicted by design.	49
Figure 3.2	CD spectra of MB-1Trp.	50
Figure 3.3	Unfolding of MB-1Trp as Monitored by fluorospectroscopy.	51
Figure 3.4	Enhancement of ANSA fluorescence by MB-1Trp.	52
Figure 3.5	Thermal denaturation curve of MB-1Trp.	53
Figure 3.6	Degradation of MB-1 and MB-1Trp mutant using pronase E.	54

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Terme	Abréviation
Acide aminé essentiel	AAE
Acide 8-anilino-1-naphthalènesulfonique	ANSA
Alanine	A, Ala
Histidine	H, His
Isoleucine	I, Ile
Leucine	L, Leu
Lysine	K, Lys
Maltose binding protein	MBP
Milk Bundle-1	MB-1
Milk Bundle-1 , Tryptophane en position 62	MB-1Trp
Méthionine	M, Met
Phénylalanine	F, Phe
Thréonine	T, Thr
Tryptophane	W, Trp
Tyrosine	Y, Tyr
Valine	V, Val

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Applications biotechnologiques et physiologiques des protéines

Dans plusieurs types d'industries, les protéines sont modifiées afin de répondre à des besoins précis aux niveaux de la production et de la consommation. On pense entre autres aux enzymes utilisées dans les détergents, dans les produits de transformation des aliments, dans le traitement du cuir et dans les produits pharmaceutiques; on pense aussi aux protéines recombinantes utilisées, par exemple, pour améliorer la résistance des tissus et comme antigènes dans les vaccins. À cause de leur caractère unique et de leur action spécifique, les entrepreneurs-chercheurs ont depuis longtemps flairé l'intérêt de développer les applications biotechnologiques et physiologiques des protéines. Cependant, ce n'est que depuis quelques années que des protéines ont été créées, et non seulement modifiées, pour répondre à des besoins spécifiques que la simple modification d'une protéine naturelle rendait impossible ou non rentable. C'est pour cette raison que la protéine MB-1 a été imaginée, c'est-à-dire pour répondre à un besoin qu'il est difficile et coûteux de combler autrement.

1.2 Application de la protéine MB-1

La protéine MB-1 a une application biotechnologique. Elle a été créée pour répondre aux besoins nutritionnels particuliers de la vache laitière. Avant d'expliquer plus en détail les caractéristiques de la protéine, voici d'abord les circonstances physiologiques apparentées à la vache laitière qui ont encouragé la création de MB-1.

1.3 Particularités physiologiques de la vache laitière

1.3.1 Voies d'approvisionnement en acides aminés

Il est connu que la vache a un système digestif particulier. Lorsque la nourriture est ingérée, elle transite d'abord vers le rumen avant de passer à l'estomac pour être digérée et assimilée par l'organisme. Cela a un impact important sur les acides aminés qui seront disponibles à son métabolisme.

Chez tous les animaux, les acides aminés proviennent soit de la diète, soit de leur métabolisme interne. Au cours des processus digestifs, les protéines qui proviennent de la diète sont dégradées; les acides aminés qui en résultent sont ensuite assimilés par l'organisme. Les autres acides aminés disponibles aux animaux proviennent directement de leur métabolisme. Ces derniers les métabolisent afin de combler leurs besoins en certains acides aminés qui ne sont pas fournis dans la diète ou qui le sont en quantité insuffisante. Les acides aminés proviennent ainsi, soit des tissus comme les muscles, où les protéines sont mises en réserve, soit de la synthèse de nouveaux acides aminés par des cellules sécrétrices (Mephram 1986; Holmes et Wilson, 1984). Les acides aminés assimilés sont finalement utilisés pour former les nouvelles protéines qui entreront dans la composition des tissus.

Chez les ruminants, les acides aminés peuvent aussi provenir d'une autre source, soit des protéines produites par les micro-organismes du rumen (voir figure 1.1). Lors de leur passage dans le rumen, 60% à 70% des protéines solubles provenant de la diète sont dégradées par les protéases des microbes qui sont présents naturellement dans la flore ruminale. Les produits de dégradation de ces protéines sont absorbés par les microbes et leur servent de sources d'azote, de carbone et d'acides aminés (Church 1988). Ces molécules sont

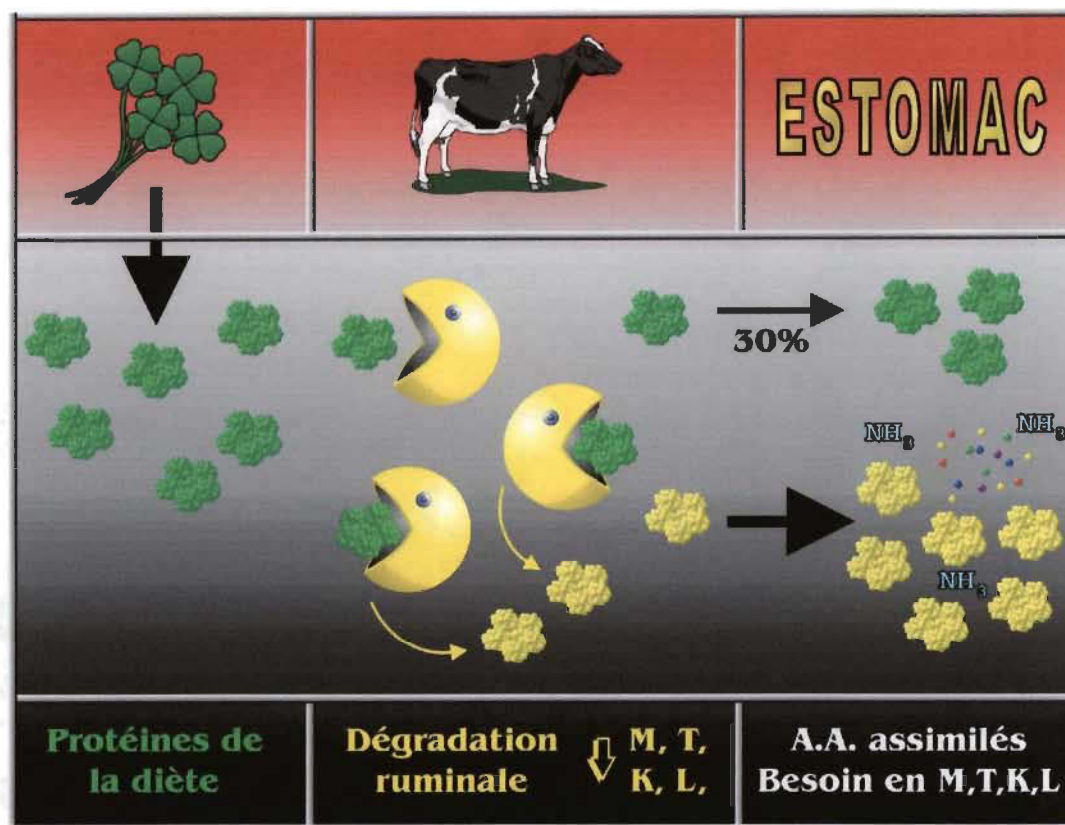


FIGURE 1.1 Représentation schématisée du parcours des protéines dans le rumen. La nourriture ingérée par la vache transite d'abord vers le rumen avant d'être digérée et assimilée par l'organisme. Cependant, lors de leur passage dans le rumen, une grande partie des protéines de la diète sont utilisées par les microbes présents naturellement dans la flore ruminale. Ainsi, seulement 30% des protéines ingérées réussissent à contourner la dégradation ruminale. Les autres protéines accessibles au métabolisme de la vache, soit environ 60% des protéines initiales, sont libérées par les micro-organismes. Leur profil en acides aminés, et par conséquent, leur valeur nutritionnelle, s'en retrouve toutefois modifiés. La stabilité et le contenu des protéines fournies pour la nutrition des vaches ont donc un impact sur la qualité de leur lait.

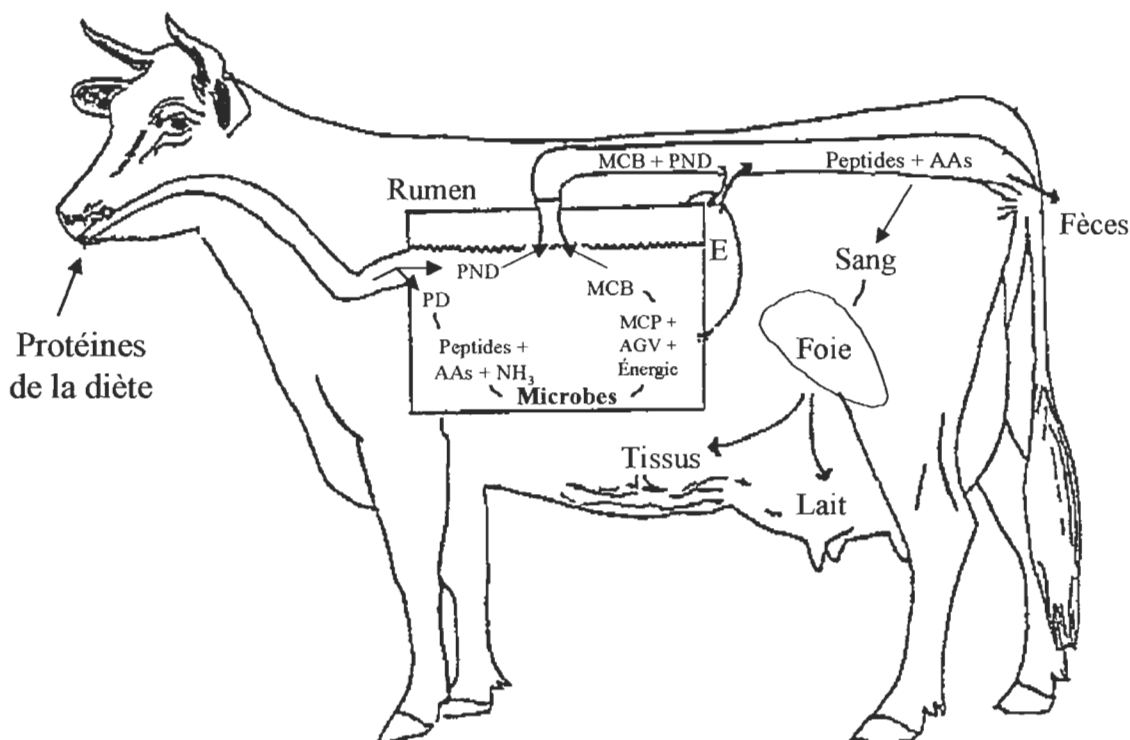


FIGURE 1.2 Voies métaboliques de la digestion et de l'absorption des protéines chez les ruminants. 60% à 70% des protéines qui sont ingérées par l'animal sont dégradées (PD) lorsqu'elles atteignent le rumen. Les microbes qui y sont présents, utilisent les protéines comme source d'azote, de peptides et d'acides aminés. La plupart de ces produits dégradés leur serviront pour produire leur propres protéines (MCP). Certains acides aminés seront aussi utilisés dans la synthèse d'autres molécules comme les acides gras volatiles (AGV). Les microbes (MCB) et les protéines provenant de la diète et qui n'ont pas été dégradées (PND) transitent vers l'estomac (E) où le faible pH et l'activité des pepsines agissent pour lyser la paroi cellulaire des bactéries et hydrolyser les protéines. Le reste de la digestion des protéines est assuré par les enzymes digestives des sécrétions pancréatique et hépatique. Les acides aminés et les petits peptides sont absorbés dans le petit intestin et transportés par le sang vers le foie. Pour rencontrer la haute demande des glandes mammaires, une grande portion des acides aminés est transportée aux cellules épithéliales mammaires pour être utilisés dans la synthèse des protéines du lait. Les autres acides aminés sont utilisés pour le maintien et la croissance des tissus du corps. En temps de besoins, l'animal se tourne vers ces acides aminés comme sources de glucose et d'énergie. Cette gluconéogénèse prend place au niveau du foie. Les protéines qui ne sont pas digérées par l'animal sont excrétées dans les fèces. (modifié de Church 1998).

réutilisées par la suite dans la synthèse de leurs propres protéines et d'autres molécules essentielles (voir figure 1.2). Les protéines microbiennes sécrétées et celles provenant de la mort normale des bactéries du rumen deviennent donc, à leur tour, une source d'acides aminés pour les ruminants (Hutjens et al. 1996; Church 1988; Chalupa 1975; Hungate 1966).

1.3.2 Besoins spécifiques de la vache laitière en acides aminés essentiels

Les acides aminés sont classés en deux catégories, soit les acides aminés essentiels (AAEs) et les acides aminés non-essentiels. Les acides aminés essentiels sont des acides aminés qui sont nécessaires à la survie d'un organisme, mais qui ne peuvent pas être synthétisés par ce dernier puisqu'il ne possède pas les voies métaboliques nécessaires (Purser 1970). En général, on retrouve 9 acides aminés essentiels parmi une possibilité de 20 soit: l'histidine (H), l'isoleucine (I), la lysine (K), la leucine (L), la méthionine (M), la thréonine (T), la phénylalanine (F), le tryptophane (W) et la valine (V). La présence de ces AAEs dans la diète est donc nécessaire pour la croissance, le maintien et la reproduction de tous les animaux. En fait, les AAEs constituent 60% des acides aminés présents chez les animaux (Miller 1979). Chez la vache laitière, les AAEs sont aussi impliqués dans la lactogénèse (production de lait), puisqu'ils sont nécessaires à la synthèse des protéines du lait. Ainsi, la quantité et la qualité des protéines fournies dans la diète de la vache ont donc un impact sur la production du lait et des protéines du lait.

Lorsqu'on jette un coup d'œil sur les sources d'acides aminés pour la vache laitière, on peut facilement prévoir que la majorité de ceux-ci proviennent des protéines microbiennes. En effet, et il en a été question précédemment, environ 65% des protéines de la diète sont dégradées par les micro-organismes et de nouvelles protéines sont synthétisées.

Évidemment, le profil en acides aminés des protéines initialement fournies dans la diète, et par conséquent, leur valeur nutritionnelle, s'en retrouvent changés. Cela a été confirmé par les recherches de plusieurs chercheurs qui ont démontré que les protéines provenant de la dégradation ruminale ont une valeur diminuée en Méthionine et en Lysine ainsi qu'en Thréonine et en Leucine dans une moindre mesure (Orskov *et al.* 1987; Chalupa 1975; Stern *et al.* 1985; Ashes *et al.* 1995; Rulquin *et al.* 1995).

Chez la plupart des ruminants, cette déficience en Met, Thr, Lys, et Leu des protéines microbiennes n'entrave pas leur santé puisque les besoins en ces AAEs sont encore comblés par les acides aminés présents dans les protéines fournis dans la diète. Cependant, chez la vache laitière domestique, la synthèse de ces acides aminés par les microbes du rumen n'est pas suffisante pour remplir les exigences de la croissance et de la haute production laitière. Ces quatre acides aminés deviennent ainsi limitants à la production de lait. C'est-à-dire que la quantité de lait produit et la qualité des protéines laitières produites dépendent de leur présence. De plus, une déficience en ces acides aminés implique une diminution de la quantité de protéines produites par les vaches, ce qui peut éventuellement avoir des effets néfastes sur leur santé. Dépendant évidemment de la gravité de la déficience, les vaches peuvent perdre du poids et devenir moins résistantes aux maladies et infections (Miller 1979).

1.4 MB-1 : une nouvelle approche pour combler la demande en AAEs

Même en variant et combinant les plantes fourragères données dans la diète de leurs vaches ou en leur donnant des suppléments et des concentrés de protéines, les producteurs laitiers n'arrivent pas à augmenter de façon significative la quantité de Met, Thr, Lys et Leu globale disponible pour le métabolisme de leurs animaux (Rulquin *et al.* 1995; Orskov *et al.* 1987). La dégradation protéolytique est donc déterminante dans l'apport de ces acides aminés. Ainsi, les solutions logiques pour fournir la bonne quantité d'AAEs seraient d'utiliser des protéines ayant un contenu plus élevé en ces acides aminés dans la diète ou d'utiliser un moyen pour contourner la dégradation ruminale. Pour ce faire, plusieurs approches ont été développées.

La première approche, qui est d'ailleurs celle utilisée par les producteurs laitiers depuis plus de quinze ans, consiste à donner des suppléments alimentaires à la diète des animaux. Ces suppléments consistent en des acides aminés essentiels protégés par cuisson, par traitement chimique, ou bien par une capsule (Chalupa 1975; Stern *et al.* 1985; Ashes *et al.* 1995; McNiven *et al.* 1994). Les acides aminés encapsulés (ou Smart aminesTM de Rhone Poulenc) sont les plus utilisés. La capsule a pour effet de protéger les acides aminés de la digestion par les micro-organismes du rumen. Insensible au pH neutre du rumen, elle se dissout une fois rendue au niveau de l'estomac où le pH est plus acide (2) pour y libérer les acides aminés qui y sont absorbés. Toutefois, même si ces techniques permettent de contourner la dégradation ruminale, elles restent très onéreuses à cause de l'achat continu des suppléments, et elles peuvent rendre les acides aminés difficiles à digérer une fois dans l'intestin (Tamminga *et al.* 1979; Tanner *et al.* 1994; Stern *et al.* 1985; Chalupa *et al.* 1975).

Une deuxième approche serait de produire des protéines de grande qualité à partir de plantes transgéniques ou d'autres organismes. Cette méthode permettrait la production de grande quantité de protéines tout en étant plus économique que l'approche précédente (Dyer *et al.* 1993; Ealing *et al.* 1994; Williamson *et al.* 1996). Trois moyens peuvent être employés pour améliorer la qualité des protéines d'un organisme transgénique.

Tout d'abord, le gène d'une protéine naturelle ayant un fort contenu en acides aminés essentiels peut être transféré à une plante utilisée comme fourrage. Cependant, cela implique que la composition en acides aminés des protéines est limitée à ce qui est disponible dans la nature dans des proportions qui ne sont pas nécessairement plus avantageuse pour la vache. L'albumine de tournesol est un exemple de ces protéines utilisées en expression hétérologue (McNabb *et al.* 1994; McNabb *et al.* 1993).

Un autre moyen serait de modifier le contenu d'une protéine existante dans la nature afin d'y insérer la brochette d'acides aminés désirés. Mais cette méthode n'est que très peu efficace puisqu'on parle ici de plusieurs modifications à apporter; et il est connu que la seule mutation d'un acide aminé peut engendrer des problèmes sur le plan de la conformation de la protéine l'empêchant ainsi de bien se plier et la déstabilisant du même coup (De Lumen *et al.* 1997; Hoffman *et al.* 1988; Lawrence *et al.* 1990; Dyer *et al.* 1993).

Le troisième moyen, celui employé par notre laboratoire, implique la création d'une toute nouvelle protéine qui répondrait, par sa composition en acides aminés sélectionnés, aux critères désirés. C'est ainsi que la protéine MB-1 a vu le jour (Beauregard *et al.* 1995).

1.5 MB-1

1.5.1 La conception

La protéine idéale pour répondre à la demande des vaches laitières en AAEs devrait avoir un contenu élevé en méthionines, en lysines et en d'autres acides aminés essentiels comme la thréonine et la leucine. De plus, elle devrait être exprimée *in vivo*, et pour ce faire, devrait être soluble, de pleine longueur et assez stable pour résister le mieux possible aux conditions du rumen.

Il est connu que la structure, la compacité et la stabilité d'une protéine dépendent de sa séquence en acides aminés communément appelée la structure primaire. Ainsi, en utilisant les principes de pliage des protéines établis à partir des données sur la structure des protéines naturelles, le design d'une protéine stable peut être effectué, et ce malgré un contenu en acides aminés non usuel ou non retrouvé chez les protéines naturelles.

La structure tertiaire qui a été choisie pour la protéine MB-1 est un nœud (ou carré) d'hélices (figure 1.3). Le choix de Beauregard *et al.* (1995) s'est arrêté sur le nœud d'hélices puisque les recherches sur les principes de pliage des hélices- α et sur cette structure étaient, à ce moment, déjà avancées (Betz *et al.* 1993) et parce que la plupart des acides aminés désirés pour la protéine pouvaient être retrouvés dans ce modèle. En effet, la méthionine, la lysine et la leucine sont connus comme étant de bons formeurs d'hélices (Biou *et al.* 1988).

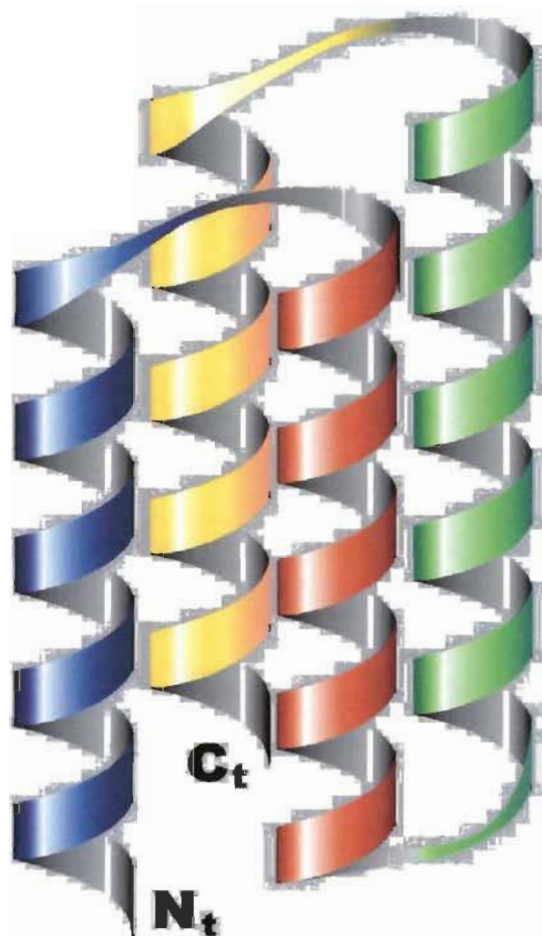


FIGURE 1.3 Le nœud d'hélices. Voici un modèle à ruban représentant une vue de côté d'un nœud d'hélices.

1.5.1.1 L'hélice- α

L'hélice- α est une des structures secondaires des protéines les plus répandues (figure 1.4), l'autre étant le feuillet bêta. Les structures secondaires sont des arrangements spatiaux spécifiques du squelette peptidique d'une protéine. Dans le nœud d'hélices, l'hélice- α est formée selon la récurrence de 7 positions des acides aminés dans la structure primaire (figure 1.5). Deux tours d'hélice se produisent à 3,5 résidus par tour avant qu'une nouvelle heptade s'ensuive. Les positions de cette heptade sont identifiées par les lettres a à g, où les positions a et d représentent des acides aminés hydrophobes, les positions b, c, et f représentent des acides aminés hydrophiles et les positions e et g sont des acides aminés qui peuvent être plus ou moins exposés à l'eau.

1.5.1.2 Le nœud d'hélices

L'assemblage des structures secondaires s'effectuant de façon à former un noyau non-polaire constitue sa structure tertiaire. Le nœud d'hélices est une structure tertiaire bien connue composée de quatre hélices (Hodges 1972). Les hélices sont connectées les unes aux autres par des segments aperiodiques, les "loops". Les chaînes latérales des positions a et d ont un rôle à jouer dans l'assemblage des hélices en carré (figure 1.5). En fait, les hélices s'uniront par leur surface hydrophobe (constituée par les chaînes latérales des positions a et d) pour former le noyau hydrophobe de la protéine. La force majeure impliquée dans cet assemblage et aussi dans le repliement de toutes les protéines globulaires solubles est désignée l'effet hydrophobe (Privalov 1979). L'effet hydrophobe est le résultat de la répulsion des molécules non-polaires par un milieu polaire comme l'eau, forçant ces molécules non-polaires à se rejoindre au centre de la protéine. Cette répulsion des régions

hydrophobes des protéines est causée par leur incapacité à s'intégrer au réseau de liens hydrogène formé par l'eau.

1.5.1.3 La séquence de MB-1

La séquence de MB-1 fut donc élaborée en tenant compte de la polarité, de la charge et du volume des résidus en fonction de leur position dans les heptades et en essayant d'y incorporer le plus de méthionines, de thréonines, de lysines et de leucines possible (les quatre AAEs désirés). Elle a été conçue pour contenir 100 acides aminés dont 57% étant des Met, des Thr, des Lys ou des Leu (Beauregard *et al.* 1995). Après que la séquence peptidique ait été optimisée, elle a été encodée sur un gène. Puis, l'expression et la purification de la protéine ont été effectuées à l'aide de la bactérie *E.coli*. La figure 1.6 montre les deux séquences, soit la séquence primaire de la protéine et la séquence nucléotidique du gène de MB-1.

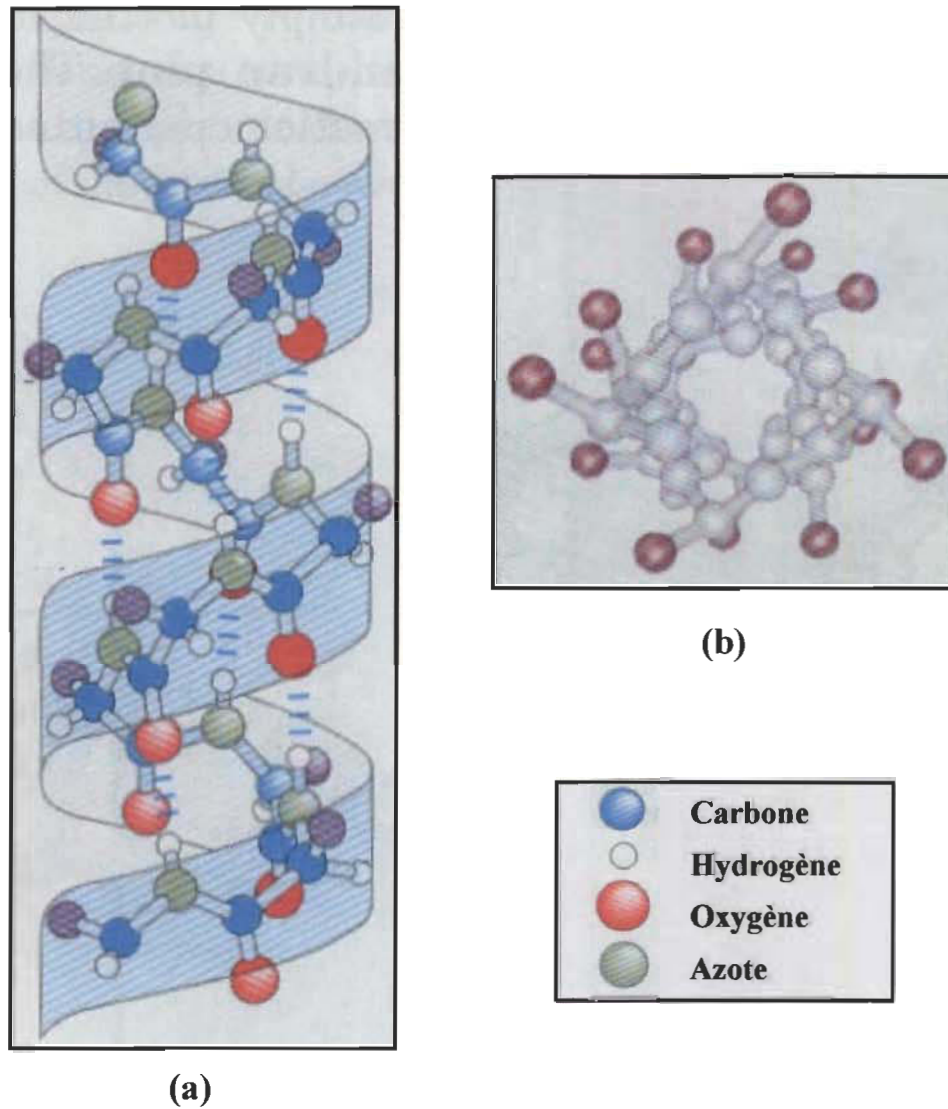


FIGURE 1.4 L'hélice α . a) Modèle en boules et bâtons d'une hélice α vu de côté. Chaque tour d'hélice contient de 3,6 résidus d'acides aminés. b) Modèle en boules et bâtons vue de haut de l'axe longitudinal. Les groupements R sont représentés par les sphères violacées.

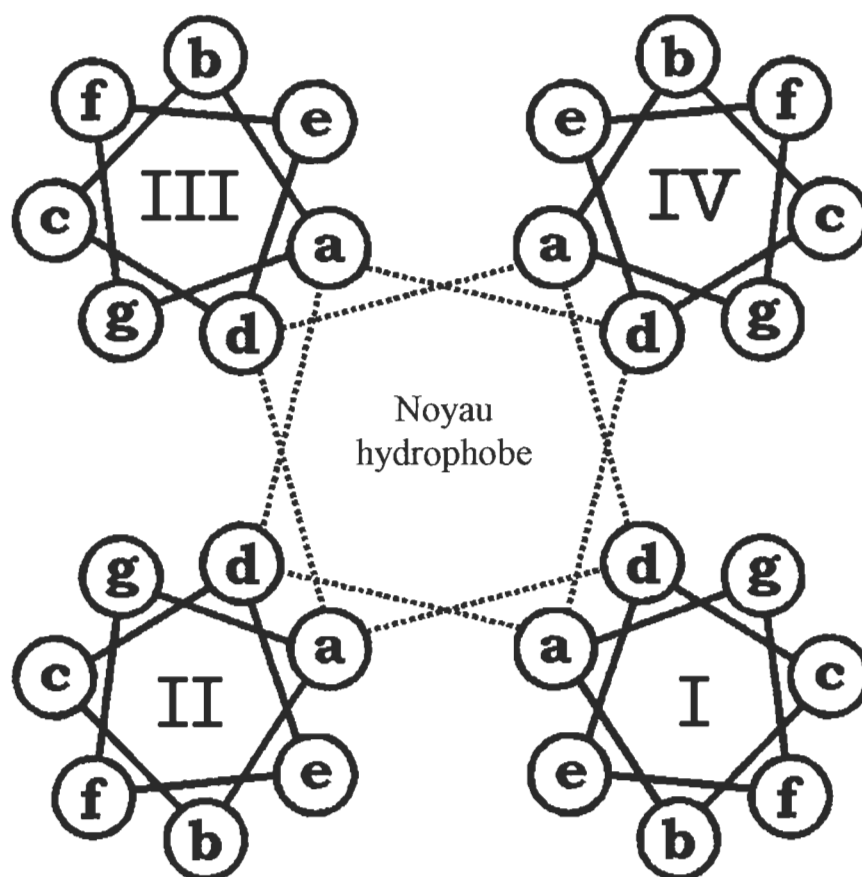


FIGURE 1.5 Le nœud d'hélices vu du dessus. Ici chacun des quatre anneaux représente une hélice. Les lettres a à g représentent les 7 positions récurrentes des hélices. Les acides aminés aux positions a et d sont majoritairement non-polaires, ce qui permet l'assemblage des hélices selon cette structure (en nœud d'hélices); le centre étant un noyau hydrophobe stabilisant.

5' - ATG GCT ACG GAA GAC ATG ACC GAC ATG ATG
 M A T E D M T D M M

 ACC ACC CTG TTT AAA ACT ATG CAG CTG TTG
 T T L F K T M Q L L

 ACC AAG TCG GAA CCC ACG GCT ATG GAC GAG
 T K S E P T A M D E

 GCC ACT AAA ACG GCT ACT ACA ATG AAG AAT
 A T K T A T T M K N

 CAT CTT CAA AAC CTG ATG CAG AAG ACT AAG
 H L Q N L M Q K T K

 AAC AAA GAA GAC ATG ACG GAC ATG GCC ACT
 N K E D M T D M A T

 ACG TAC TTC AAA ACG ATG CAG TTG TTA ACG
 T Y F K T M Q L L T

 AAG ACC GAG CCC TCG GCC ATG GAC GAG GCC
 K T E P S A M D E A

 ACG AAG ACG GCT ACA ACC ATG AAA AAT CAT
 T K T A T T M K N H

 CTG CAG AAC TTG ATG CAA AAA GGC GTA GCT
 L Q N L M Q K G V A

 TAA - 3'
 fin

FIGURE 1.6 Séquence primaire et nucléotidique de MB-1. Le gène est écrit en codons (3 nucléotides) de l'ADN, alors que la séquence en acides aminés de la protéine est écrite selon le code à une lettre (chaque acide aminé correspondant à un codon).

1.5.2 La caractérisation

Le contenu de la protéine en acides aminés et son poids ont d'abord été vérifiés. MB-1 contient bien 57% d'AAEs et pèse 11.3Kda comme prévu par le design. Les analyses de dichroïsme circulaire ont indiqué un haut pourcentage en structures secondaires hélicales (60%) et des études de quenching de fluorescence de la Tyr en position 62 ont indiqué que celle-ci était bel et bien cachée dans le noyau hydrophobe comme prévu par le design (Beauregard *et al.* 1995; MacCallum *et al.* 1997)

De plus, deux expériences indiquent que la protéine *de novo* MB-1 présente des caractéristiques similaires aux protéines natives. Premièrement, sa faible affinité pour l'ANSA, ressemble de près à celle de protéines natives et indique un noyau hydrophobe relativement compact (Beauregard *et al.* 1995; Hefford *et al.* 1999). Deuxièmement, sa dénaturation par l'urée est réversible (Beauregard *et al.* 1995).

1.5.3 Les faiblesses

Les études de caractérisation préliminaires permettent de prétendre que MB-1 possède bien les caractéristiques attendues pour un nœud d'hélices. Cependant, nous avons démontré qu'elle n'était pas suffisamment résistante aux conditions du rumen. Sa température de fusion (T_m) est de 39°C, soit la température du rumen. Cela signifie qu'à cette température, 50% de la protéine est déjà dépliée dans le rumen, la rendant ainsi susceptible à la dégradation protéolytique. En fait, après environ 30 minutes, les protéines sont entièrement dégradées par les protéases microbiennes (Grundy *et al.* 1998; MacCaluum *et al.* 1997). Il est donc impossible d'utiliser MB-1 comme supplément alimentaire, puisqu'elle n'est pas en mesure de résister à la dégradation par les micro-organismes du rumen.

Une autre faiblesse de la protéine se situe sur le plan de ses propriétés spectroscopiques. Lors du design initial de MB-1, la tyrosine en position 62 est le seul fluorophore qui a été prévu comme sonde spectroscopique. Son emplacement stratégique sur la face intérieure du nœud d'hélices permet l'étude du noyau au moyen du quenching. Cependant, la faible intensité d'émission de ce résidu aromatique causée par sa relativement faible absorption de lumière, si on le compare à d'autres fluorophores, rend la protéine difficile à retracer dans les étapes de purification et limite ou empêche complètement certaines études de caractérisation. Il serait ainsi avantageux d'avoir une meilleure sonde spectroscopique dans la protéine MB-1.

1.5.4 Stabilisation conformationnelle et protéolytique de MB-1

La stabilité d'une protéine est sa capacité à résister à un environnement perturbateur. La température, le pH, la polarité d'une solution ainsi que la présence d'agents chimiques comme l'urée ou le chlorure de guanidium sont des exemples d'éléments perturbateurs. En présence de ces agents, les protéines sont sujettes à des modifications conformationnelles. Elles passent de leur état natif à un état déplié (ou dénaturé). Le passage d'un état à l'autre est mesuré thermodynamiquement par la différence d'énergie libre (l'énergie de Gibb). Le dépliement des protéines est responsable à son tour des altérations au niveau de la fonction des protéines; par exemple en causant la perte de leur activité enzymatique ou de leur spécificité de liaison. Ainsi, la stabilité conformationnelle représente la capacité de la protéine à conserver sa structure tertiaire et, par conséquent, ses caractéristiques.

La stabilité protéolytique, quant à elle, est la résistance des protéines à leur dégradation par les protéases. Les protéases, rappelons-le sont des enzymes qui brisent les liens peptidiques des autres protéines de manière spécifique, c'est-à-dire par la reconnaissance de séquences particulières. Il est connu que la stabilité conformationnelle d'une protéine a un rôle à jouer dans sa susceptibilité aux attaques protéolytiques (Parcell et Sauer 1989). En effet, l'affaiblissement de la structure d'une protéine rend les chaînes latérales de ses acides aminés plus accessibles aux protéases, car celles-ci peuvent reconnaître des séquences qui étaient auparavant protégées.

Dans le cas de MB-1, ce n'est pas la fonction enzymatique ni la spécificité de liaison qui sont affectées par l'affaiblissement de sa structure puisqu'elle ne possède pas de propriétés semblables, mais bien sa résistance aux protéases. La protéine a ainsi de la difficulté à contourner la dégradation ruminale et devient inappropriée comme protéine nutritive. Le haut taux de dégradation protéolytique de MB-1 provient donc de ses faiblesses au niveau conformationnel; il devient alors impératif d'améliorer la structure de MB-1 afin d'augmenter sa stabilité.

La stabilité conformationnelle d'une protéine peut être améliorée de plusieurs façons. Les stratégies pour ce faire doivent tenir compte du fait que la stabilité d'une protéine dépend de la protection que lui confère sa structure aux différents agents stressants. Ainsi, une structure compacte et fermée est plus résistante. Pour améliorer le repliement d'une protéine, on peut y insérer des spécificateurs de pliement, tels des sites pouvant lier les métaux, des ponts salins et des ponts disulfures. Ces derniers, qui se retrouvent en très grand nombre dans les protéines naturelles, sont reconnus comme étant capables d'augmenter la stabilité

conformationnelle et protéolytique des protéines (Wrede *et al.* 1994; Creighton 1989; Hancock *et al.* 1992; McNabb *et al.* 1994; Spencer *et al.* 1988). La présence du lien covalent formé par un pont disulfure a pour effet de diminuer l'entropie des protéines. C'est la perte de liberté des chaînes latérales environnant le lien disulfure qui limite le dépliement des protéines aux profits de l'état natif (Betz *et al.* 1993; Zhou *et al.* 1993).¹

Cependant, l'effet hydrophobe, comme il en a été question précédemment, reste la force stabilisatrice la plus importante dans le pliage des protéines. Ainsi, un autre moyen d'augmenter la stabilité d'une protéine est d'augmenter l'effet hydrophobe impliqué dans son assemblage. Celui-ci peut être accentué en augmentant l'hydrophobicité du noyau de la protéine. Le fait que les groupements hydrophobes sont plus difficiles à hydrater aura pour effet de rendre le noyau plus difficile à déplier et ainsi plus difficile d'accès par les agents déstabilisants et par les protéases (Creighton 1997).

¹ L'insertion de ponts disulfures par mutagenèse dirigée à l'intérieur de MB-1, est déjà un sujet sous étude dans le laboratoire. Le mémoire de Maîtrise de Martin Williams, U.Q.T.R. 2000 et les prochaines publications pourront vous informer des résultats obtenus.

1.6 Les objectifs de mon mémoire

Afin d'optimiser les propriétés conformationelles et spectroscopiques de la protéine *de novo* MB-1, j'ai choisi de remplacer la Tyr 62 de la protéine par un Trp. Pour ce faire, voici les étapes que j'ai suivies et qui vous seront présentées au cours du reste du présent travail.

- Design stratégique de la mutation Trp
- Insertion du Trp par mutagenèse dirigée et expression de la protéine.
- Purification et caractérisation du mutant MB-1Trp.
- Comparaison des changements relatifs au nouveau mutant par rapport à la protéine mère (MB-1).

CHAPITRE 2

STRATÉGIE DE DESIGN DE LA MUTATION TRP 62

2.1 Choix de l'emplacement de la mutation

Comme il en a été question dans la section précédente, un des moyens servant à améliorer la stabilité d'une protéine est d'augmenter l'hydrophobicité de son noyau. En augmentant l'hydrophobicité du noyau, on rend la protéine plus compacte et on diminue l'accessibilité des résidus aux agents déstabilisants du solvant et aux protéases. L'unique façon d'augmenter l'hydrophobicité d'un noyau est de remplacer un ou des résidus d'acides aminés présents dans le noyau ou à proximité du noyau par un ou des résidus ayant un indice d'hydrophobicité plus élevé.

Afin de nous guider dans le choix de l'emplacement de la mutation de MB-1, nous avons d'abord vérifié la polarité des résidus de la protéine en fonction de leur position relative. La figure 2.1 schématise la position des acides aminés de MB-1 dans les quatre hélices selon le design. L'analyse des résidus de MB-1 nous a ainsi conduit vers la tyrosine qui possède un groupement hydroxyle. Étant donné qu'il ne peut former de lien hydrogène pour neutraliser sa polarité avec un autre résidu, ce groupement est probablement un facteur de stress sur la formation du noyau et est probablement la cause de l'instabilité rencontrée. C'est l'endroit qui a été ciblé pour procéder à la mutation.

Cependant, la tyrosine a un rôle important dans la protéine. Elle agit à titre de sonde spectroscopique; un outil essentiel dans les étapes de purification et de caractérisation de

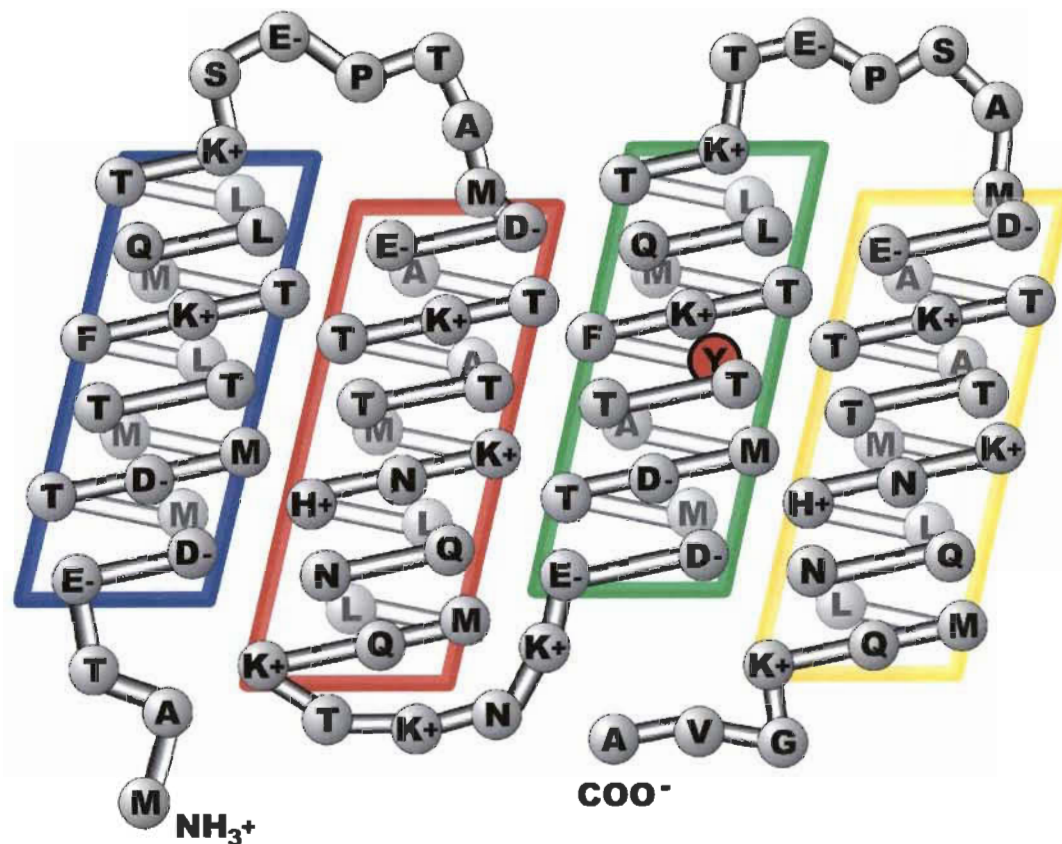


FIGURE 2.1 Structure ouverte et aplatie de MB-1. Cette représentation montre la face polaire (externe) de MB-1 (ronds avant) et sa face hydrophobe (ronds arrière). Les hélices composant la structure tertiaire sont représentées par les parallélépipèdes. Les lettres correspondent aux abréviations des acides aminés de la structure primaire de MB-1. L'emplacement de la mutation Tyr62–Trp est montré en rouge sur la face hydrophobe.

notre protéine. Le choix du nouveau résidu devra aussi tenir compte de cette particularité puisque la tyrosine est la seule sonde spectroscopique de MB-1. Les deux autres résidus naturels pouvant agir à titre de sonde spectroscopique sont la phénylalanine et le tryptophane. L'absorption de la phénylalanine n'étant pas très importante par rapport à la tyrosine, notre choix s'est donc arrêté sur la possibilité de remplacer la tyrosine par un tryptophane. L'augmentation des propriétés spectrales conférée par le tryptophane permettra de mieux suivre la protéine lors de sa purification.

2.2 Comparaison des propriétés de la tyrosine et du tryptophane

Avant de procéder à la mutation, nous avons comparé les propriétés de la tyrosine à celle du tryptophane pour s'assurer qu'un tel changement dans la séquence de la protéine n'aurait pas un effet opposé à celui recherché. Comme on peut le voir sur la figure 2.2, le Trp n'a pas ce groupement hydroxyle déstabilisant. En remplaçant la Tyr62 par un Trp, le groupement OH de la tyrosine sera éliminée du noyau de la protéine et échangé par une chaîne latérale moins polaire ce qui devrait permettre l'augmentation souhaitée des forces hydrophobes.

Plusieurs autres caractéristiques nous permettent d'avancer que la mutation devrait avoir un impact positif sur la stabilité de la protéine. Le tryptophane est plus hydrophobe que la tyrosine (Chothia 1984; Ragone *et al.* 1989), il a un volume similaire quoique légèrement plus gros (Ragone *et al.* 1989) et il a un effet comparable sur la formation de structures secondaires (Koehl et Levitt 1999). Il peut de plus être utilisé comme sonde spectroscopique. Il est même plus performant que la tyrosine dans ce rôle (Engelhard et Evans 1996; Eftink 1991; Eftink 1994). Le tableau 2.1 résume les comparaisons importantes entre les deux acides aminés.

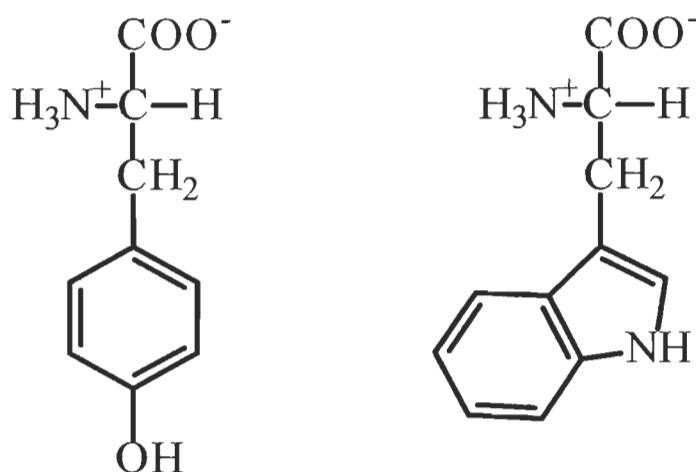
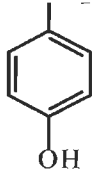
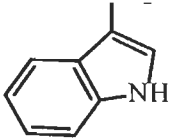


FIGURE 2.2 Tyrosine vs tryptophane. En remplaçant la Tyr62 par un Trp, le groupement OH sera éliminé du noyau de la protéine et échangé par une chaîne latérale moins polaire ce qui devrait permettre une amélioration de la stabilité de la protéine due à l'augmentation des forces hydrophobes.

TABLEAU 2.1

Comparaison des propriétés de la tyrosine et du tryptophane

	Tyr	Trp
Chaîne latérale		
Hydrophobicité * , **	13,42	13,93
Volume (Å³) **	203,6	237,6
Propension d'hélices ***	Moyenne	Moyenne
Sonde spectroscopique ****	Bonne	Excellente

* Chothia 1984

** Ragone *et al.* 1989

*** Koehl et Levitt 1999

**** Engelhard et Evans 1996; Eftink 1991; Eftink 1994

Le seul élément qui pourrait rester matière à interrogations sur l'efficacité de la mutation Tyr62 - Trp reste la différence de volume entre les deux molécules. En effet, on constate une différence de 34 Å³ en surplus pour la chaîne latérale du tryptophane. L'emplacement d'une grosse chaîne latérale dans un noyau hydrophobe peut avoir comme conséquence un encombrement stérique et ainsi mener à la déstabilisation du noyau. Cependant, l'environnement de la tyrosine dans le noyau avait déjà été conçu pour une grosse chaîne latérale. Des petits résidus d'alanine avaient été positionnés aux alentours de la tyrosine afin de lui laisser une place dans le noyau. La figure 2.3 présente un schéma de la vue transversale des quatre hélices de MB-1 au niveau de la mutation. On voit dans cette représentation qu'il y a bien un espace disponible pour l'insertion d'une grosse chaîne latérale dans l'hélice III. Ainsi, même si la chaîne latérale du tryptophane est plus volumineuse que celle de la tyrosine, le fait qu'on ait déjà pensé, lors du design initial de la protéine, à laisser un espace pour l'emplacement d'une grosse chaîne latérale comme celle de la tyrosine nous permet de supposer que le tryptophane sera accepté à l'intérieur du noyau.

Le remplacement de la Tyr du cœur hydrophobe de MB-1 par un Trp devait donc avoir pour effet de diminuer la polarité du noyau. Cela devrait augmenter la stabilité conformationnelle de MB-1 et ainsi la rendre plus résistante aux conditions du rumen. En plus d'améliorer la résistance de la protéine, cette mutation apporte une meilleure sonde à MB-1. En augmentant ainsi sa capacité d'absorption, MB-1 aura un plus grand éventail d'options pour sa caractérisation. Après la mutation, il ne restera qu'à exprimer la nouvelle protéine et à étudier l'effet de la mutation sur sa stabilité et sa conformation. Le chapitre qui suit correspond à l'article scientifique qui résume l'ensemble de ces expériences et leurs résultats.

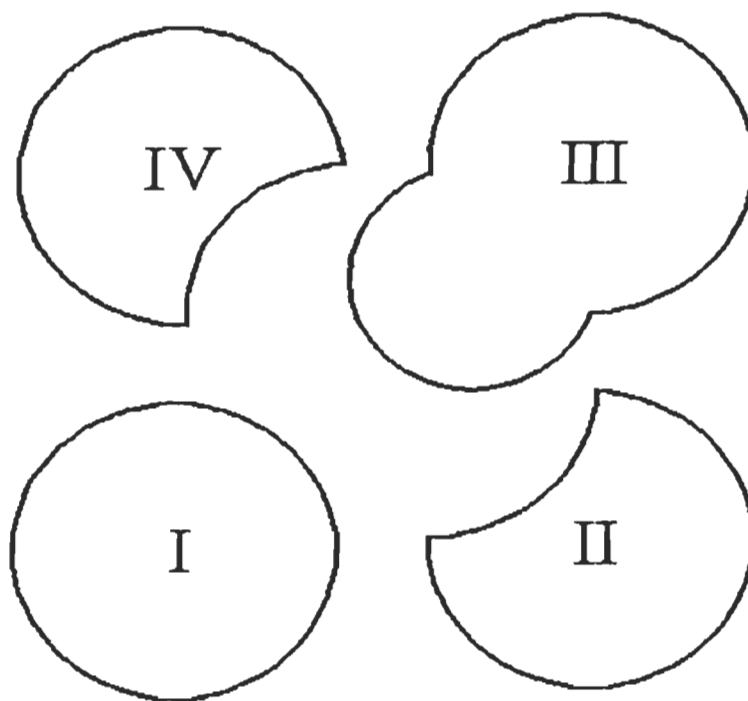


FIGURE 2.3 Vue transversale des quatre hélices de MB-1 au niveau de la mutation. Cette représentation caricaturale montre l'espace disponible pour l'insertion d'une grosse chaîne latérale dans l'hélice III en position 62. Les hélices II et IV contiennent des petits résidus à ce niveau soit les alanines A35 (hélice II) et A84 (hélice IV) tous deux en position "a".

CHAPITRE 3

ARTICLE SCIENTIFIQUE

**Replacement of Tyr62 by Trp in the designer protein Milk Bundle-1
results in significant improvement of conformational stability**

M.C. Gagnon, M. Williams, A. Doucet, M. Beauregard

FEBS Letters 484 (2000) 144-148

3.1 Préface

L'article qui suit décrit les recherches que j'ai effectuées durant ma maîtrise. Le design et les protocoles de création, de purification et de caractérisation du mutant MB-1Trp y sont décrits. Les méthodes biophysiques utilisées pour la caractérisation de la protéine améliorée sont le dichroïsme circulaire et la fluorospectroscopie. Une étude de dégradation protéolytique a aussi été effectuée afin de prédire la résistance de la nouvelle protéine aux conditions du rumen.

La spectropolarimétrie a permis de confirmer que les structures secondaires du mutant étaient semblables à la structure en hélices de MB-1. Les études de fluorescence ont quant à elles permis de vérifier que la mutation permettait une augmentation de l'intensité de fluorescence de MB-1, le Trp lui conférant une sonde spectroscopique plus efficace que la Tyr. Elles ont aussi permis de vérifier la structure tertiaire de la protéine. La fluorescence du Trp, étant un indice de son emplacement dans la protéine pliée, et la fluorescence de l'ANSA, un indice de la compacité du noyau hydrophobe, démontrent que la stratégie de design de MB-1Trp et que le design initial de MB-1 étaient bien conçus. Ces résultats indiquent que le Trp se situe bel et bien à l'intérieur de la protéine comme prévu par le concept théorique.

La stabilité de la protéine MB-1Trp a été éprouvée par des expériences de dénaturation thermique mesurées par dichroïsme circulaire et par des expériences de dégradation protéolytique effectuées à l'aide de la Pronase E, un mélange de protéases utilisé comme modèle pour étudier la résistance aux protéases présentes chez les ruminants.

Les résultats des études de caractérisation du mutant sont naturellement comparés à ceux existant pour la protéine mère. Il est important de mentionner que la mutation a eu l'effet escompté au niveau de l'amélioration spectroscopique de la protéine et que l'effet qu'elle a eu sur la stabilité de MB-1 est exceptionnel. Cela facilitera les études futures de caractérisation de MB-1, dont la diffraction à rayons X, en rendant maintenant possible sa cristallisation. En effet, la protéine étant plus stable, elle se dégrade moins rapidement. De plus, à la température de la pièce, MB-1Trp se retrouvera à l'état natif, tandis qu'une certaine portion de MB-1 devrait être dépliée. Ces deux avantages de MB-1Trp devraient permettre une meilleure croissance des cristaux.

Dans la discussion, l'impact de la mutation sur la protéine MB-1 est examiné et comparé à des expériences publiées précédemment par d'autres chercheurs. Finalement, l'applicabilité de MB-1Trp en vue de son utilisation dans la nutrition à valeur ajoutée pour les ruminants est discutée.

3.2 L'article

Replacement of Tyr-62 by Trp in the designer protein Milk Bundle-1 results in significant improvement of conformational stability.

Gagnon, M. C., Williams, M., Doucet, A. and Beauregard, M.*

Groupe de recherche en énergie et information biomoléculaire, Département de chimie-biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, CP 500, Trois-Rivières, Québec, G9A 5H7, Canada.

Abstract: Protein design is currently used for the creation of new proteins with desirable traits. In our lab, we focus on the synthesis of proteins with high essential amino acid content, having potential application in animal nutrition. One of the limitations we face in this endeavour is the achievement of stable proteins in spite of a highly biased amino acid contents. We report here the synthesis and characterisation of MB-1Trp, a protein with a tailored content in selected essential amino acids. The protein is a Tyr62-Trp mutant of the parent molecule MB-1 described earlier. The new protein is largely helical as per design, is well folded, and has a melting temperature of 55 °C. Its resistance to proteolytic degradation compares to that of cytochrome c, a protein of similar size. Design strategy used for MB-1Trp is discussed with regards to its applicability toward the creation of efficient nutritional proteins.

Keywords: Protein design, mutagenesis, conformational stability, tryptophan, protein fluorescence, hydrophobicity.

*Corresponding author. Telephone: +1(819)376-5052; Facsimile: +1(819)376-5084; email: marc_beauregard@uqtr.quebec.ca

Abbreviations:

ANSA: 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid; BCA: bicinchoninic acid; CD: circular dichroism; EAA: essential amino acids; EDTA: ethylenediaminetetraacetate; EGTA: ethylene glycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetate; IPTG: isopropylthio- β -D-galactoside; MB-1: Milk-Bundle-1; MBP: maltose binding protein; MWCO: molecular weight cut off; PMSF: phenylmethylsulfonylfluoride.

3.1.1 Introduction

De novo design of artificial proteins has been an emerging area of research that tests our understanding of protein structure and allows the creation of macromolecules with desirable and specific structures and properties. The property that we (and other groups) have chosen is the nutritional quality of protein, in view of its importance for animal production and human health [1-5].

In our lab, we have been interested in nutritional value, focusing on proteins with an EAA profile tailored for dairy animal production. Our first *de novo* designed protein, Milk Bundle-1 (MB-1), has been reported earlier [1]. Characterisation of MB-1 indicated that the design process used resulted in the stable expression of a new, largely helical protein enriched in the selected essential amino acids (60% in Met, Thr, Lys and Leu). After a first round of design, the protein MB-1 was found to have a folded core and low affinity for 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid (ANSA) [4]. Its behaviour and expression levels *in vivo* were found to be far superior to earlier attempts in the area of high essential amino acid polypeptide design [6].

Investigation of MB-1's properties did reveal some flaws, however. The proteins appear to associate into dimers that could dissociate into monomers in the presence of a high salt concentration [4]. Its melting temperature was found to be very low (39°C), and its resistance to proteases at a physiological temperature was also found to be limited, a possible consequence of partial unfolding [6]. As a consequence of these weaknesses, efforts in growing crystals were unsuccessful [7].

In order to improve MB-1's folding and resistance to degradation, strategies for a new cycle of design were considered. One possible modification involved the sole Tyr in position 62, predicted to be buried in the hydrophobic core. This spectral probe has been useful on two counts: it permitted the confirmation of protein purity using fluorescence, and it has been used as a conformational probe, as it was indeed buried as planned [6]. Burial of a hydroxyl group in the core is a potential source of destabilisation, however, and may have contributed to MB-1's poor behaviour in terms of stability [6]. Replacement of Tyr62 by Trp should provide increased hydrophobicity to the protein core, and would maintain, if not expand, the useful spectroscopic properties of the side-chain in position 62. In this paper we report the substitution of Tyr62 by Trp and the impact of this mutation on a number of structural features, including thermostability.

3.2.2 Materials and Methods

3.2.2.1 Preparation of MB-1Trp mutant

Substitution of the Tyr in position 62 by a Trp was performed using the oligo-directed mutagenesis kit « Altered Sites® II» (Promega). The mutational oligonucleotide Tyr62-Trp (shown below with the corresponding MB-1 sequences) was purchased from GibcoBRL/Life Technologies, purified using denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and phosphorylated.

MB-1: 5'-ATG GCC ACT ACG TAC TTC AAA ACG ATG-3'

Tyr62Trp: 5'-ATG GCC ACT ACG TGG TTC AAA ACG ATG-3'

The mutation was then confirmed by dideoxynucleotide sequencing using T7 Sequenase kit (Amersham Life Science). The mutated MB-1 gene were cloned back in the pCMG20 4-X expression vector [1] and positive clones were checked again by DNA sequencing.

3.2.2.2 Protein expression and purification

Bacteria carrying the mutant vectors were grown at 37°C, 300RPM in 1 L of LB Miller medium (Difco) to an O.D. of 0.4. Transcription was induced using 1 mM isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG) for 3 hours. The cells were then harvested by centrifugation at 3,000 x g. The purification procedure was essentially as described in Beauregard *et al.* 1995 with minor modifications. Precipitated cells were resuspended in ice-cold column buffer (10 mM Tris, 200 mM NaCl, 10 mM ethylenediamine-tetraacetate (EDTA), 1 mM sodium azide (NaN₃), pH 7.4).

phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), ethylene glycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetate (EGTA), benzamidinium-hydrochloride and benzamide were added to a final concentration of 0.1, 10, 2 and 2 mM, respectively. Cells were then lysed by ten 30-sec sonication pulses using a Branson Sonifier 250 at 60% output control. The sonicate was centrifuged at 11,500 x g for 30 minutes at 4°C.

The supernatant was then loaded onto a 15 mL amylose column. The maltose binding protein fused with MB-1Trp (MBP-MB-1Trp) was eluted by washing the column with column buffer containing 10 mM maltose (elution buffer). Pooled peak fractions were placed in dialysis tubing (Spectra/Por; MWCO 3,500 Da) with 50 μ L factor Xa per 10 mL fusion protein. The bag was placed in 20 mM Tris, 100 mM NaCl, 3 mM CaCl_2 (cleavage buffer) overnight at 4°C. The following morning, the bag was transferred to 10mM Tris - 1mM EDTA (TE) buffer, pH 8.0. After a 2-hour dialysis, the sample was applied to DEAE-Sepharose equilibrated in TE buffer, pH 8.0 (Fast Flow; Pharmacia) and washed with the same buffer. MB-1Trp was collected as the flow-through. The different fractions were analysed for protein content by the bicinchoninic acid (BCA) assay and the positive fractions were pooled and concentrated using BIOMAX-5K concentrators (Millipore). Protein samples were prepared in a borate-phosphate buffer (55 mM NaH_2PO_4 , 35mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH 6.8) and dialysed overnight against this buffer prior to measurements. Protein concentration was adjusted to 0.4 mg/mL unless specified otherwise.

3.2.2.3 *Protein quantification and electrophoresis*

Protein concentration was determined by the BCA assay (Sigma), using bovine serum albumin as the standard. The protein was visualised by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 12% polyacrylamide-tricine gels, followed by silver nitrate staining. SDS-PAGE experiments were conducted prior to measurements to confirm protein purity.

3.2.2.4 *Conformational investigation by circular dichroism (CD)*

Protein samples were degassed for 20 minutes at 20°C before measurements. Spectra were measured with a Jasco J-720 spectropolarimeter, which was routinely calibrated with a 0.06% (W/V) ammonium (+)-10-camphorsulfonate solution. For measurements in the far-UV region a quartz cell with a path length of 0.01 cm was used. Ten scans were accumulated at a scan speed of 20 nm per minute, with data being collected at every nm from 180 to 260 nm. Sample temperature was maintained at 20°C using a Neslab RTE-111 circulating water bath connected to the water-jacketed quartz cuvettes. Spectra were corrected for buffer signal and conversion to $\Delta\epsilon$ (on the basis of amide bond concentration) was performed with the Jasco Standard Analysis software. Secondary structure calculations were performed using the CDSstr program developed [8], using default settings.

3.2.2.5 *Thermal denaturation*

Samples were prepared as described in the preceding section. In order to measure thermostability, temperature was increased from 15 to 85 ° at a rate of 30 °C per hour using a Neslab RTE-11 controlled by the Jasco spectropolarimeter software. CD spectra were

collected at every 5°C, from 200 to 260 nm, at a scan speed of 20 nm/min. In order to assess reversibility of thermal denaturation, the protein solutions were cooled down at a rate of 30°C per hour, and spectra were measured at 70, 50 and 20 °C.

Thermal stability was calculated assuming a unimolecular, two-state process as previously described [9]. The $\Delta\epsilon_{MRW}$ at 222 nm measured at various temperature was used as the property (y) indicative of the extent of unfolding. In the folded state, the parameter $y = y_f$ and the fraction of folded protein f_f is equal to 1. When the protein is unfolded, the parameter $y = y_u$, and the fraction of unfolded protein f_u is equal to 1. For intermediate states, y is given by $y_f f_f + y_u f_u$. Thus, by measuring y , we can calculate the fraction of protein unfolded: $f_u = (y_f - y)/(y_f - y_u)$. The equilibrium constant for the unfolding process is $K_u = f_u/(1-f_u)$ and melting temperatures (T_m) are obtained at $K_u=1$ [9].

3.2.2.6 ANSA fluorescence enhancement

Protein concentration was adjusted to 0.1 mg/mL in B/P pH 6.8 and equilibrated at room temperature (RT) for 1 hour. Then ANSA was added to a final concentration of 10 μ M and equilibrated 5 minutes prior to measurements. Spectra were recorded using an LS50-B Perkin-Elmer fluorometer with an excitation wavelength of 380 nm. Spectra were collected from 410 to 550 nm. Correction for buffer signal on ANSA was keyed in when applicable.

3.2.2.7 Intrinsic fluorescence measurements

Protein concentration of samples was adjusted to 0.1 mg/mL and equilibrated at room temperature (RT) for 1 hour. For chemical denaturation, Urea (Sigma U-5378) was added to a final concentration of 8M and equilibrated at RT 5 minutes before measurement. For

thermal denaturation, temperature was increased to 85°C at a rate of 15°C per hour using Neslab RTE-11. Spectra were recorded using an L550-B Perkin-Elmer fluorometer with an excitation wavelength of 280nm. Spectra were then corrected for buffer signal before analysis.

3.2.2.8 Size-exclusion chromatography/estimation of molecular size

Protein samples were adjusted to a concentration of 0.6 mg/mL and loaded onto a Beckmann Ultraspherogel SEC-2000 column hooked to a Waters 510 HPLC. The column was standardized with the Pharmacia Low Molecular Weight gel filtration calibration standards prepared in the same buffer.

3.2.2.9 Proteolytic Degradation measurements

Experiments were carried out as described by Krisnamoorthy et al. 1983 [10]; with few modifications as described in Morrison et al. [11], in press. Reactions were stopped by the addition of 2% SDS buffer followed by heating for 3 minutes at 100°C. Samples were then analysed on SDS-PAGE followed by silver nitrate staining. The amount of protein remaining after incubation with proteases was determined by measuring the optical density of each band using the image analysis system Imaging Research MCID. Cytochrome c from horse heart (Sigma C-7752) was used as a reference protein for all degradation runs in order to correct for possible variations in crude proteolytic activity.

3.2.3 Results

Position 62 in MB-1 was chosen for the emplacement of a spectroscopic probe at the moment of initial design [1]. As shown on the model in Figure 3.1, this position is part of the hydrophobic core, and a niche made of 5 Ala was built around it in order to accommodate a larger side chain in this region of the core. Substitution of Tyr62 for Trp was performed on MB-1 by site-directed mutagenesis and confirmed by DNA sequencing and fluorospectroscopy (not shown); then the mutant, named MB-1Trp, was characterized. First, circular dichroism (CD) measurements were performed and spectra typical of helical proteins were obtained (Figure 3.2). Using CDsstr algorithm [8], 50% of amide groups were predicted to be in a helical environment. Thus, the secondary structures of the mutant MB-1Trp were found to be similar to the parent molecule MB-1.

The formation of a tertiary structure in the mutant was confirmed by fluorescence measurements: the folded protein fluorescence peaked at 333 nm, and its emission shifted to approximately 345 nm when unfolded using heat or urea (Figure 3.3). The Trp side chain appears to be protected in the folded protein, and exposed to solvent upon unfolding, as predicted by design. Similar shifts in fluorescence λ_{\max} were observed for another designer protein ($\alpha 4$) after insertion of a Trp side chain [12].

Results from fluorescence measurements using the probe ANSA are shown in Figure 3.4. The enhancement of ANSA emission by the protein was limited to a factor of 3, which is comparable to the parent molecule [4], and lower than the values expected for poorly folded proteins [13]. These results suggest that MB-1Trp is rather well folded, and not in a molten globule. Size-exclusion chromatography analysis revealed that MB-1Trp migrated as a 12

kDa protein, closed to the expected size of an MB-1Trp monomer. Substitution of Trp in position 62 appears to correct one weakness of the initial design of MB-1, which had a size approaching that of a dimer [4].

The impact of the substitution in position 62 on conformational stability was verified using two different approaches. First, the CD signal at 222 nm was recorded at various temperatures in order to monitor unfolding of MB-1Trp helices. The denaturation of MB-1Trp (Figure 3.5) indicated a melting temperature of 55°C, a significant improvement over MB-1 (melting temperature of 39°C) and other mutants characterised so far [6, Hefford and Beauregard, in preparation]. The thermal denaturation was found to be fully reversible, another improvement over MB-1, but the transition was spread over a wide temperature range (30°C to 65°C). However, this apparent lack of cooperativity in MB-1Trp thermal unfolding also characterized MB-1 and other small designer proteins [6,12].

Stabilization of MB-1 fold by the mutation was also confirmed by proteolytic degradation experiments. Degradation curves shown in Figure 3.6 clearly demonstrate a gain in resistance to proteolytic attack. Under our standard conditions, MB-1Trp was twice as resistant as MB-1, and behaved like a natural protein of similar size (cytochrome c).

3.2.4 Discussion

Trp and Tyr residues are comparable on various counts: they have large aromatic side chains, they undergo a limited but similar loss of conformational entropy upon protein folding; and they have similar secondary propensities [14,15]. They differ in their hydrophobicities however, due to the presence of a hydroxyl group in p position on the phenyl moiety. When such a polar group is involved in a hydrogen bond, the difference between Trp and Tyr hydrophobicity decreases [14], but in MB-1, no such H-bonding partner was properly positioned while designing the protein. Most results shown here indicate that the increase in hydrophobicity in position 62, due to the removal of tyrosine's hydroxyl group from the core, led to an important improvement of MB-1 fold stability. The important impact of a Tyr-Trp mutation observed here is not totally unexpected: Honda *et al.*[16] observed a significant drop in T_m values for the chitosanase from *Streptomyces* sp. N174 upon removal of Trp residues. This may be explained by tryptophan's ability to make extensive van der Waals contacts with neighboring residues due to its large size, in addition to its contribution to the hydrophobic effect. The improvement of MB-1 properties also included the specification of a monomeric organisation. A full understanding of such a correction to this design weakness await further investigations though.

Trp and Tyr both belong to the class of large side chains, but Trp is significantly larger than Tyr, with an additional 34 cubic Angstroms [16,17]. The original design strategy allowed for a Tyr in position 62, but not for Trp, which would result in a layer volume that would be above average for natural bundles. The results shown here all indicate that MB-1 secondary and tertiary structures were not disturbed by the substitution Tyr62-Trp. The protein is helical and well folded and it appears that the niche around position 62 readily

accommodates the larger side chain of Trp. The mutation resulted in an important improvement in the protein stability. In a comparable designer protein where the intended location of a Trp was not engineered in a way as to accommodate an increase in bulk, the mutation actually destabilised the protein [12].

Our results suggest that while Trp stabilised MB-1 fold, it may not be as buried as Tyr was in MB-1: its fluorescence lambda max is at 333 nm, and not near 325 nm as observed for fully protected Trp. Similar results obtained by Handel *et al.* [12] on a similar designer protein may indicate that Trp cannot be buried completely in a core as small as the one involved here.

The gain in conformational stability afforded by the Tyr62-Trp mutation is of paramount importance for future advances in the development of MB-1 family of proteins. What we achieved here by a single point mutation is the conversion of a low stability protein into a protein that is now folded at physiological temperature. Its high resistance to proteases could permit the production of this high quality protein by transgenic crops to be used in animal production. A comparison of previously reported analyses of plant protein degradability indicates that MB-1Trp compares to sunflower 2S seed albumin 8 protein, a protein with a high methionine content intended for production of transgenic crops with enhanced nutritional quality [18]. Note that the EAA profile of SFA8 is not optimised for lactating cows needs, while MB-1Trp is, due to its balanced content of methionine, lysine and threonine. This comparison indicates that although few cycles of design may be required, our design approach produced a high quality protein that competes with natural proteins at the level of stability.

A number of MB-1 mutants have been designed and characterised so far. The design strategy was based on the assumption that MB-1 folded as an alpha-helical bundle, as shown in Figure 3.1. Most mutants, including MB-1Trp, behaved as helical and folded protein [7, 19], Williams *et al.* in preparation]. These results, (and results from investigations of MB-1 structure using a number of low resolution techniques) all indicate that the designer protein MB-1 is approximately folded as planned. Nevertheless, no detailed structure (NMR or x-ray) is available for the designer protein MB-1 as of yet, since our efforts have been hampered by lack of solubility and stability in solution [7]. The mutant presented here clearly outperforms the parent molecule on several counts, including the ability to stay monomeric under conditions used here, and to resist degradation in solution. Crystallization experiments are under way and it is hoped that solving MB-1Trp structure will permit a critical evaluation of the design strategy used for MB-1.

Acknowledgments: This work was funded by grants from Dairy Farmers of Canada and from the Natural Sciences and Engineering Council of Canada. A.D. acknowledges a scholarship from the FCAR.

3.2.5 References:

- [1] Beauregard,M., Dupont,C., Teather,R.M. and Hefford,M.A. (1995) *Biotechnology*, 13, 974-981.
- [2] Jaynes,J., Langridge,P., Anderson,K., Bond,C., Sands,D., Newman,C.W. and Newman,R. (1985) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21, 200-205.
- [3] Dyer,J.M., Nelson,J.W. and Murai N. (1993) *J. Protein Chem.*, 12, 545-560.
- [4] Hefford,M.A., Dupont,C., MacCallum,J., Parker,M.H. and Beauregard,M. (1999) *European J. Biochem.*, 262, 467-474.
- [5] Williamson,M. (1996) *Trends Biotechnol.*, 14, 449-450.
- [6] MacCallum,J.D., Hefford,M.A., Omar,S. and Beauregard,M. (1997) *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 66, 83-93.
- [7] Grundy,J.E., Morrison,J.J., MacCallum,J.D., Wirtanen,L. and Beauregard, M. (1998) *J. Biotechnol.*, 63, 9-15.
- [8] Johnson,W.C. (1999) *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 35, 307-312.
- [9] Pace,C.N., Shirley,B.A. and Thomson,J.A. (1989) In Creighton,T.E. (ed), *Protein structure, a practical approach*. IRL press, Oxford, pp. 311-337.
- [10] Krishnamoorthy,U., Sniffen,C.J., Stern,M.D. and Van Soest,P.J. (1983) *Brit. J. Nutr.*, 50, 555-568.
- [11] Morrison, J.J., McNally, D., Navidzadeh, A. and Beauregard, M. (2000) *Appl. Biochem. Biotech.* (in press).
- [12] Handel, T.M., Williams, S.A., Menyhard, D., and DeGrado, W.F. (1993) *J. Am.Chem. Soc.* 115, 4457-4460.
- [13] Semisotnov, G.V., Rodionova, N.A., Razgulyaev, O.I., Uversky, V.N., Gripas, A.F., and Gilmanshin, R.I. (1991) *Biopolymers* 31, 119-128.
- [14] Doig, A.J., and Sternberg, J.E. (1995) *Prot. Science* 11, 2247-2251.
- [15] Koel, P., and Levitt, M. (1999) *PNAS* 96, 12524-12528.
- [16] Honda, Y., Fukamizo, T, Okajima, T., Goto, S., Boucher, I., and Brzezinski, R. (1999) *Biochem. Biophys. Acta* 1429, 365-376.

- [17] Ragone, R., Facchiano, A. Facchiano, A.M. and Colonna, G. (1989) *Prot. Eng.* 2, 497-504.
- [18] McNabb, W.C., Spencer, D. and Higgins, T.J. (1994) *J. Sci. Food Agric.* 64, 53-59.
- [19] Parker, M.H., and Hefford, M.A. (1998) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 28, 69-76.

3.2.6 Figures legends

Fig. 3.1 MB-1's hydrophobic core as predicted by design. The intended structure is a four-helix bundle, with residue polarity distributed along the canonical heptad pattern. The pictogram shows only the interior of the bundle after “opening” and “flattening”, each box representing the non-polar face of a helix. Note that the large Tyr in position 62 is surrounded by 5 small alanine residues.

Fig. 3.2 Circular dichroism spectra of MB-1Trp. A 50% helical content was predicted from such spectra as described in Methods.

Fig. 3.3 Unfolding of MB-1Trp as monitored by fluorospectroscopy. Spectra were obtained for MB-1Trp at 20 ° (curve 1), after thermal denaturation at 85°C (curve 2) and after urea denaturation (curve 3).

Fig. 3.4 Enhancement of ANSA fluorescence by MB-1Trp. Spectra collected with 10 μ M ANSA alone (bottom curve) and ANSA with MB-1Trp (top curve). When exposed to the mutant protein, ANSA fluorescence shifts from 510 to 480 nm, and its fluorescence intensity at 480nm increases by a factor of 3, as a result of binding to hydrophobic clusters in folded MB-1Trp.

Fig. 3.5 Thermal denaturation curve for MB-1Trp. $\Delta\epsilon$ was measured at 222nm as described in Materials and Methods.

Fig. 3.6 Degradation of MB-1 and MB-1Trp mutant using Pronase E. MB-1 resistance to proteolytic degradation (open circles) is increased by the insertion of a Trp instead of the Tyr at position 62 (open square). MB-1Trp's resistance to proteolytic degradation compared to that of cytochrome c, a natural protein of similar size that is used as an internal standard for such measurements.

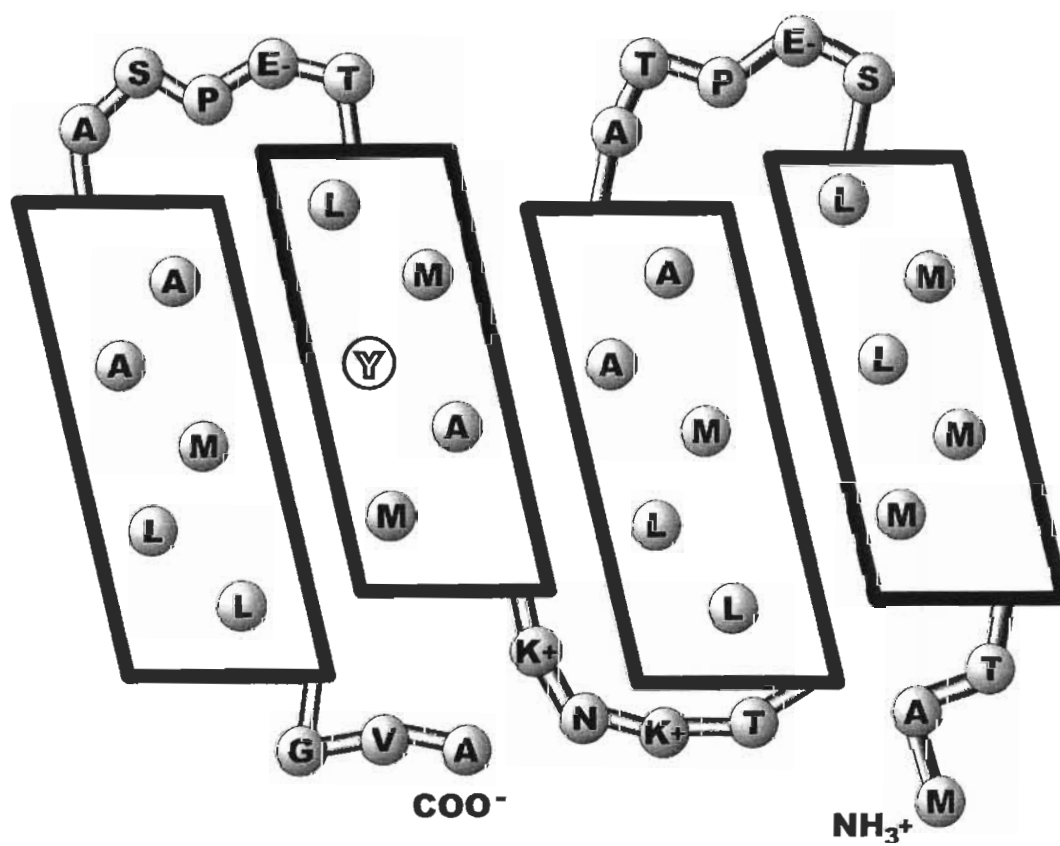
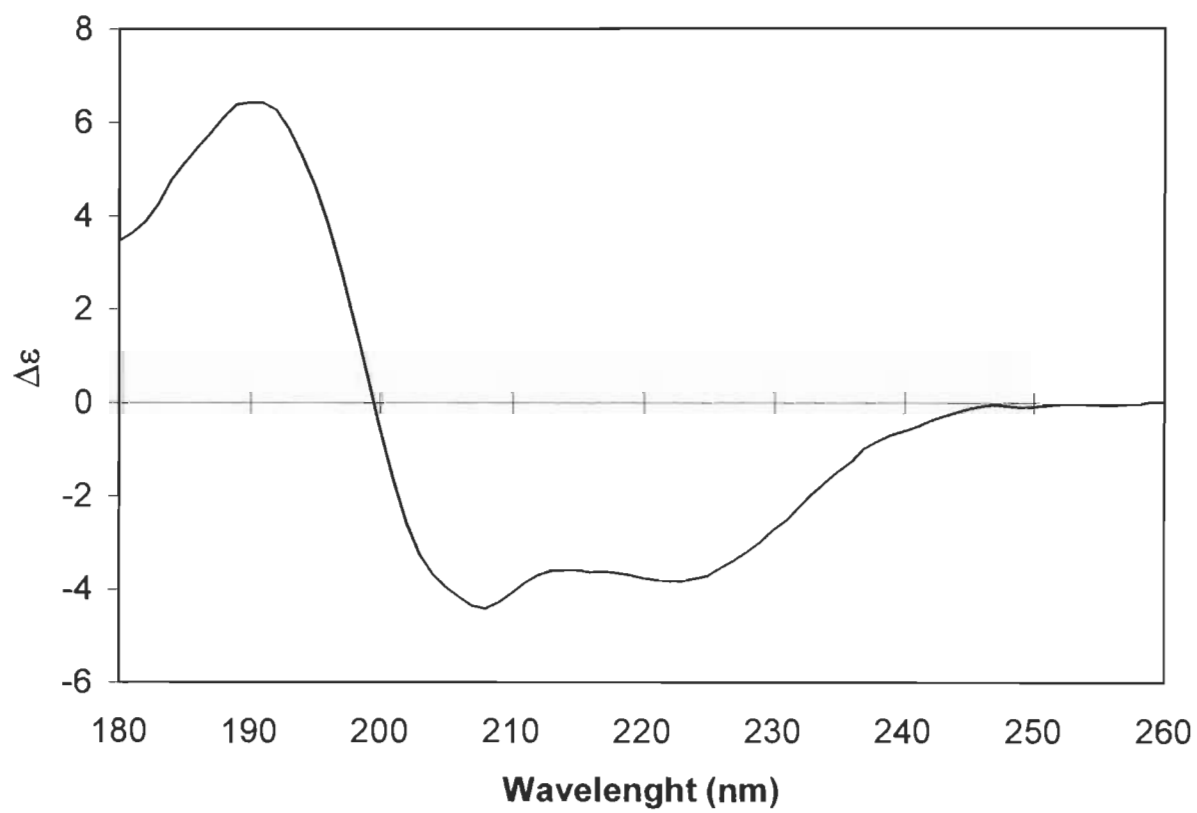
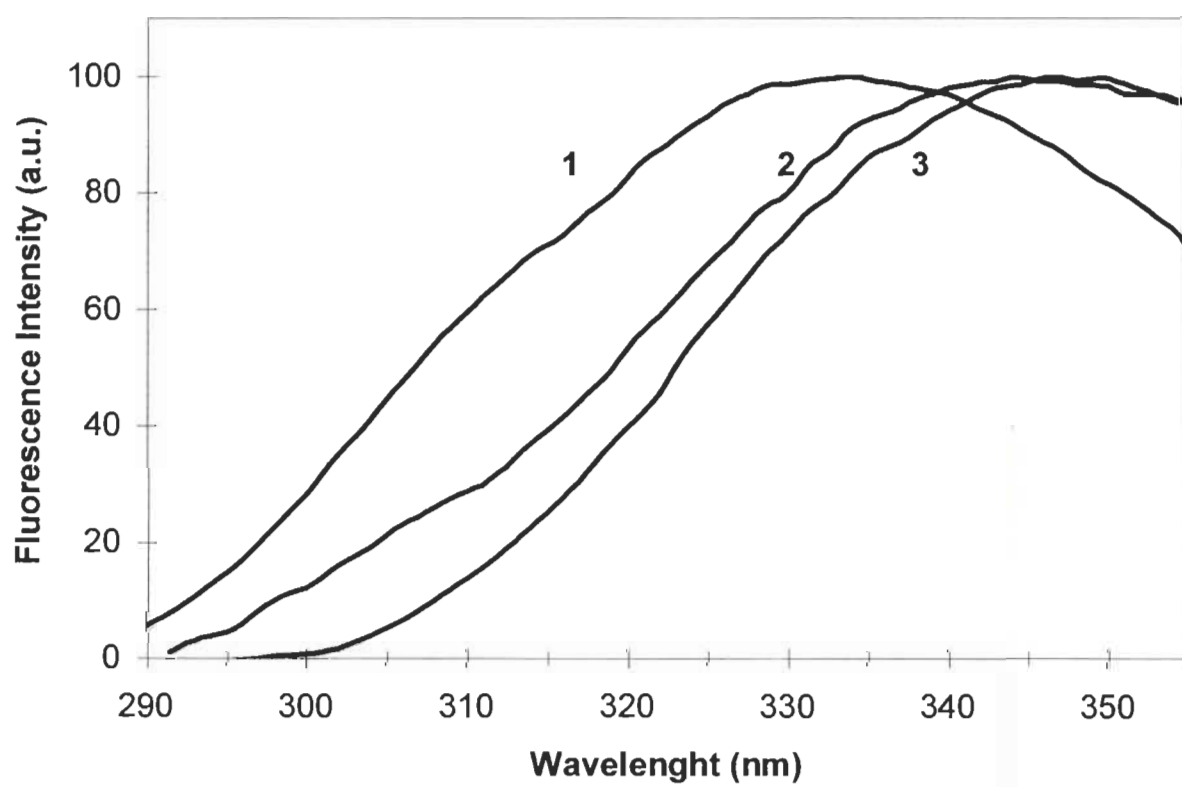
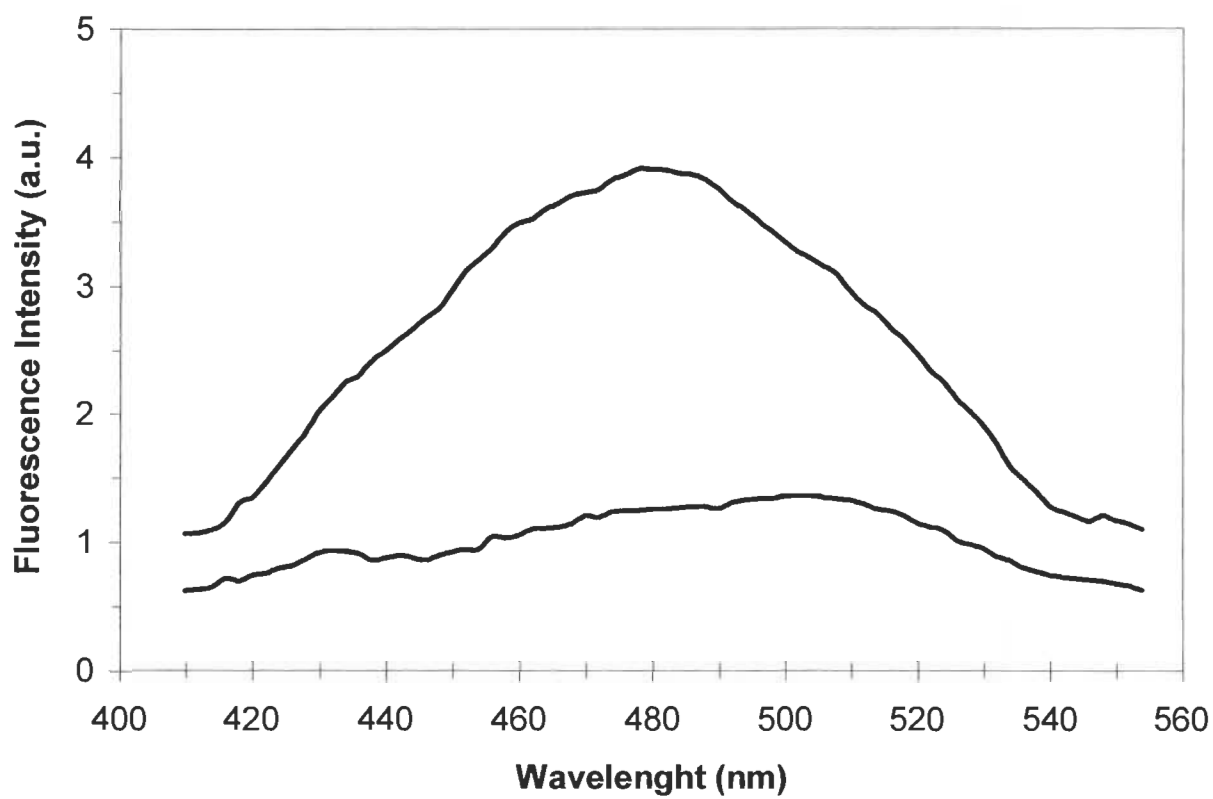
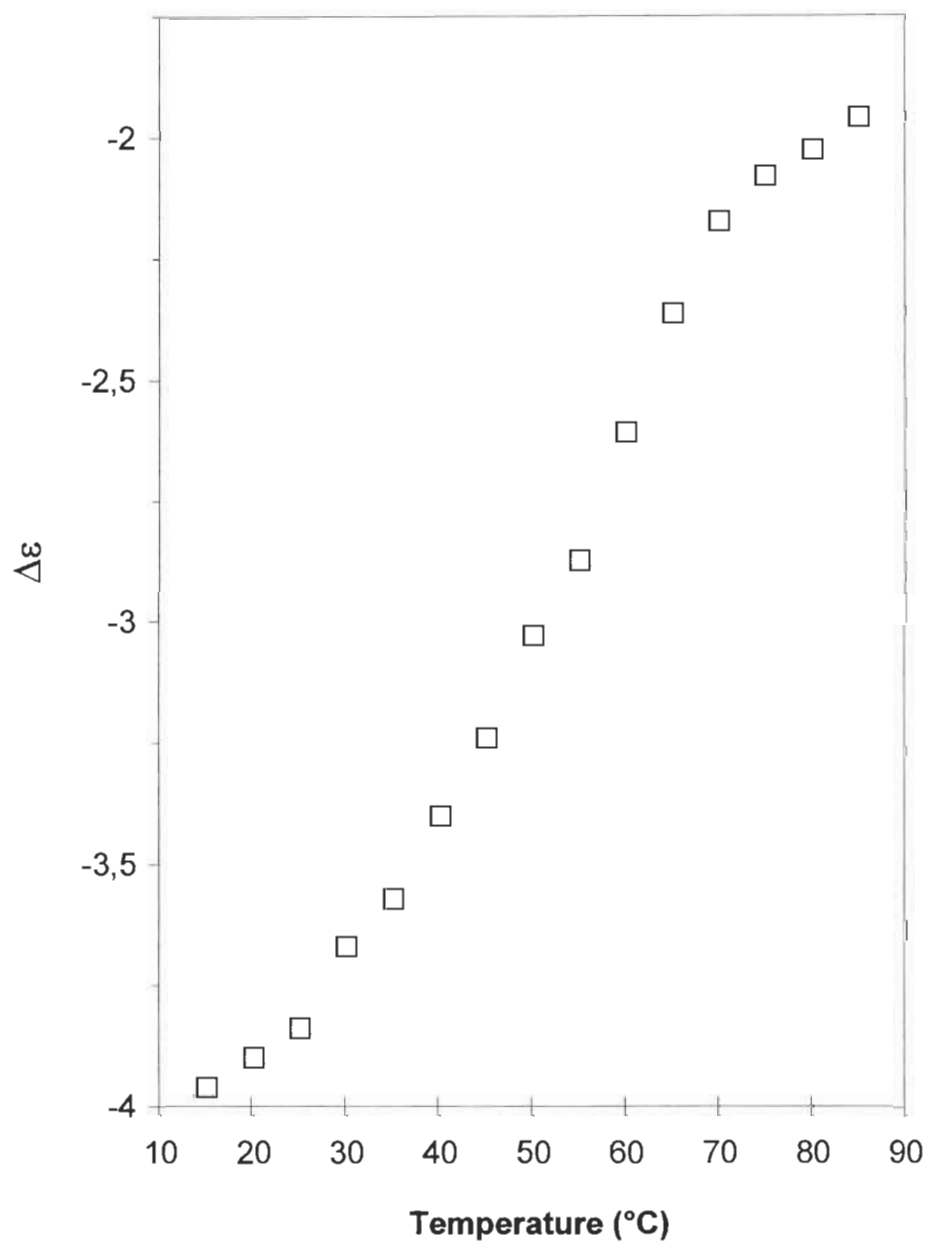


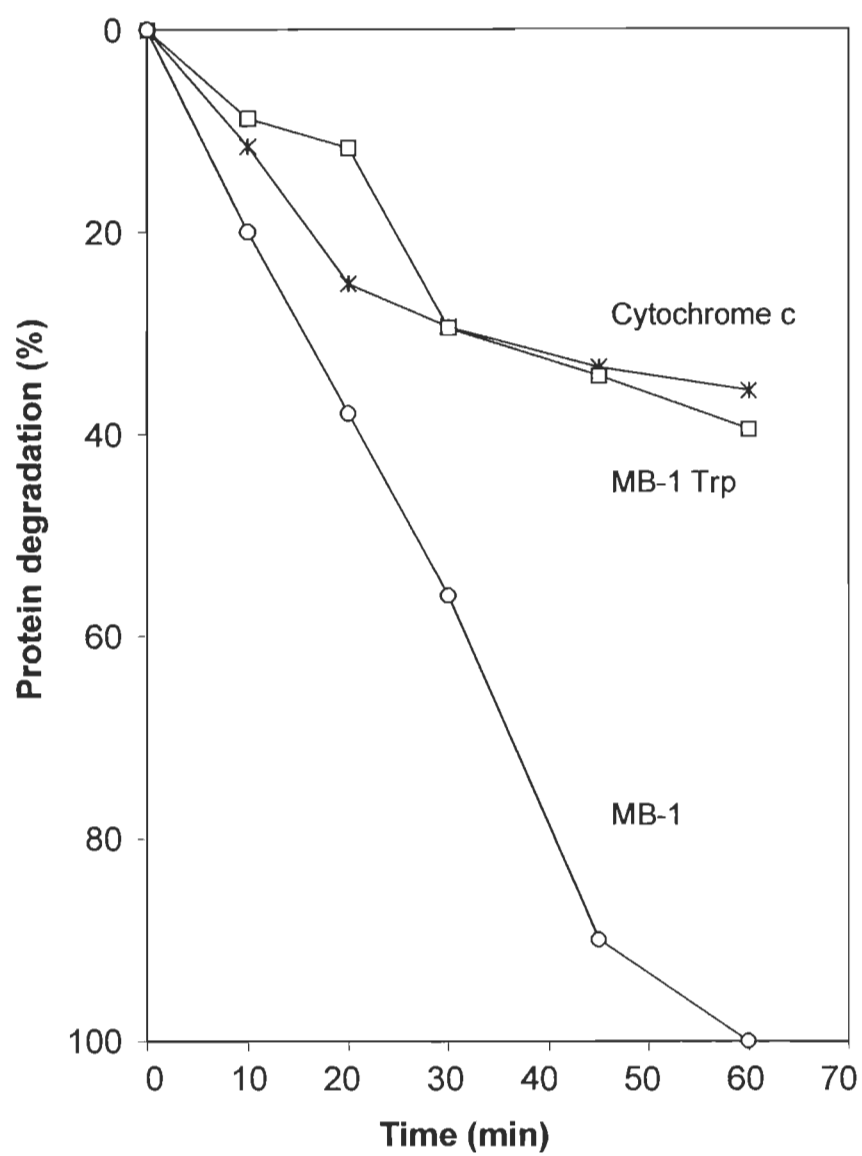
FIGURE 3.1

**FIGURE 3.2**

**FIGURE 3.3**

**FIGURE 3.4**

**FIGURE 3.5**

**FIGURE 3.6**

CHAPITRE 4

DISCUSSION

4.1 Optimisation des propriétés de MB-1

Les coûts associés aux additifs alimentaires utilisés dans la production animale ont conduit à l'étude de la production intracellulaire de protéines de haute qualité par les plantes transgéniques et par d'autres organismes afin d'obtenir des sources d'acides aminés essentiels (AAEs) moins coûteuses et plus efficaces (Dyer et al 1993; Ealing et al. 1994; Williamson 1996). Pour répondre aux besoins spécifiques de la vache laitière en certains acides aminés, la protéine MB-1 a été créée. Cette stratégie, c'est-à-dire la création d'une toute nouvelle protéine, permet théoriquement un contrôle total sur sa composition ce qui lui donne un avantage de poids par rapport aux additifs alimentaires existants.

L'expression des protéines synthétiques à haut contenu en AAEs dans les bactéries a déjà été tentée par plusieurs chercheurs (Doel *et al.* 1980; Jaynes *et al.* 1985; Beauregard *et al.* 1994). Cependant, les efforts fournis jusqu'à présent n'ont pas permis de recueillir des quantités suffisantes de protéines. Parmi les raisons susceptibles d'expliquer ce phénomène, le manque de stabilité structurelle des peptides a été considéré. Dans le cas de MB-1, les concepteurs ont voulu s'assurer que ses propriétés structurelle soient optimales. Sa séquence, quoique limitée par son contenu à fortes proportions en acides aminés essentiels, a ainsi été élaborée afin de former un nœud d'hélices. Cette structure tertiaire permet la formation d'un noyau hydrophobe ce qui devrait conférer une certaine stabilité conformationnelle.

La caractérisation de MB-1, en plus de démontrer son taux élevé en AAEs (57% de Met, Thr, Lys et Leu), démontre qu'elle possède plusieurs caractéristiques comparables aux protéines natives. De plus, MB-1 possède un avantage par rapport à la majorité des protéines dessinées *de novo* qui sont produites par synthèse chimique, car contrairement à celles-ci, elle peut être exprimée *in vivo* (*E. coli*) et récupérée même après l'exposition aux protéases de cet hôte. Cette particularité nous indique que MB-1 peut non seulement se plier intracellulairement dans les bactéries, mais qu'elle peut aussi être potentiellement viable dans un autre organisme vivant. On peut alors entrevoir la production de cette protéine dans les microbes du rumen ou dans une plante transgénique.

La résistance de MB-1 à la dégradation intracellulaire de son hôte ne signifie cependant pas qu'elle n'est plus exposée aux autres risques de dégradation protéolytique. En effet, la protéine MB-1 doit encore résister aux protéases présentes dans le rumen, puisque son rôle est de fournir les acides aminés essentiels à la vache; elle doit ainsi rester intacte jusqu'à son passage dans l'estomac avant d'être assimilée par l'organisme. Malheureusement, les expériences de dégradation protéolytique ont prédit que la durée de vie de MB-1 dans les conditions du rumen serait plus courte que la plupart des protéines naturelles (MacCallum *et al.* 1997; Morrison *et al.* 2000). Dans cet état de choses, MB-1 serait probablement inefficace pour subvenir aux besoins nutritionnels particuliers de la vache laitière.

Un autre aspect de MB-1 nous indique aussi qu'elle n'est pas suffisamment stable. Les essais pour déterminer la structure tertiaire de la protéine par diffraction à rayons X ont échoué (Grundy *et al.* 1998). La principale cause de ces échecs est liée à l'impossibilité d'obtenir des cristaux de protéine d'une qualité suffisante lors de l'expression et de la

purification. Afin d'améliorer nos chances de réussir un tel projet, il faut tout d'abord augmenter la stabilité de la protéine.

4.2 Création de MB-1Trp

Pour permettre l'application biotechnologique de la protéine ainsi que pour réussir sa cristallisation, il faut premièrement augmenter sa stabilité conformationnelle. Il est connu que la stabilité conformationnelle d'une protéine correspond souvent à sa résistance à la dégradation protéolytique (Huang *et al.* 1994; Parsell et Sauer 1989; Liao 1993). Pour ce faire, le mutant MB-1Trp a été créé.

L'approche choisie pour la mutation implique la tyrosine en position 62 de la protéine. Cette sonde spectroscopique, qui a été positionnée intentionnellement dans le noyau hydrophobe, a été utile dans le développement de MB-1 à deux niveaux. Elle a permis la confirmation de la pureté de la protéine par fluorescence et a été utilisée comme sonde conformationnelle montrant que la tyrosine était bien cachée comme prédit dans le design (Hefford *et al.* 1999). Malgré l'utilité du résidu Tyr62, l'enfouissement de sa chaîne latérale dans le noyau est une source potentielle de déstabilisation et peut avoir contribué au faible comportement de MB-1 en terme de stabilité (Creighton 1997). Afin de corriger cette source potentielle de déstabilisation, Tyr62 est remplacée par Trp, un résidu moins polaire.

4.3 Caractérisation du mutant MB-1Trp

Après avoir purifié et confirmé la mutation Tyr62-Trp dans MB-1 (mutant MB-1Trp), nous avons déterminé l'effet que l'insertion du Trp a eu sur certaines caractéristiques de la protéine originelle MB-1.

Les mesures prises par dichroïsme circulaire (fig.3.2) indiquent que MB-1Trp présente un spectre et un pourcentage de structures hélicoïdales (50% à 60%) similaires à ceux observés chez MB-1 (Beauregard *et al.* 1995). La formation de la structure tertiaire du mutant a été confirmée par fluorospectrométrie. La fluorescence de la protéine intacte est centrée à 333 nm tandis que la dénaturation de MB-1Trp conduit à un déplacement vers le rouge de la fluorescence (fig. 3.3). Ces résultats suggèrent que le Trp est caché par le noyau de MB-1 intacte, tel que prévu. Cependant, il se peut que le Trp ne soit pas enfoui autant que la Tyr l'était dans MB-1, puisque l'émission de fluorescence à l'état plié est quand même relativement éloignée de 325 nm, valeur observée pour les Trp protégés entièrement (Lakowicz 1983). Ceci pourrait toutefois être expliqué par la taille du Trp qui est légèrement plus grande (de 34 Å³) que celle de la Tyr. Des résultats similaires aux nôtres obtenus par Handel et ses collègues en 1993 sur la protéine *de novo* α4 peuvent aussi expliquer cet état. En effet, il est fort plausible que la petitesse de notre protéine (un carré de quatre hélices) empêche le Trp d'être complètement enfoui dans le noyau.

La mesure de la liaison de l'ANSA est un autre indicateur de l'état plié d'une protéine. L'augmentation de l'émission de l'ANSA lorsque lié au mutant est comparable aux résultats obtenus par la protéine MB-1 originelle (fig.3.4) (Hefford *et al.* 1999). De plus, le facteur d'intensité à 480 nm est plus faible que les valeurs obtenues dans le cas de protéines mal pliées, ce qui indique que MB-1Trp semble être bien pliée et qu'elle n'est pas dans un état de globule fondu (Semisotnov *et al.* 1991).

Jusqu'à ce point, MB-1Trp est comparable à la protéine originelle ce qui est excellent; la mutation n'a pas modifié de façon importante la structure de la protéine. C'est en vérifiant

la stabilité conformationnelle du nouveau mutant que l'on commence toutefois à remarquer l'effet positif de la mutation. Les résultats de la dénaturation thermique de MB-1Trp mesurée à l'aide du signal CD à 222 nm sont significatifs (fig. 3.5). La température de dénaturation de MB-1 est passée de 39°C (MacCallum *et al.* 1997) à 55°C par le simple remplacement de la Tyr par le Trp. Ces résultats n'étaient toutefois pas inattendus. Ils peuvent être expliqués par la contribution importante du Trp à l'effet hydrophobe et aussi par son aptitude à former, dû à sa grande taille, des liens de Van der Waals avec les résidus environnants. Il est aussi important de noter que la dénaturation thermique de MB-1Trp est entièrement réversible; une autre amélioration par rapport à MB-1. Cependant, la transition de dénaturation a été observée sur un grand écart (30°C à 65°C) ce qui nous informe d'un manque apparent de coopérativité dans le dépliement de MB-1Trp. Ce phénomène est nullement inquiétant étant donné qu'on retrouve cette même particularité chez MB-1 et chez d'autres protéines synthétiques de petite taille (MacCallum *et al.* 1997; Handel *et al.* 1993).

La stabilisation de la protéine a aussi été confirmée par les expériences de dégradation protéolytique. La figure 3.6 montre à quel point le mutant est plus performant que la protéine originelle. Après une heure dans le mélange de protéases modélisant les conditions du rumen, le mutant est encore présent à 60% tandis que la protéine originelle est complètement dégradée. Il faut aussi mentionner que le profil de dégradation de MB-1Trp est comparable à celui d'une protéine naturelle de taille semblable: le cytochrome c. Cela nous incite à croire que la stabilité de MB-1 la rend compétitive avec les protéines naturelles qui sont utilisées pour combler les besoins nutritionnels des animaux de production.

Un autre élément important de la caractérisation de MB-1Trp est apparu lors de la chromatographie d'exclusion de taille. L'analyse de celle-ci a révélé que MB-1Trp migre comme une protéine de 12 kDa, c'est-à-dire près du poids attendu pour un monomère de MB-1. La substitution de la Tyr pour un Trp semble donc corriger une faiblesse du design initial de MB-1. En effet, cette dernière a une taille se rapprochant d'un dimère de la protéine (Hefford *et al.* 1999). La compréhension de cet impact nécessite cependant un peu plus d'investigations.

En conclusion, le remplacement de la Tyr62 de MB-1 par un Trp nous a permis, comme souhaité, d'augmenter de façon considérable, la résistance de MB-1 aux protéases du rumen. Cette plus grande résistance au rumen est probablement due à l'augmentation de la thermostabilité de la conformation de MB-1. La protéine étant plus stable thermiquement, elle résiste mieux à la température intraruminale et le dépliement de la protéine dû à la dénaturation est plus lent; les domaines de la protéine restent ainsi protégés de l'attaque par les protéases et y résistent plus longtemps. L'insertion du Trp nous a aussi permis d'introduire une sonde spectroscopique de meilleure qualité ce qui nous offre la possibilité d'approfondir l'étude de caractérisation de MB-1. Ces propriétés nouvellement optimisées de la protéine nous permettront prochainement de reprendre les essais pour sa cristallisation et d'étudier de manière plus poussée sa structure tertiaire.

4.4 Comparaison de MB-1Trp avec les autres mutants caractérisés

Un bon nombre de mutants de MB-1 ont été conçus et caractérisés jusqu'à maintenant. On retrouve, entre autres, les mutants MB-1LH et MB-1RH conçus et étudiés par Martin Williams au cours de ses travaux de maîtrise (Williams 2000 et Williams *et al.* en

préparation). Ces mutants sont caractérisés par l'insertion d'un pont disulfure entre les hélices I et IV de MB-1 de manière à forcer une connectivité main droite (MB-1RH) ou une connectivité main gauche (MB-1LH) de la protéine originelle. Ces mutants avaient été créés pour deux raisons soit 1) pour augmenter la stabilité de MB-1 et 2) pour étudier laquelle des conformations était la plus favorisée par la protéine. Tous les mutants ont montré une amélioration par rapport à la protéine originelle. La caractérisation de ces mutants n'a toutefois pas donné des résultats aussi spectaculaires que ceux de MB-1Trp. Cela est bien surprenant puisque l'impact positif des liens disulfures sur l'augmentation de la résistance des protéines est reconnu (Mahadevan *et al.* 1980; McNabb *et al.* 1994; Spencer *et al.* 1988). Les résultats de la caractérisation des différents mutants sont comparés au tableau 4.1.

4.5 Applications de MB-1Trp

Le gain en stabilité conformationnelle conféré par la mutation Tyr62-Trp est d'une très grande importance pour le développement de la famille de protéines nutritives MB-1. La seule mutation ponctuelle d'un acide aminé a contribué à la conversion d'une protéine de faible stabilité en une protéine qui est maintenant pliée à la température physiologique. Sa grande résistance aux protéases peut permettre la production d'une protéine de qualité supérieure dans un organisme transgénique.

Il existe présentement deux techniques d'expression en développement pour la famille de MB-1. La première technique consiste à produire la protéine dans une bactérie nichant naturellement dans le rumen, *Butyrivibrio fibrisolvens* (Parker *et al.* 1997). De cette manière, la protéine pourrait être produite intracellulairement et pourrait être accessible à l'animal lors de la lyse de la bactérie dans l'estomac. Pour qu'une telle méthode fonctionne, la protéine à

TABLEAU 4.1
Comparison de la stabilité de MB-1 Trp

	% Hélices	T _m	Dosage protéolitique (% de protéines après 60 min.)
MB-1*	~ 50-60	39 °C	0
MB-1 Trp	58	55 °C	60
MB-1 LH*	59	43 °C	43
MB-1 RH*	54	46 °C	36

Selon la stabilité conformationnelle et protéolytique, les trois mutants ont surpassé la protéine mère. Cependant, et de façon surprenante, MB-1Trp montre plus de stabilité que les deux mutants comportant un pont disulfure.

* Les données sur MB-1 proviennent de Grundy *et al.* 1998.

* Les données sur MB-1 LH proviennent de Williams, M. 2000.

* Les données sur MB-1 RH ne sont pas encore publiées.

exprimer doit être résistante aux protéases intracellulaires de la bactérie hôte. La deuxième approche consiste à produire des plantes transgéniques (luzerne, soya,...) qui pourront être utilisées comme nourriture dans la production animale. De cette manière, le producteur laitier pourrait facilement produire la plantes enrichie en MB-1 et ainsi fournir les AAEs à ses animaux pour optimiser leur rendement de lait et de protéines laitières. Une comparaison avec des analyses qui ont été rendues publiques sur la dégradabilité des protéines de plantes indique que MB-1Trp est comparable à l'albumine 8 de tournesol 2S (SFA8), une protéine qui a un contenu élevé en méthionine et qui est utilisée dans la production de plantes transgéniques à valeur nutritionnelle ajoutée (McNabb *et al.* 1994). Il faut aussi rajouter que le profil en AAEs de la SFA8 n'est pas optimisé pour les besoins de la vache laitière, tandis que celui de MB-1Trp l'est à cause de son contenu balancé en méthionine, en lysine et thréonine. Le tableau 4.2 présente une comparaison du contenu des deux protéines. Les données présentées indiquent aussi que MB-1Trp est assez résistante pour se mesurer à une protéine naturelle de haute qualité. Il est important de noter que l'application d'une protéine ayant cette composition ne se limite pas seulement aux besoins nutritionnels de la vache pour améliorer son rendement en protéines laitières. En fait, elle pourrait éventuellement être utilisée pour améliorer le rendement ou la croissance d'autres animaux de production (porcs, poulets, etc.) puisque les mêmes acides aminés, dont la méthionine en particulier, leur sont essentiels (Boebel *et al.* 1982)².

² L'application de MB-1Trp pour plusieurs animaux de production fait l'objet d'une demande de brevet.

TABLEAU 4.2
Applicabilité de MB-1 Trp

	Albumine de tournesol*	MB-1 Trp
% Méthionine	15,5	13
% Thréonine	1	20
% Leucine	9	9
% Lysine	4	12
Résistance au rumen	3h	2h

Comparaison de la composition et de la stabilité de l'albumine-8 de tournesol (SFA8), et de MB-1Trp. La résistance MB-1Trp aux conditions du rumen est plus faible mais comparable à celle de la protéine naturelle, tandis que sa composition en est nettement supérieure.

* McNabb *et al.* 1994; Kortt *et al.* 1991.

4.6 Avenues de recherche

Malgré les qualités indéniables du mutant MB-1Trp, certaines améliorations peuvent encore être apportées à la protéine. Il serait intéressant de mesurer l'impact de la combinaison du mutant MB-1Trp avec les mutants permettant la formation d'un pont disulfure, soit MB-1RH ou MB-1LH. Le lien covalent du pont disulfure pourrait resserrer le noyau, augmenter la protection du Trp et un effet additif de stabilisation serait alors obtenu.

Avec la mutation Trp, la protéine MB-1 est maintenant assez stable pour permettre la formation de cristaux. La prochaine étape dans les recherches de la famille MB-1 serait donc de procéder à la cristallisation pour vérifier sa structure tertiaire. Les premières études de diffraction à rayons X nous permettront de résoudre la structure de MB-1Trp pour ensuite nous permettre de procéder à une évaluation critique du design initial de MB-1. Nous pourrons ainsi visualiser les faiblesses dans la structure de la protéine et dans sa séquence en acides aminés ce qui nous mènera aussi à comprendre un peu mieux les aspects fondamentaux du pliage des protéines et à apporter les corrections qui s'imposent.

RÉFÉRENCES

- Ashes, J.R., Gulati, S.K., et Scott, T.W. The role of rumen protected proteins and energy sources in the diet of ruminants. Ivan M, ed. Animal Science Research and Development: Moving Towards a New Century. CFAR Contribution no. 2321. Ottawa, ON: Ministry of Supplies and Services Canada (ISBN 0-662-23589-4), 1995. pp. 177-185.
- Beauregard, M., Dupont, C., Teather, R.M. et Hefford, M.A. (1995) Biotechnology 13 : 974-981.
- Beauregard, M., Hefford, M.A. et Teather, R.M. (1994) Biotechniques, 16 : 831-838.
- Biou, V., Gibrat, J.F., Levin, J.M. et Garnier, J. (1988) Protein Eng. 2 : 185-191.
- Boebel, K. et Baker, D.H. (1982) J. Nutrition. 112 : 1130-1132.
- Bryson, J.W., Betz, S.F., Lu, H.S., Suich, D.J., Zhou, H.X., O'Neil, K.T. et Degrado, W.F. (1995) Science 270 : 935-941.
- Chalupa, W. (1975) J. Dairy Sci. 58 : 1198-1218.
- Chothia, C. (1984) Annu. Rev. Biochem. 3 : 141-164.
- Church, D.C. The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition. Reston: Prentice Hall, Ed., 1988.
- Creighton, T.E. Proteins : Structures and Molecular Properties. 2ième Édition, New York: W.H. Freeman and Company, Ed. 1997.
- DeLumen, B.O., Krenz, D.C. et Revilleza, J. (1997) Food Technol. 51 : 67-70.
- Doel, M.T., Eaton, M., Cook, E.A., Lewis, H., Patel, T. et Carey, N.H. (1980) Nucleic Acids Res. 8 : 4575-4592.
- Dyer, J.M., Nelson, J.W. et Murai, N. (1993) J. Protein Chem. 12 : 545-560.
- Ealing, P.M., Hancock, K.R. et White, D.W. (1994) Transgenic Res. 3 : 344-534.
- Eftink, M.R. Protein Structural Determination : Methods of Biochemical analysis. Suelter, C.H., Ed. 1991. 35 : 127-205.
- Eftink, M.R. (1994) Biophys. J. 66 : 482-501.
- Engelhard, M. et Evans, P.A. (1996) Folding and Design. 1 : R31-R37.

Gagnon, M. C., Williams, M, Doucet, A. et Beauregard, M. (2000) FEBS Letter 484 : 144-148.

Grundy, J.E., Morrison, J.J., MacCallum, J.D., Wirtanen, L. et Beauregard, M. (1998) J. Biotechnol. 63 : 9-15.

Handel, T.M., Williams, S.A., Menyhard, D. et Degrado, W.F. (1993) J. Am. Chem. Soc. 115 : 4457-4460.

Hefford, M.A., Dupont, C., MacCallum, J., Parker, M.H. et Beauregard, M. (1999) European J. Biochem. 262 : 467-474.

Hodges, R.S, Sodek, J., Smillie, L.B., et Jurasek, L. (1972) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37 : 299-310.

Hoffman, L.M., Donaldson, D.D. et Herman, E.M. (1988) Plant Mol. Biol. 11 : 717-729.

Holmes, C.W. et Wilson, G.F. Milk Production From Pasture. New Zealand: Butterworths. 1984.

Huang, X.L., Catignani, G.L. et Swaisgood, H.E. (1994) J. Agr. Food Chem. 42 : 1276-1280

Hutjens, M.F., Overton, T.R. et Brand, A. Monitoring Milk Production: Optimizing Rumen Digestion in the Dairy Cow. Ch 4, part 1. In: Brand A, Noordhuizen JPTM, Schukken YH, eds. Herd Health and Production Management in Dairy Practice. The Netherlands: Wageningen Pers. 1996.

Jaynes, J., Langridge, P., Anderson, K., Bond, C., Sands, D., Newman, C.W. et Newman, R. (1985) Appl. Microbiol. Biotechnol., 21 : 200-205.

Koehl, P. et Levitt, M. (1999) PNAS. 96 : 12524-12528.

Kortt, A.A., Caldwell, B., Lilley, G.G. et Higgins, T.J.V. (1991) Eur. J. of Biochem. 195 : 329-334.

Lakowicz, JR. Principles of Fluorescence Spectroscopy. New York : Plenum Press. 1983. pp.258-297.

Lawrence, M.C., Suzuki, E., Varghese, J.N., Davis, P.C., Van Dontelaar, A., Tulloch, P.A. et Colman, P.N. (1990) EMBO J. 9 : 9-15.

Liao, H.H. (1993) Enzyme Micro. Technol. 15 : 286-292.

MacCallum, J.D., Hefford, M.A., Omar, S. et Beauregard, M. (1997) Appl. Biochem. Biotechnol. 66 : 83-93.

- Mahadevan, S., Erfle, J.D. et Sauer, F.D. (1980) *Anim. Sci.* 50 : 723-728.
- McNabb, W.C., Spencer, D. et Higgins, T.J. (1994) *J. Sci. Food Agric.* 64 : 53-59.
- McNiven, M.A., Robinson, P.H. et MacLeod, J.A. (1994) *J. Dairy Sci.* 77 : 2605-2613.
- Mepham, T.B. Physiology of Lactation. Philadelphia: Open University Press, 1986.
- Miller, W.J. Dairy Cattle Feeding and Nutrition. Orlando, Florida: Academic Press. 1979.
- Morrison, J.J., McNally, D., Navidzadeh, A. et Beauregard, M. (2000) *Appl. Biochem. Biotech.* 87 : 247-264.
- Orskov, E.R., Reid, G.W. et Tair, C.A.G. (1987) *Anim. Prod.* 45 : 345-348.
- Parker, M., Hefford, M.A., Forster, R.J., Dupont, C., Beauregard, M., Scholl, D. et Teather, R.M. (1997) *Demande de Brevet*. CA 2203043.
- Parsell, D.A. et Sauer, R.T. (1989) *J. Biol. Chem.* 264 : 7590-7590.
- Privalov, P.L. (1979) *Adv. Prot. Chem.* 33 : 167-241.
- Purser, D.B. (1970) *J. Anim. Sci.* 30 : 988-1001.
- Ragone, R., Facchiano, A. Facchiano, A.M. et Colonna, G. (1989) *Prot. Eng.* 2 : 497-504.
- Rulquin, H., Verite, R., Guinard, G. et Pisulewski, P.M. Animal Science Research and Development: Moving Toward a New Century. Ivan M, ed. CFAR Contribution no. 2321. Ottawa, ON: Ministry of Supplies and Services Canada (ISBN 0-662-23589-4). 1995. pp. 143-160.
- Semisotnov, G.V., Rodionova, N.A., Razgulyaev, O.I., Uversky, V.N., Gripas, A.F., et Gilmanshin, R.I. (1991) *Biopolymers*. 31 : 119-128.
- Spencer, D., Higgins, T.J.V., Freer, M., Dove, H. et Coombe, J.B. (1988) *Brit. J. Nutr.*, 60 : 241-247.
- Stern, M.D., Santos, K.A. et Satter, L.D. (1985) *J. Dairy Sci.* 68 : 45-56.
- Tamminga, S. (1979) *J. Anim. Sci.* 49 : 1615-1630.
- Tanner, G.J., Moore, A.E., et Larkin, P.J. (1994) *Brit. J. Nutr.* 71 : 947-958.
- Williamson, M. (1996) *Trends Biotechnol.* 14 : 449-450.
- Williams, M. (2000) *Mémoire de Maîtrise*, Université du Québec à Trois-Rivières.

ANNEXE A

Replacement of Tyr62 by Trp in the designer protein Milk Bundle-1
results in significant improvement of conformational stability

M. C. Gagnon, M. Williams, A. Doucet, M. Beauregard

FEBS Letter 484 (2000)

Replacement of Tyr62 by Trp in the designer protein Milk Bundle-1 results in significant improvement of conformational stability

M.C. Gagnon, M. Williams, A. Doucet, M. Beauregard*

Groupe de Recherche en Énergie et Information Biomoléculaire, Département de Chimie-Biologie, Université du Québec à Trois-Rivières, CP 500, Trois-Rivières, Que., Canada G9A 5H7

Received 18 September 2000; accepted 11 October 2000

First published online 19 October 2000

Edited by Hans Eklund

Abstract Protein design is currently used for the creation of new proteins with desirable traits. In our lab, we focus on the synthesis of proteins with high essential amino acid content, having potential application in animal nutrition. One of the limitations we face in this endeavor is the achievement of stable proteins in spite of a highly biased amino acid content. We report here the synthesis and characterization of MB-1Trp, a protein with a tailored content in selected essential amino acids. The protein is a Tyr62-Trp mutant of the parent molecule MB-1 described earlier. The new protein is largely helical as per design, is well folded, and has a melting temperature of 55°C. Its resistance to proteolytic degradation compares to that of cytochrome *c*, a protein of similar size. Design strategy used for MB-1Trp is discussed with regards to its applicability toward the creation of efficient nutritional proteins. © 2000 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Key words: Protein design; Mutagenesis; Conformational stability; Tryptophan; Protein fluorescence; Hydrophobicity

1. Introduction

De novo design of artificial proteins has been an emerging area of research that tests our understanding of protein structure and allows the creation of macromolecules with desirable and specific structures and properties. The property that we (and other groups) have chosen is the nutritional quality of protein, in view of its importance for animal production and human health [1–5].

In our lab, we have been interested in nutritional value, focusing on proteins with an essential amino acids (EAA) profile tailored for dairy animal production. Our first de novo designed protein, Milk Bundle-1 (MB-1), has been reported earlier [1]. Characterization of MB-1 indicated that the design process used resulted in the stable expression of a new, largely helical protein enriched in the selected EAA (60% in M, T, K and L). After a first round of design, the protein MB-1 was found to have a folded core and low affinity for 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid (ANSA) [4]. Its behavior

and expression levels in vivo were found to be far superior to earlier attempts in the area of high EAA polypeptide design [6].

Investigation of MB-1's properties did reveal some flaws, however. The proteins appear to associate into dimers that could dissociate into monomers in the presence of a high salt concentration [4]. Its melting temperature was found to be very low (39°C), and its resistance to proteases at a physiological temperature was also found to be limited, a possible consequence of partial unfolding [6]. As a consequence of these weaknesses, efforts in growing crystals were unsuccessful [7].

In order to improve MB-1's folding and resistance to degradation, strategies for a new cycle of design were considered. One possible modification involved the sole Tyr in position 62, predicted to be buried in the hydrophobic core. This spectral probe has been useful on two counts: it permitted the confirmation of protein purity using fluorescence, and it has been used as a conformational probe, as it was indeed buried as planned [6]. Burial of a hydroxyl group in the core is a potential source of destabilization, however, and may have contributed to MB-1's poor behavior in terms of stability [6]. Replacement of Tyr62 by Trp should provide increased hydrophobicity to the protein core, and would maintain, if not expand, the useful spectroscopic properties of the side chain in position 62. In this paper, we report the substitution of Tyr62 by Trp and the impact of this mutation on a number of structural features, including thermostability.

2. Materials and methods

2.1. Preparation of MB-1Trp mutant

Substitution of the Tyr in position 62 by a Trp was performed using the oligo-directed mutagenesis kit 'Altered Sites® II' (Promega). The mutational oligonucleotide Tyr62-Trp (shown below with the corresponding MB-1 sequences) was purchased from Gibco BRL/Life Technologies, purified using denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and phosphorylated.

MB-1: 5'-ATG GCC ACT ACG TAC TTC AAA ACG ATG-3'
Tyr62-Trp: 5'-ATG GCC ACT ACG TTG TTC AAA ACG ATG-3'

The mutation was then confirmed by dideoxynucleotide sequencing using T7 Sequenase kit (Amersham Life Science). The mutated MB-1 gene was cloned back in the pCMG20 4-X expression vector [1] and positive clones were checked again by DNA sequencing.

2.2. Protein expression and purification

Bacteria carrying the mutant vectors were grown at 37°C, 300 rpm

*Corresponding author. Fax: (1)-819-376 5084.
E-mail: marc_beauregard@uqtr.quebec.ca

Abbreviations: ANSA, 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid; BCA, bicinchoninic acid; CD, circular dichroism; EAA, essential amino acids; EDTA, ethylenediaminetetraacetate; MB-1, Milk Bundle-1; MBP, maltose binding protein

in 1 l of LB Miller medium (Difco) to an optical density (OD) of 0.4. Transcription was induced using 1 mM isopropylthio- β -D-galactoside for 3 h. The cells were then harvested by centrifugation at $3000 \times g$. The purification procedure was essentially as described in [1] with minor modifications. Precipitated cells were resuspended in ice-cold column buffer (10 mM Tris, 200 mM NaCl, 10 mM ethylenediaminetetraacetate (EDTA), 1 mM sodium azide (NaN_3), pH 7.4). Phenylmethylsulfonylfluoride, ethylene glycol-bis(β -aminoethylether)- N,N,N',N' -tetraacetate, benzamidinium-hydrochloride and benzamide were added to a final concentration of 0.1, 10, 2 and 2 mM, respectively. Cells were then lysed by 10–30 s sonication pulses using a Branson Sonifier 250 at 60% output control. The sonicate was centrifuged at $11\,500 \times g$ for 30 min at 4°C .

The supernatant was then loaded onto a 15 ml amylose column. The maltose binding protein (MBP) fused with MB-1Trp (MBP-MB-1Trp) was eluted by washing the column with column buffer containing 10 mM maltose (elution buffer). Pooled peak fractions were placed in dialysis tubing (Spectra/Por; molecular weight cut off 3500 Da) with 50 μl factor Xa per 10 ml fusion protein. The bag was placed in 20 mM Tris, 100 mM NaCl, 3 mM CaCl_2 (cleavage buffer) overnight at 4°C . The following morning, the bag was transferred to 10 mM Tris–1 mM EDTA (TE) buffer, pH 8.0. After a 2 h dialysis, the sample was applied to DEAE-Sepharose equilibrated in TE buffer, pH 8.0 (Fast Flow; Pharmacia) and washed with the same buffer. MB-1Trp was collected as the flow-through. The different fractions were analyzed for protein content by the bicinchoninic acid (BCA) assay and the positive fractions were pooled and concentrated using BIO-MAX-5K concentrators (Millipore). Protein samples were prepared in a borate-phosphate buffer (55 mM NaH_2PO_4 , 35 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, pH 6.8) and dialyzed overnight against this buffer prior to measurements. Protein concentration was adjusted to 0.4 mg/ml unless specified otherwise.

2.3. Protein quantification and electrophoresis

Protein concentration was determined by the BCA assay (Sigma), using bovine serum albumin as the standard. The protein was visualized by sodium dodecyl sulfate (SDS)–PAGE using 12% polyacrylamide–tricine gels, followed by silver nitrate staining. SDS–PAGE experiments were conducted prior to measurements to confirm protein purity.

2.4. Conformational investigation by circular dichroism (CD)

Protein samples were degassed for 20 min at 20°C before measurements. Spectra were measured with a Jasco J-720 spectropolarimeter, which was routinely calibrated with a 0.06% (w/v) ammonium (+)-10-camphorsulfonate solution. For measurements in the far-UV region, a quartz cell with a path length of 0.01 cm was used. Ten scans were accumulated at a scan speed of 20 nm per minute, with data being collected at every nm from 180 to 260 nm. Sample temperature was maintained at 20°C using a Neslab RTE-111 circulating water bath connected to the water-jacketed quartz cuvettes. Spectra were corrected for buffer signal and conversion to $\Delta\epsilon$ (on the basis of amide bond concentration) was performed with the Jasco Standard Analysis software. Secondary structure calculations were performed using the CDstr program developed [8], using default settings.

2.5. Thermal denaturation

Samples were prepared as described in the preceding Section 2.4. In order to measure thermostability, temperature was increased from 15 to 85°C at a rate of 30°C per hour using a Neslab RTE-11 controlled by the Jasco spectropolarimeter software. CD spectra were collected at every 5°C , from 200 to 260 nm, at a scan speed of 20 nm/min. In order to assess reversibility of thermal denaturation, the protein solutions were cooled down at a rate of 30°C per hour, and spectra were measured at 70, 50 and 20°C .

Thermal stability was calculated assuming a unimolecular, two-state process as previously described [9]. The $\Delta\epsilon_{\text{MRW}}$ at 222 nm measured at various temperatures was used as the property (y) indicative of the extent of unfolding. In the folded state, the parameter $y = y_f$ and the fraction of folded protein f_f is equal to 1. When the protein is unfolded, the parameter $y = y_u$, and the fraction of unfolded protein f_u is equal to 1. For intermediate states, y is given by $y_f f_f + y_u f_u$. Thus, by measuring y , we can calculate the fraction of protein unfolded: $f_u = (y - y_f) / (y_u - y_f)$. The equilibrium constant for the unfolding process is $K_u = f_u / (1 - f_u)$ and melting temperatures (T_m) are obtained at $K_u = 1$ [9].

2.6. ANSA fluorescence enhancement

Protein concentration was adjusted to 0.1 mg/ml in B/P pH 6.8 and equilibrated at room temperature (RT) for 1 h. Then ANSA was added to a final concentration of 10 μM and equilibrated 5 min prior to measurements. Spectra were recorded using an LS50-B Perkin-Elmer fluorometer with an excitation wavelength of 380 nm. Spectra were collected from 410 to 550 nm. Correction for buffer signal on ANSA was keyed in when applicable.

2.7. Intrinsic fluorescence measurements

Protein concentration of samples was adjusted to 0.1 mg/ml and equilibrated at RT for 1 h. For chemical denaturation, urea (Sigma U-5378) was added to a final concentration of 8 M and equilibrated at RT 5 min before measurement. For thermal denaturation, temperature was increased to 85°C at a rate of 15°C per hour using Neslab RTE-11. Spectra were recorded using an LS50-B Perkin-Elmer fluorometer with an excitation wavelength of 280 nm. Spectra were then corrected for buffer signal before analysis.

2.8. Size-exclusion chromatography/estimation of molecular size

Protein samples were adjusted to a concentration of 0.6 mg/ml and loaded onto a Beckman Ultraspherogel SEC-2000 column hooked to a Waters 510 HPLC. The column was standardized with the Pharmacia Low Molecular Weight gel filtration calibration standards prepared in the same buffer.

2.9. Proteolytic degradation measurements

Experiments were carried out as described by Krisnamoorthy et al. [10]; with few modifications as described in Morrison et al. [11]. Reactions were stopped by the addition of 2% SDS buffer followed by heating for 3 min at 100°C . Samples were then analyzed on SDS–PAGE followed by silver nitrate staining. The amount of protein remaining after incubation with proteases was determined by measuring the OD of each band using the image analysis system Imaging Research MCID. Cytochrome c from horse heart (Sigma C-7752) was used as a reference protein for all degradation runs in order to correct for possible variations in crude proteolytic activity.

3. Results

Position 62 in MB-1 was chosen for the emplacement of a spectroscopic probe at the moment of initial design [1]. As shown on the model in Fig. 1, this position is part of the hydrophobic core, and a niche made of five Ala was built

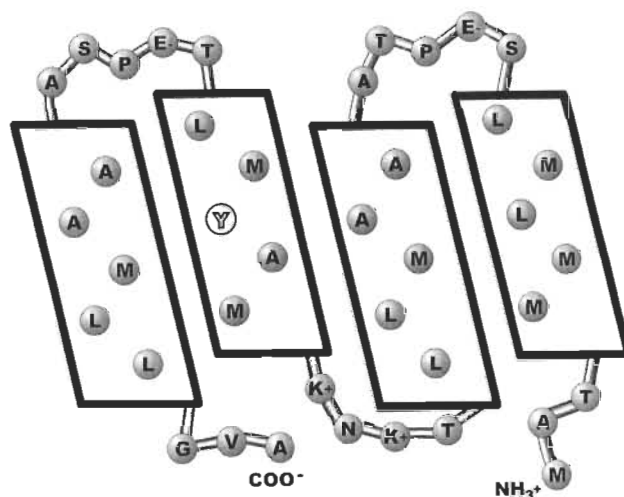


Fig. 1. MB-1's hydrophobic core as predicted by design. The intended structure is a four-helix bundle, with residue polarity distributed along the canonical heptad pattern. The pictogram shows only the interior of the bundle after 'opening' and 'flattening', each box representing the non-polar face of a helix. Note that the large Tyr in position 62 is surrounded by five small alanine residues.

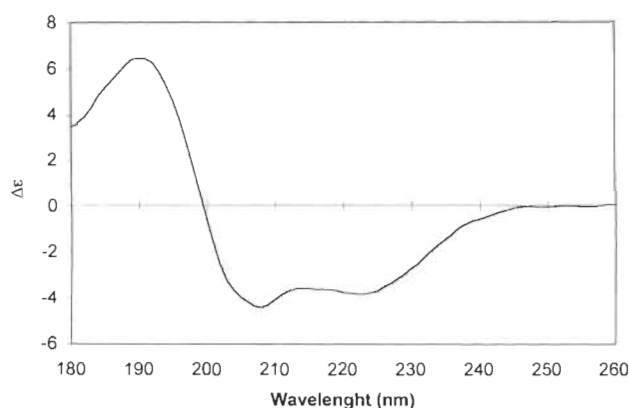


Fig. 2. CD spectra of MB-1Trp. A 50% helical content was predicted from such spectra as described in Section 2.

around it in order to accommodate a larger side chain in this region of the core. Substitution of Tyr62 for Trp was performed on MB-1 by site-directed mutagenesis and confirmed by DNA sequencing and fluorospectroscopy (not shown); then the mutant, named MB-1Trp, was characterized. First, CD measurements were performed and spectra typical of helical proteins were obtained (Fig. 2). Using the CDstr algorithm [8], 50% of amide groups were predicted to be in a helical environment. Thus, the secondary structures of the mutant MB-1Trp were found to be similar to the parent molecule MB-1.

The formation of a tertiary structure in the mutant was confirmed by fluorescence measurements: the folded protein fluorescence peaked at 333 nm, and its emission shifted to approximately 345 nm when unfolded using heat or urea (Fig. 3). The Trp side chain appears to be protected in the folded protein, and exposed to solvent upon unfolding, as predicted by design. Similar shifts in fluorescence λ_{max} were observed for another designer protein ($\alpha 4$) after insertion of a Trp side chain [12].

Results from fluorescence measurements using the probe ANSA are shown in Fig. 4. The enhancement of ANSA emission by the protein was limited to a factor of 3, which is comparable to the parent molecule [4], and lower than the

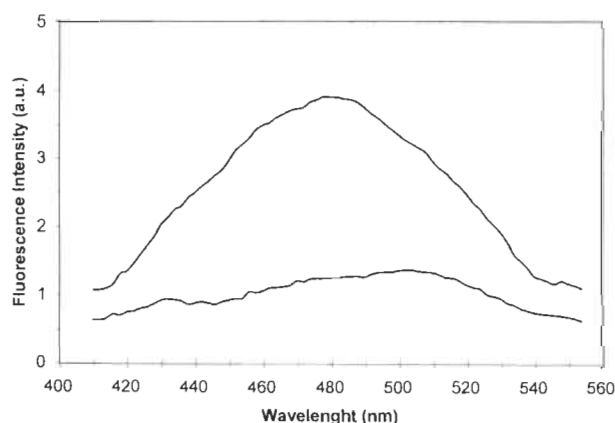


Fig. 4. Enhancement of ANSA fluorescence by MB-1Trp. Spectra collected with 10 μM ANSA alone (bottom curve) and ANSA with MB-1Trp (top curve). When exposed to the mutant protein, ANSA fluorescence shifts from 510 to 480 nm, and its fluorescence intensity at 480 nm increases by a factor of 3, as a result of binding to hydrophobic clusters in folded MB-1Trp.

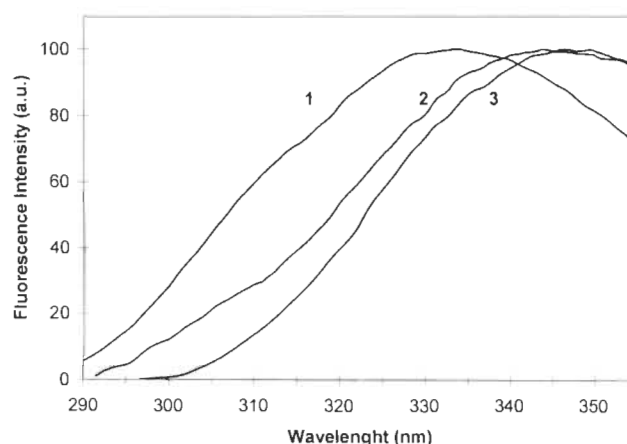


Fig. 3. Unfolding of MB-1Trp as monitored by fluorospectroscopy. Spectra were obtained for MB-1Trp at 20°C (curve 1), after thermal denaturation at 85°C (curve 2) and after urea denaturation (curve 3).

values expected for poorly folded proteins [13]. These results suggest that MB-1Trp is rather well folded, and not in a molten globule. Size-exclusion chromatography analysis revealed that MB-1Trp migrated as a 12 kDa protein, closed to the expected size of an MB-1Trp monomer. Substitution of Trp in position 62 appears to correct one weakness of the initial design of MB-1, which had a size approaching that of a dimer [4].

The impact of the substitution in position 62 on conformational stability was verified using two different approaches. First, the CD signal at 222 nm was recorded at various temperatures in order to monitor unfolding of MB-1Trp helices. The denaturation of MB-1Trp (Fig. 5) indicated a melting temperature of 55°C, a significant improvement over MB-1 (melting temperature of 39°C) and other mutants characterized so far ([6], Hefford and Beauregard, in preparation). The thermal denaturation was found to be fully revers-

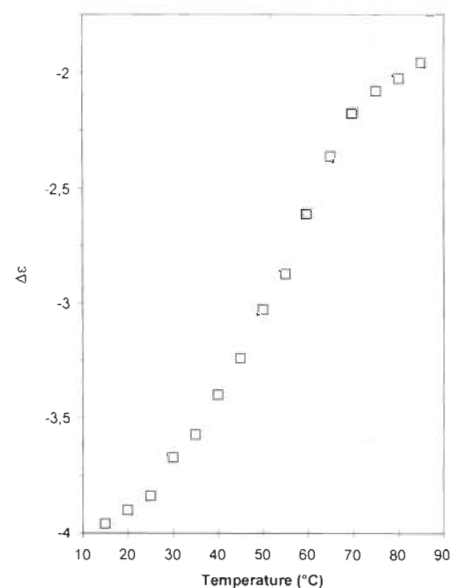


Fig. 5. Thermal denaturation curve for MB-1Trp. $\Delta\epsilon$ was measured at 222 nm as described in Section 2.

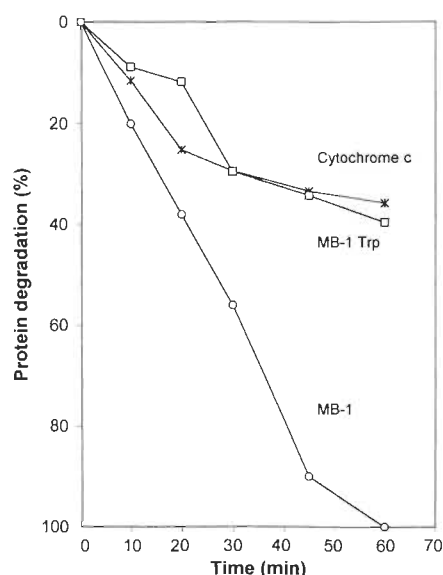


Fig. 6. Degradation of MB-1 and MB-1Trp mutant using pronase E. MB-1 resistance to proteolytic degradation (open circles) is increased by the insertion of a Trp instead of the Tyr at position 62 (open square). MB-1Trp's resistance to proteolytic degradation compared to that of cytochrome *c*, a natural protein of similar size that is used as an internal standard for such measurements.

ible, another improvement over MB-1, but the transition was spread over a wide temperature range (30–65°C). However, this apparent lack of cooperativity in MB-1Trp thermal unfolding also characterized MB-1 and other small designer proteins [6,12].

Stabilization of MB-1 fold by the mutation was also confirmed by proteolytic degradation experiments. Degradation curves shown in Fig. 6 clearly demonstrate a gain in resistance to proteolytic attack. Under our standard conditions, MB-1Trp was twice as resistant as MB-1, and behaved like a natural protein of similar size (cytochrome *c*).

4. Discussion

Trp and Tyr residues are comparable on various counts: they have large aromatic side chains, they undergo a limited but similar loss of conformational entropy upon protein folding, and they have similar secondary propensities [14,15]. They differ in their hydrophobicities, however, due to the presence of a hydroxyl group in *p* position on the phenyl moiety. When such a polar group is involved in a hydrogen bond, the difference between Trp and Tyr hydrophobicity decreases [14], but in MB-1, no such H-bonding partner was properly positioned while designing the protein. Most results shown here indicate that the increase in hydrophobicity in position 62, due to the removal of tyrosine's hydroxyl group from the core, led to an important improvement of MB-1 fold stability. The important impact of a Tyr-Trp mutation observed here is not totally unexpected: Honda et al. [16] observed a significant drop in T_m values for the chitosanase from *Streptomyces* sp. N174 upon removal of Trp residues. This may be explained by tryptophan's ability to make extensive van der Waals contacts with neighboring residues due to its large size, in addition to its contribution to the hydrophobic effect. The improvement of MB-1 properties also included the specification of a monomeric organization. A full understand-

ing of such a correction to this design weakness awaits further investigations though.

Trp and Tyr both belong to the class of large side chains, but Trp is significantly larger than Tyr, with an additional 34 Å³ [16,17]. The original design strategy allowed for a Tyr in position 62, but not for Trp, which would result in a layer volume that would be above average for natural bundles. The results shown here all indicate that MB-1 secondary and tertiary structures were not disturbed by the substitution Tyr62-Trp. The protein is helical and well folded and it appears that the niche around position 62 readily accommodates the larger side chain of Trp. The mutation resulted in an important improvement in the protein stability. In a comparable designer protein where the intended location of a Trp was not engineered in a way as to accommodate an increase in bulk, the mutation actually destabilized the protein [12].

Our results suggest that while Trp stabilized MB-1 fold, it may not be as buried as Tyr was in MB-1: its fluorescence λ_{max} is at 333 nm, and not near 325 nm as observed for fully protected Trp. Similar results obtained by Handel et al. [12] on a similar designer protein may indicate that Trp cannot be buried completely in a core as small as the one involved here.

The gain in conformational stability afforded by the Tyr62-Trp mutation is of paramount importance for future advances in the development of MB-1 family of proteins. What we achieved here by a single point mutation is the conversion of a low stability protein into a protein that is now folded at physiological temperature. Its high resistance to proteases could permit the production of this high quality protein by transgenic crops to be used in animal production. A comparison of previously reported analyses of plant protein degradability indicates that MB-1Trp compares to sunflower 2S seed albumin 8 protein, a protein with a high methionine content intended for production of transgenic crops with enhanced nutritional quality [18]. Note that the EAA profile of SFA8 is not optimized for lactating cows needs, while MB-1Trp is, due to its balanced content of methionine, lysine and threonine. This comparison indicates that although few cycles of design may be required, our design approach produced a high quality protein that competes with natural proteins at the level of stability.

A number of MB-1 mutants have been designed and characterized so far. The design strategy was based on the assumption that MB-1 folded as an α -helical bundle, as shown in Fig. 1. Most mutants, including MB-1Trp, behaved as helical and folded protein ([7,19], Williams et al., in preparation). These results (and results from investigations of MB-1 structure using a number of low resolution techniques) all indicate that the designer protein MB-1 is approximately folded as planned. Nevertheless, no detailed structure (nuclear magnetic resonance or X-ray) is available for the designer protein MB-1 as of yet, since our efforts have been hampered by lack of solubility and stability in solution [7]. The mutant presented here clearly outperforms the parent molecule on several counts, including the ability to stay monomeric under conditions used here, and to resist degradation in solution. Crystallization experiments are under way and it is hoped that solving the MB-1Trp structure will permit a critical evaluation of the design strategy used for MB-1.

Acknowledgements: This work was funded by grants from Dairy Farmers of Canada and from the Natural Sciences and Engineering

Council of Canada. A.D. acknowledges a scholarship from the FCAR.

References

- [1] Beauregard, M., Beauregard, M., Dupont, C., Teather, R.M. and Hefford, M.A. (1995) *Biotechnology* 13, 974–981.
- [2] Jaynes, J., Langridge, P., Anderson, K., Bond, C., Sands, D., Newman, C.W. and Newman, R. (1985) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21, 200–205.
- [3] Dyer, J.M., Nelson, J.W. and Murai, N. (1993) *J. Protein Chem.* 12, 545–560.
- [4] Hefford, M.A., Dupont, C., MacCallum, J., Parker, M.H. and Beauregard, M. (1999) *Eur. J. Biochem.* 262, 467–474.
- [5] Williamson, M. (1996) *Trends Biotechnol.* 14, 449–450.
- [6] MacCallum, J.D., Hefford, M.A., Omar, S. and Beauregard, M. (1997) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 66, 83–93.
- [7] Grundy, J.E., Morrison, J.J., MacCallum, J.D., Wirtanen, L. and Beauregard, M. (1998) *J. Biotechnol.* 63, 9–15.
- [8] Johnson, W.C. (1999) *Proteins Struct. Funct. Genet.* 35, 307–312.
- [9] Pace, C.N., Shirley, B.A. and Thomson, J.A. (1989) in: *Protein Structure, a Practical Approach* (Creighton, T.E., Ed.), pp. 311–337, IRL press, Oxford.
- [10] Krishnamoorthy, U., Sniffin, C.J., Stern, M.D. and Van Soest, P.J. (1983) *Br. J. Nutr.* 50, 555–568.
- [11] Morrison, J.J., McNally, D., Navidzadeh, A. and Beauregard, M. (2000) *Appl. Biochem. Biotech.* (in press).
- [12] Handel, T.M., Williams, S.A., Menyhard, D. and DeGrado, W.F. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115, 4457–4460.
- [13] Semisotnov, G.V., Rodionova, N.A., Razgulyaev, O.I., Uversky, V.N., Gripas, A.F. and Gilmanshin, R.I. (1991) *Biopolymers* 31, 119–128.
- [14] Doig, A.J. and Sternberg, J.E. (1995) *Protein Sci.* 11, 2247–2251.
- [15] Koel, P. and Levitt, M. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 12524–12528.
- [16] Honda, Y., Fukamizo, T., Okajima, T., Goto, S., Boucher, I. and Brzezinski, R. (1999) *Biochem. Biophys. Acta* 1429, 365–376.
- [17] Ragone, R., Facchiano, A., Facchiano, A.M. and Colonna, G. (1989) *Protein Eng.* 2, 497–504.
- [18] McNabb, W.C., Spencer, D. and Higgins, T.J. (1994) *J. Sci. Food Agric.* 64, 53–59.
- [19] Parker, M.H. and Hefford, M.A. (1998) *Biotechnol. Appl. Biochem.* 28, 69–76.