

Modèles en Sciences de la Vie
Chapitre 2
Modèles
Mesure des fonctions des protéines

V. Garlatti
virginie.garlatti@univ-tln.fr
Bureau U 025

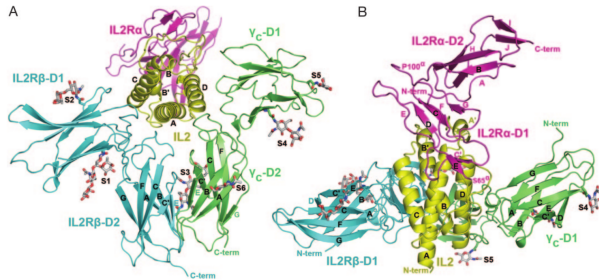
2023

Interactions protéines-ligands au coeur de la spécificité des processus du vivant

Reconnaître :

- ◇ un messager
- ◇ une PAMPs
- ◇ un antigène
- ◇ son substrat
- ◇ une molécule à transporter

Structure du récepteur à l'IL2



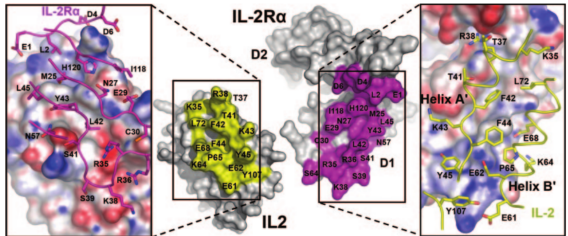
(STAUBER et al., 2006)

Interactions protéines-ligands au cœur de la spécificité des processus du vivant

Reconnaître :

- ◇ un messager
- ◇ une PAMPs
- ◇ un antigène
- ◇ son substrat
- ◇ une molécule à transporter

Interaction IL2/ILR2 α



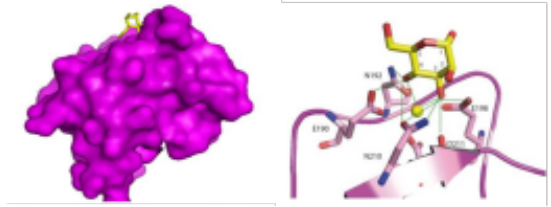
(STAUBER et al., 2006)

Interactions protéines-ligands au coeur de la spécificité des processus du vivant

Reconnaître :

- ◇ un messenger
- ◇ **une PAMPs**
- ◇ un antigène
- ◇ son substrat
- ◇ une molécule à transporter

Interaction MBL/NacGlc

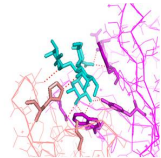
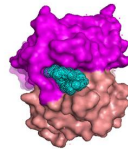
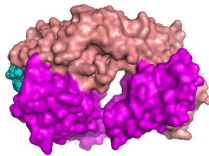


Interactions protéines-ligands au coeur de la spécificité des processus du vivant

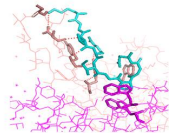
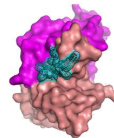
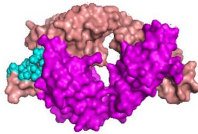
Reconnaître :

- ◇ un messager
- ◇ une PAMPs
- ◇ **un antigène**
- ◇ son substrat
- ◇ une molécule à transporter

Interaction Ac-Ag



Ac-lewisYAg (3EYV)



Ac-Peptide (HIV) (3GHB)

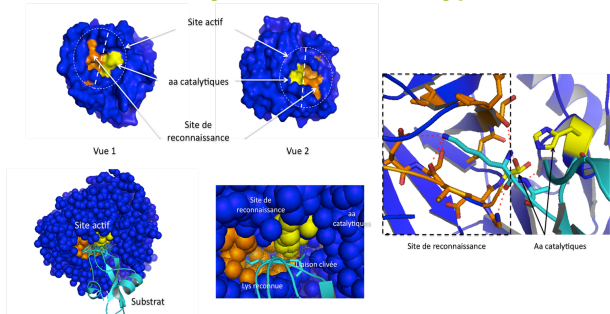
Burke et al. (2009) Structure 17: 1538-1546; Farruga et al. PLoS One. 2009 Nov 10; 4(11)

Interactions protéines-ligands au coeur de la spécificité des processus du vivant

Reconnaître :

- ◇ un messenger
- ◇ une PAMPs
- ◇ un antigène
- ◇ **son substrat**
- ◇ une molécule à transporter

Interaction Enzyme-substrat : Trypsine



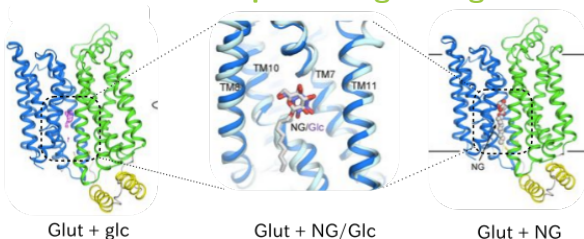
Interactions protéines-ligands au coeur de la spécificité des processus du vivant

Reconnaître :

- ◇ un messenger
- ◇ une PAMPs
- ◇ un antigène
- ◇ son substrat

- ◇ une molécule à transporter

Interaction transporteur-ligand : glut1



Interactions protéines-ligands au coeur de la spécificité des processus du vivant

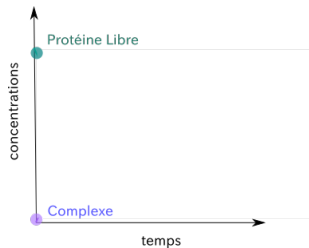
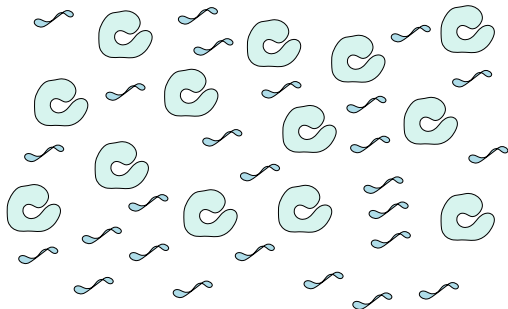
Objectif :

Apprendre à mesurer et à quantifier les interactions protéines ligands

Dynamique des interactions

Une interaction n'est jamais figée !

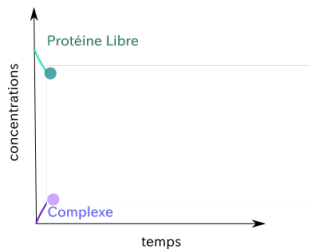
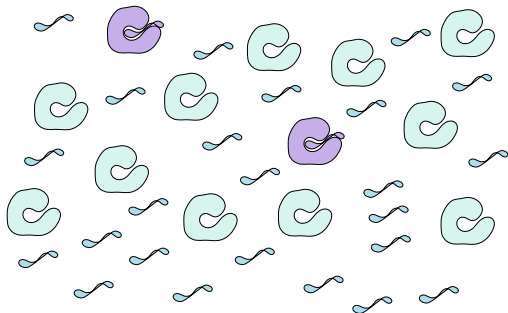
Démarrage de la réaction : $t=0s$



Dynamique des interactions

Une interaction n'est jamais figée !

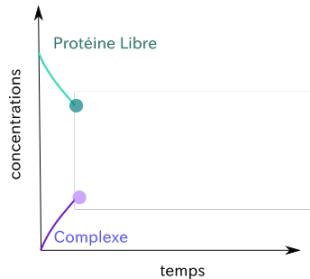
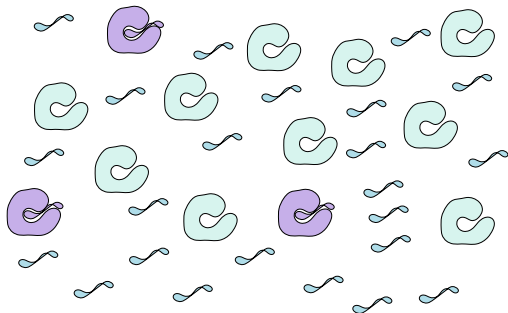
Réaction pré-équilibre



Dynamique des interactions

Une interaction n'est jamais figée !

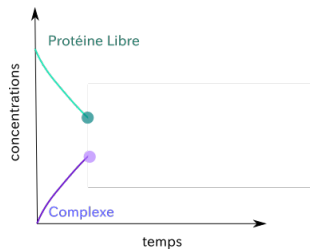
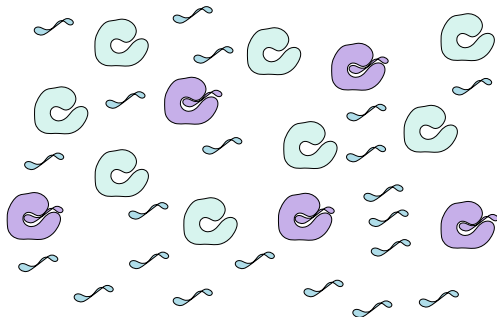
Réaction pré-équilibre



Dynamique des interactions

Une interaction n'est jamais figée !

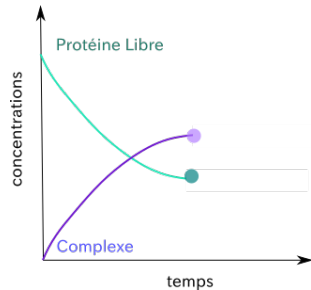
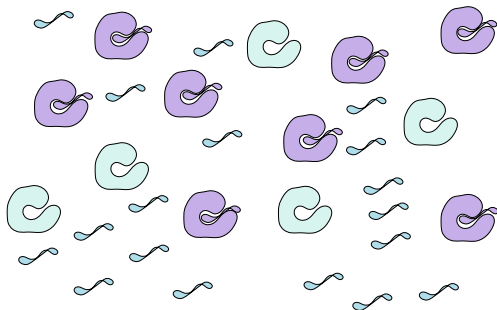
Réaction pré-équilibre



Dynamique des interactions

Une interaction n'est jamais figée !

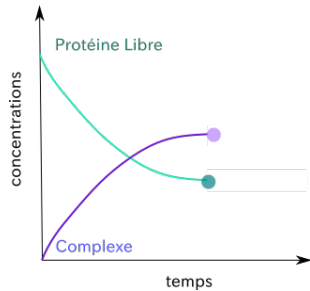
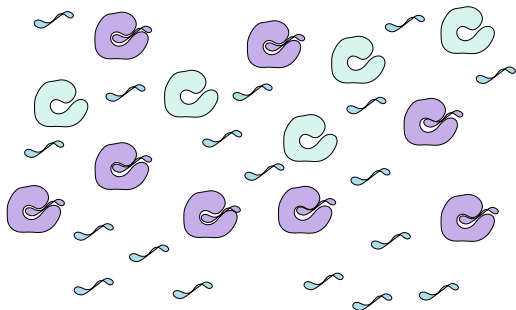
A l'équilibre



Dynamique des interactions

Une interaction n'est jamais figée !

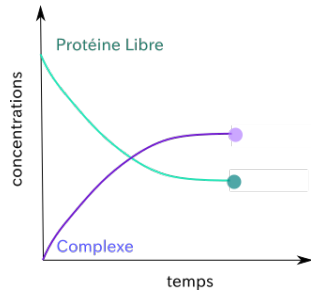
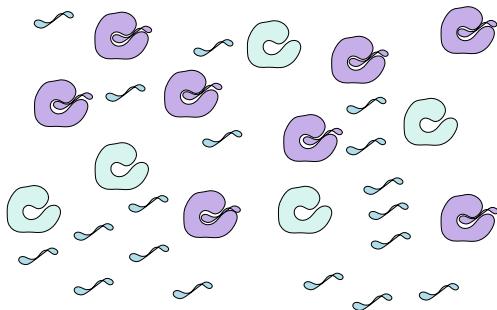
A l'équilibre



Dynamique des interactions

Une interaction n'est jamais figée !

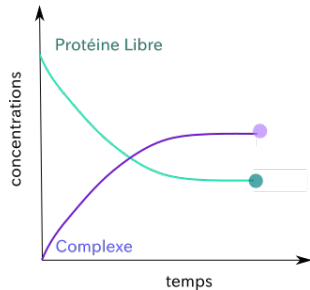
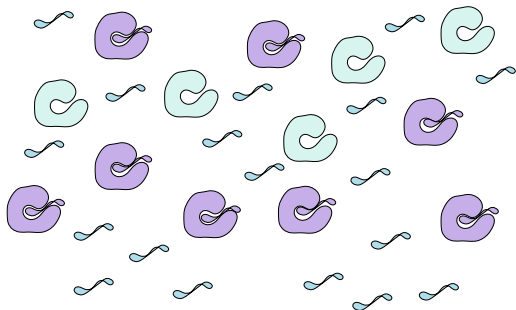
A l'équilibre



Dynamique des interactions

Une interaction n'est jamais figée !

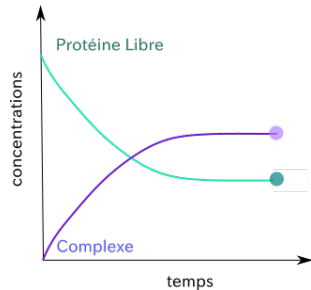
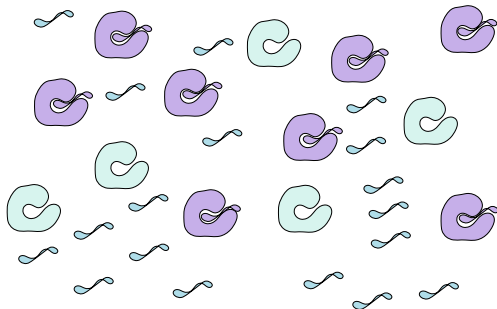
A l'équilibre



Dynamique des interactions

Une interaction n'est jamais figée !

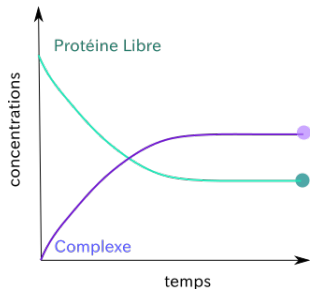
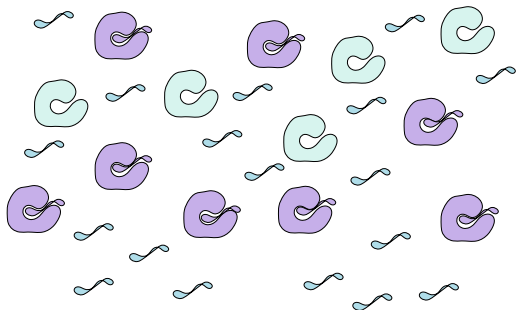
A l'équilibre



Dynamique des interactions

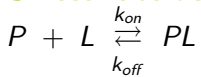
Une interaction n'est jamais figée !

A l'équilibre



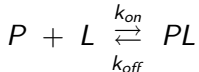
La réaction de fixation

Un seul site de fixation



La réaction de fixation

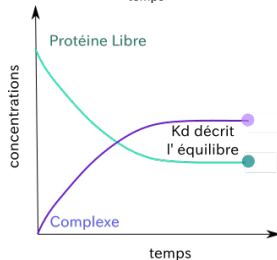
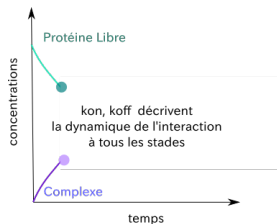
Un seul site de fixation



Deux types de constantes :

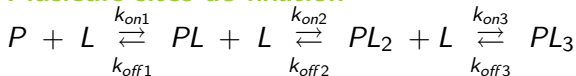
- ◇ Constantes de vitesse : k_{on} , k_{off}
- ◇ Constante thermodynamique de dissociation K_D

$$K_D = \frac{\prod_{k=1}^n P_k^\infty}{\prod_{k=1}^n R_k^\infty} \quad (1)$$



La réaction de fixation

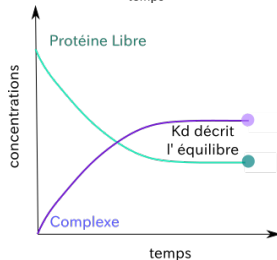
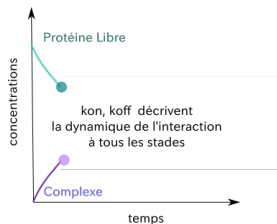
Plusieurs sites de fixation



Deux types de constantes :

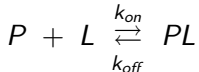
- ◇ Constantes de vitesse : k_{on} , k_{off}
- ◇ Constante thermodynamique de dissociation K_D

$$K_D = \frac{\prod_{k=1}^n P_k^\infty}{\prod_{k=1}^n R_k^\infty} \quad (1)$$



La réaction de fixation

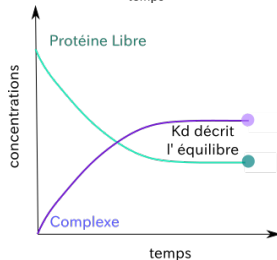
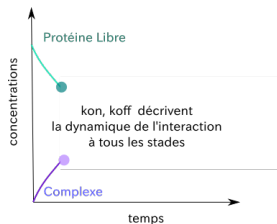
Un seul site de fixation



Deux types de constantes :

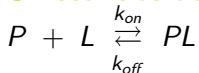
- ◇ Constantes de vitesse : k_{on} , k_{off}
- ◇ Constante thermodynamique de dissociation K_D

$$K_D = \frac{\prod_{k=1}^n P_k^\infty}{\prod_{k=1}^n R_k^\infty} \quad (1)$$



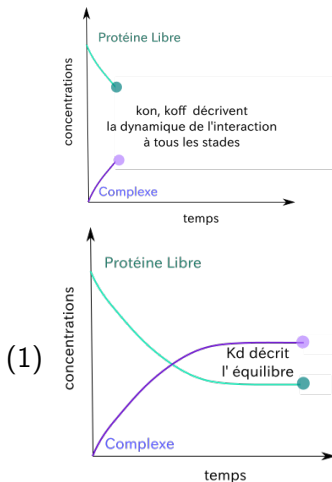
La réaction de fixation

Un seul site de fixation



Equation 1 site :

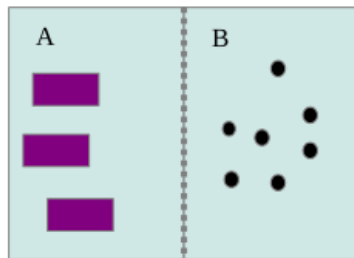
$$K_D = \frac{(P) * (L)}{(PL)} = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$



Mesure à l'équilibre et obtention du K_D : la dialyse à l'équilibre

Expérience

- ◇ à $t = 0$
- ◇ Membrane hémiperméable
- ◇ Deux compartiments
 - ◇ A : protéine
 - ◇ B : Ligand
- ◇ seul le ligand passe

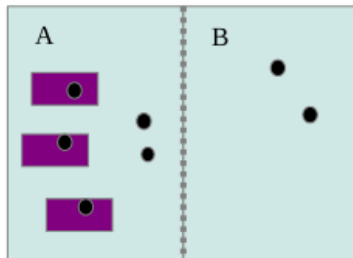


Tps = 0h

Mesure à l'équilibre et obtention du K_D : la dialyse à l'équilibre

Expérience

- ◇ à $t=0$
- ◇ A l'équilibre :
 - ◇ A : Lié + Libre
 - ◇ B : Libre



Tps = equilibrium

Mesure à l'équilibre et obtention du K_D : la dialyse à l'équilibre

Expérience

- ◇ à $t = 0$
- ◇ A l'équilibre :
- ◇ A refaire pour une gamme de $[L]$

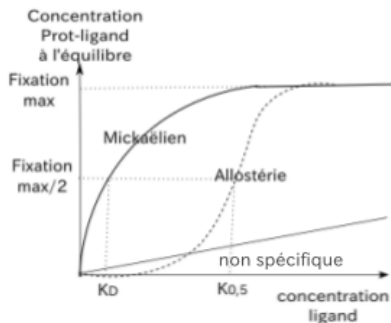
Mesure à l'équilibre et obtention du K_D : la dialyse à l'équilibre

Expérience

- ◇ à $t = 0$
- ◇ A l'équilibre :
- ◇ A refaire pour une gamme de $[L]$

Résultats

- ◇ Ligand libre, ligand lié
- ◇ Courbe (lié) = $f(\text{libre})$
- ◇ Calcul K_D

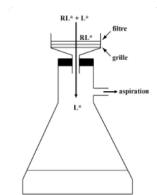


Mesure à l'équilibre et obtention du K_D :

Filtration à l'équilibre

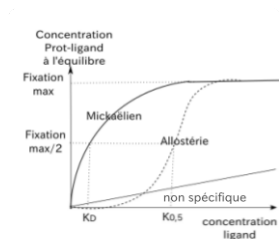
Expérience

- ◇ Réaction en présence ligand marqué
- ◇ A l'équilibre, filtration :
 - ◇ seul le ligand libre passe
 - ◇ le complexe reste sur le filtre
 - ◇ Mesure du marquage filtre et filtrat
- ◇ A refaire pour une gamme de $[L]$



Résultats

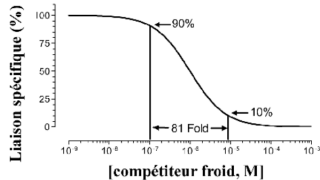
- ◇ Ligand libre, ligand lié
- ◇ Courbe (lié) = $f(\text{libre})$
- ◇ Calcul K_D



Mesure hors équilibre et obtention du k_{on} , k_{off} : déplacement d'équilibre

Expérience

- ◇ Réaction en présence ligand marqué
- ◇ A l'équilibre
 - ◇ Ajout d'un ligand froid
 - ◇ Nouvel équilibre
 - ◇ Mesure ligand marqué lié
- ◇ A refaire différentes $[L]$ froid



Expérience

- ## Résultat

-

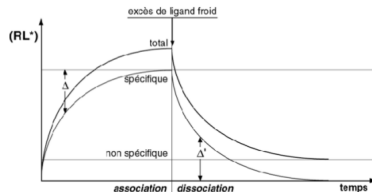
Cheng et Prusoff en 1973

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{(L)}{K_d}} \quad (2)$$

$$K_D = \text{ligand radiomarqué (affinité)}.$$

Expérience

- ◇ Ajout L radioactif
- ◇ Mesure cinétique de RL*
- ◇ Ajout ligand froid
- ◇ Mesure cinétique de L*



Mesure hors équilibre et obtention du k_{on} , k_{off} :

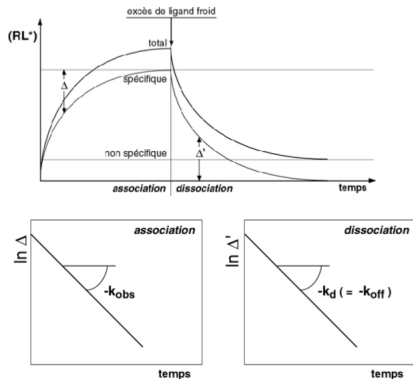
Mesure cinétique association/dissociation par compétition

Expérience

- ◇ Ajout L radioactif
- ◇ Mesure cinétique de RL^*
- ◇ Ajout ligand froid
- ◇ Mesure cinétique de L^*

Résultats

- ◇ k_{off} k_{on}
- ◇ K_D ,

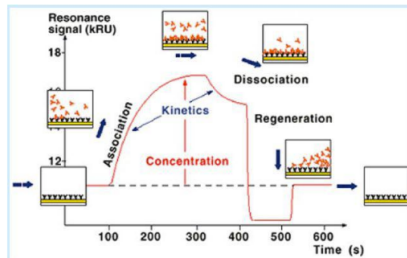


Mesure hors équilibre et obtention du k_{on} , k_{off} :

Mesure cinétique association/dissociation par SPR

Expérience

- ◇ Fixation Prot sur puce
- ◇ Ajout d'un flux de tampon avec L
- ◇ Ajout de tampon sans L
- ◇ Mesure complexe en continu



Mesure hors équilibre et obtention du k_{on} , k_{off} :

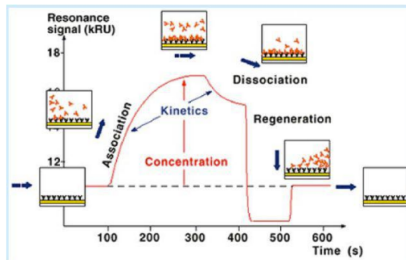
Mesure cinétique association/dissociation par SPR

Expérience

- ◇ Fixation Prot sur puce
- ◇ Ajout d'un flux de tampon avec L
- ◇ Ajout de tampon sans L
- ◇ Mesure complexe en continu

Résultats

- ◇ k_{off} k_{on}
- ◇ K_D ,



La démonstration mathématique

Réactions chimiques :



Constantes

$$k_{\text{on}} * [P] * [L] = k_{\text{off}} * [PL] \quad (4)$$

$$\frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} = \frac{[P] * [L]}{[PL]} = K_D = \frac{1}{K_a} \quad (5)$$

Les équations obtenues dans des interactions non coopératives 1 site

Démonstration mathématique en TD1

Les courbes obtenues dans des interactions non coopératives 1 site

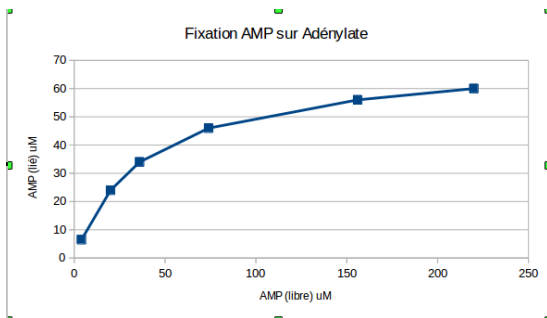
Exercice : la fixation de l'AMP sur l'adénylate kinase a été mesurée par dialyse à l'équilibre. Les résultats sont présentés ci-dessous :

$[AMP]_{lie} (\mu M)$	6,5	24	34	46	56	60
$[AMP]_{libre} (\mu M)$	4	20	36	74	156	220

Tracez la courbe $Lié = f(libre)$

Les courbes obtenues dans des interactions non coopératives 1 site

Exercice : la fixation de l'AMP sur l'adénylate kinase a été mesurée par dialyse à l'équilibre. Les résultats sont présentés ci-dessous :

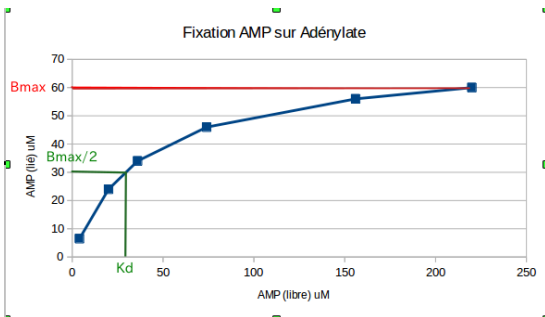


Plateau = saturation =
phénomène spécifique
(présence d'un site)

Hyperbole : liaison non
coopérative dite de type
Mickaëlienne

Les courbes obtenues dans des interactions non coopératives 1 site

Exercice : la fixation de l'AMP sur l'adénylate kinase a été mesurée par dialyse à l'équilibre. Les résultats sont présentés ci-dessous :



Mesure graphique des constantes :

$B_{\max}$, K_D

Peu précis

Les courbes obtenues dans des interactions non coopératives 1 site

Définition : Fonction de saturation : rapport nombre moyen de sites occupés sur le nombre total de sites soit ici $\frac{B}{B_{max}} = \bar{Y}_s$.

$[AMP]_{lie} (\mu M)$	6,5	24	34	46	56	60
$[AMP]_{libre} (\mu M)$	4	20	36	74	156	220

Calculer et tracer la courbe de saturation

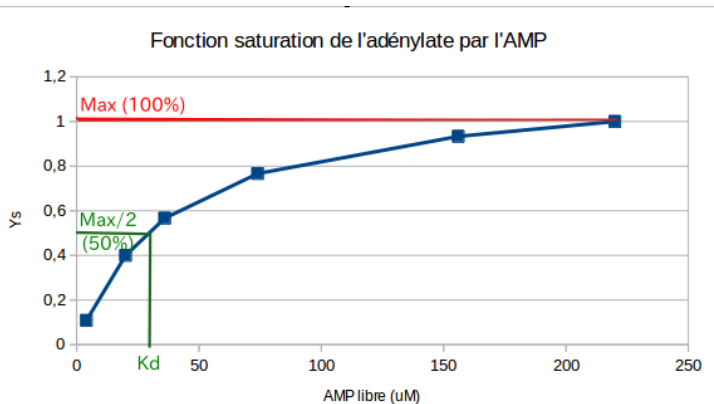
Les courbes obtenues dans des interactions non coopératives 1 site

Définition : Fonction de saturation : rapport nombre moyen de sites occupés sur le nombre total de sites soit ici $\frac{B}{B_{max}} = \bar{Y}_s$.

$\bar{Y}_s$	0,1	0,4	0,56	0,76	0,93	1
$[AMP]_{libre} (\mu M)$	4	20	36	74	156	220

Les courbes obtenues dans des interactions non coopératives 1 site

Définition : Fonction de saturation : rapport nombre moyen de sites occupés sur le nombre total de sites soit ici $\frac{B}{B_{max}} = \bar{Y}_s$.



Les courbes obtenues dans des interactions non coopératives 1 site

Linéarisation grâce à la représentation de Scatchard

$$\frac{B}{F} = f(B).$$

$$\frac{[B]}{[L]} = \frac{B_{max}}{K_d} - \frac{1}{K_d} * [B] \quad (6)$$

$[AMP]_{lie} (\mu M)$	6,5	24	34	46	56	60
$[AMP]_{libre} (\mu M)$	4	20	36	74	156	220

Calculer et tracer la courbe en représentation de Scatchard

Les courbes obtenues dans des interactions non coopératives 1 site

Linéarisation grâce à la représentation de Scatchard

$$\frac{B}{F} = f(B).$$

$$\frac{[B]}{[L]} = \frac{B_{max}}{K_d} - \frac{1}{K_d} * [B] \quad (7)$$

$[AMP]_{lie} (\mu M)$	6,5	24	34	46	56	60
$[AMP]_{lie}/[AMP]_{libre}$	1,6	1,2	0,94	0,6	0,36	0,27

Les courbes obtenues dans des interactions non coopératives 1 site

Linéarisation grâce à la représentation de Scatchard

$$\frac{B}{F} = f(B).$$

Calculez K_D à partir de l'équation de la droite.

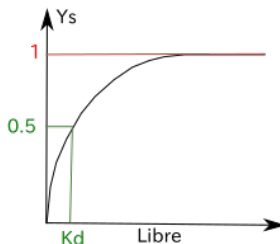
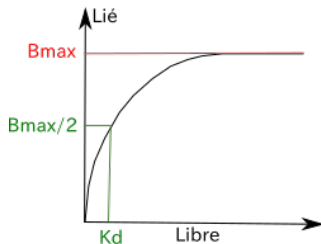
Les courbes obtenues dans des interactions non coopératives 1 site : Bilan

Méthode

- ◇ Courbe Lié = $f(\text{libre})$ hyperbole
- ◇ Fonction saturation : hyperbole

Ces courbes montrent :

- ◇ : fixation Michaelienne (non coopérative)
- ◇ : peu précis pour les constantes



Les courbes obtenues dans des interactions non coopératives 1 site : Bilan

Méthode

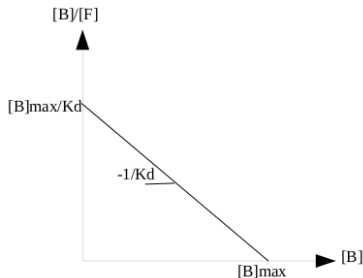
◇ Linérisation de Scatchard

$$\diamond \frac{[B]}{[L]} = \frac{B_{max}}{K_d} - \frac{1}{K_d} * [B]$$

Cette droite montre :

◇ : fixation Mickaelienne (non coopérative)

◇ : calcul précis des constante



Les interactions non coopératives n sites équivalents : les équations

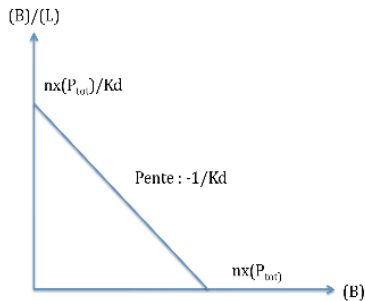
Expression de la fonction de saturation

$$\bar{Y}_s = \frac{\text{concentration-ligand-lie}}{\text{concentration-totale-en-site}} = \frac{[bound]}{B_{max}} = \frac{\sum_{i=1}^n [PL_i]}{n*[P]_{tot}}$$

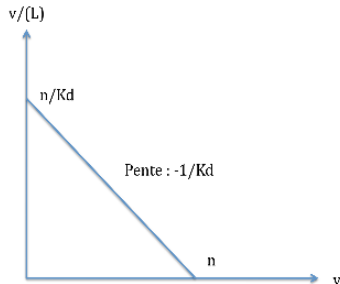
Expression du nombre moyen de sites occupés par molécule de protéine :

$$\bar{\nu} = \frac{\text{concentration-ligand-lie}}{\text{concentration-protéine-tot}} = \frac{[bound]}{P_{tot}} = \frac{\sum_{i=1}^n [PL_i]}{[P]_{tot}} = \bar{Y}_s * n$$

Les interactions non coopératives n sites équivalents : traitement des données

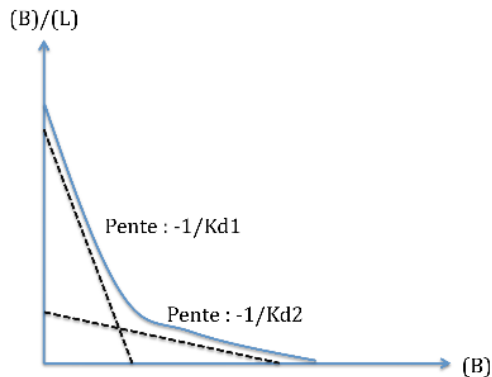


$$\frac{[bound]}{[L]} = \frac{1}{Kd} * (n * [P]_{tot} - [Bound])$$



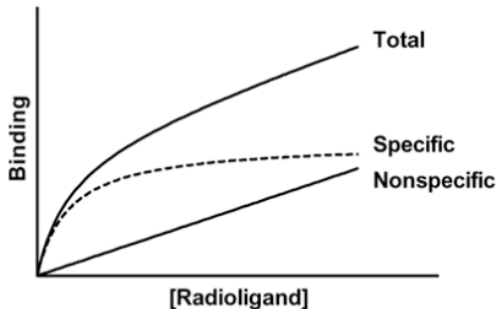
$$\frac{\bar{v}}{[L]} = \frac{1}{K_d} * (n - \bar{v})$$

Les interactions non coopératives n sites non équivalents n sites spécifiques avec des affinités différentes



Les interactions non coopératives n sites non équivalents

Un site spécifique et un site de liaison non spécifique





STAUBER, Deborah J. et al. (2006). “Crystal structure of the IL-2 signaling complex : Paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor” . In : *PNAS* 103.8.