



To bind or not to bind metals, that is the question

## Unravelling new metal- or redox-dependent proteins and processes in plants

Responsable scientifique : Nicolas ROUHIER (UMR 1136 Interactions Arbres/Micro-organismes)

Collaborations : Pr Roland Lill (Univ. of Marburg) and Pr Johannes Herrmann (Univ. of Kaiserslautern)

(Rapport intermédiaire)

### Contexte —

De nombreuses fonctions cellulaires sont contrôlées en plusieurs points par des réactions d'oxydo-réduction, comprenant des réactions de transfert d'électrons catalysées par des métalloprotéines, notamment celles liant du fer et du cuivre, et par des protéines contenant des groupements thiol réactifs permettant la formation et la réduction de ponts disulfure. En contrôlant certains aspects de développement et de la réponse au stress, ainsi que l'efficacité de la photosynthèse, ces mécanismes redox sont donc particulièrement cruciaux chez les plantes. Les résidus cystéinyles se retrouvent au centre de ces réactions agissant en tant que centres catalytiques, que ligands métalliques ou commutateurs de la signalisation redox à travers leur capacité à adopter plusieurs états d'oxydation au sein des protéines en réponse aux variations de l'état redox cellulaire.

### Objectifs —

Bien qu'il n'y ait pas de signature unique, la présence de motifs CXXC ou CxC conservés au sein des protéines est particulièrement adaptée à la formation de ponts disulfure et/ou à la coordination des métaux comme c'est le cas des ferrédoxines liant des centres fer-soufre de type Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>. En identifiant des protéines de fonction inconnue et possédant un ou plusieurs motifs CXXC conservés, l'objectif du projet MetOx est ainsi d'identifier de nouvelles protéines soit régulées de manière redox soit liant des métaux.

### Démarche —

A partir d'une analyse *in silico* de plusieurs génomes de plantes et de données bibliographiques, nous avons sélectionné des protéines candidates et effectué une caractérisation biochimique et structurale approfondie des protéines recombinantes correspondantes, avant de caractériser les rôles biologiques des candidats les plus prometteurs en utilisant des approches génétiques.

### Résultats marquants —

- Publication d'un article de méthode décrivant des protocoles expérimentaux dédiés à l'étude des modifications oxydatives et des propriétés redox des protéines. **Zannini et al., Methods Mol. Biol. 2017.**
- En dépit de la présence d'une signature WCKHC, la PDI-A de peuplier ne possède pas l'activité oxydoréductase classique des membres de la famille des protéine disulfure isomérase mais est capable de lier *in vitro* un centre [Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>] au sein d'un dimère. C'est le premier exemple de ce type pour une protéine de cette famille, suggérant qu'elle pourrait avoir des rôles inédits. **Selles et al., Plos one 2017.**

- En analysant les propriétés biochimiques et fonctionnelles des protéines ERV1 et MIA40 de plantes notamment par des mesures d'activité *in vitro* et par la complémentation de mutants de levure *erv1* et *mia40*, nous avons observé que la protéine ERV1 d'*Arabidopsis thaliana* peut favoriser l'import de protéines et le repliement oxydatif des protéines dans l'espace intermembranaire mitochondrial indépendamment de MIA40, alors que les 2 protéines sont essentielles chez les levures et les animaux. Conformément à l'absence de Mia40 chez de nombreux protistes, notre étude suggère que ce système de repliement oxydatif a évolué progressivement à partir d'un système où *Erv1* agirait seul vers un système où *Mia40* aurait été ajouté afin d'améliorer la spécificité du substrat. **Peleh et al., BMC Biology 2017.**
- Nous avons observé que deux thiorédoxines mitochondriales, possédant une signature typique de la famille des thiorédoxines (WCGHC), ont la capacité d'incorporer un centre  $[Fe_2S_2]$  *in vitro*. Bien que la signification physiologique reste inconnue, c'est la première démonstration qu'une thiorédoxine avec cette signature possède cette propriété. Comprendre les déterminants structuraux serait particulièrement intéressant. **Article en préparation pour une issue spéciale dans Antioxydants.**

### Perspectives —

Poursuivre l'analyse fonctionnelle de l'ensemble de ces protéines :

- Déterminer l'importance du centre Fe-S dans le cas de la PDI-A et des thiorédoxines mitochondriales.
- Etudier les spécificités de substrats d'ERV1 et de MIA40 de plantes *in vitro*

### Valorisation —

#### Publications:

Selles B, **Zannini F**, Couturier J, Jacquot JP, **Rouhier N**. Atypical protein disulfide isomerases (PDI): Comparison of the molecular and catalytic properties of poplar PDI-A and PDI-M with PDI-L1A. **PLoS One**. 2017, 12:e0174753.

**Zannini F**, Couturier J, Keech O, **Rouhier N**. In vitro alkylation methods for assessing the protein redox state. **Methods Mol. Biol.** 2017, 1653:51-64.

Peleh V, **Zannini F**, Backes S, **Rouhier N\***, Herrmann JM\*. *Erv1* of *Arabidopsis thaliana* can directly oxidize mitochondrial intermembrane space proteins in the absence of redox-active *Mia40*. **BMC Biology**. 2017, 15(1):106. doi: 10.1186/s12915-017-0445-8.

\*Corresponding authors

#### Conferences: Oral communication:

- EMBO Conference on Redox Biology. Moscow (Russia): 17-23 July 2017. Herrmann JM. The mitochondrial disulfide relay.

#### Posters :

- Thiol oxidation in toxicity and signalling. Sant Feliu de Guixols, Spain, 17 – 21 September 2017. *Mia40* is not just a "poor man's thioredoxin". Backes S, Peleh V, Rouhier N, Herrmann JM

- Thiol oxidation in toxicity and signalling. Sant Feliu de Guixols, Spain, 17 – 21 September 2017. Comparison of the redox properties of plant and yeast MIA40/ERV1 couples. Zannini F, Peleh V, Herrmann JM, Rouhier N