Découverte de motifs protéiques liés à des maladies neurodégénératives

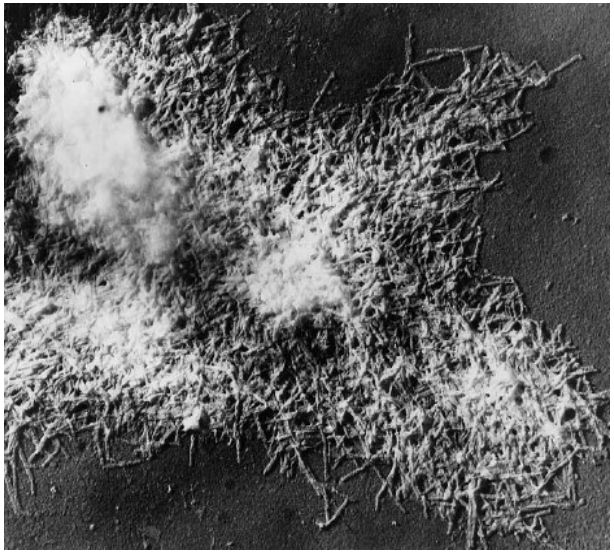
3èmes rencontres autour de la plate-forme bioinformatique

Sandrine Pawlicki
Equipe Structure et Dynamique des Macromolécules
UMR CNRS 6026
Université de Rennes 1

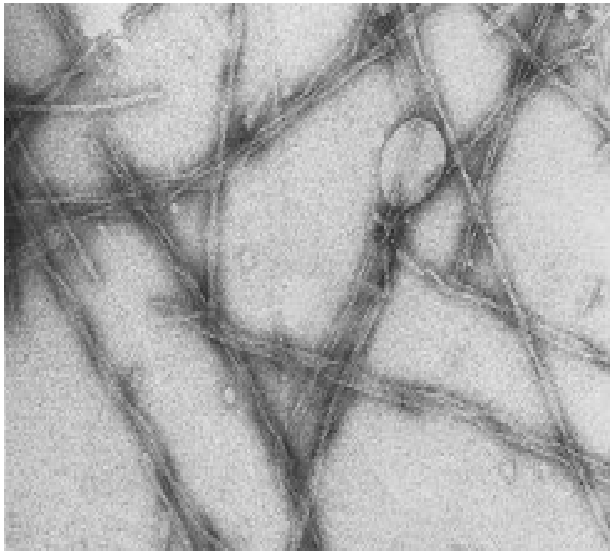
- ◊ Maladie de Creutzfeldt-Jacob
- ◊ Maladie de Kuru
- ◊ Maladie d'Alzheimer
- ◊ Maladie de Parkinson
- ◊ Démences héréditaires

Un point commun ...

le comportement aberrant de certaines protéines



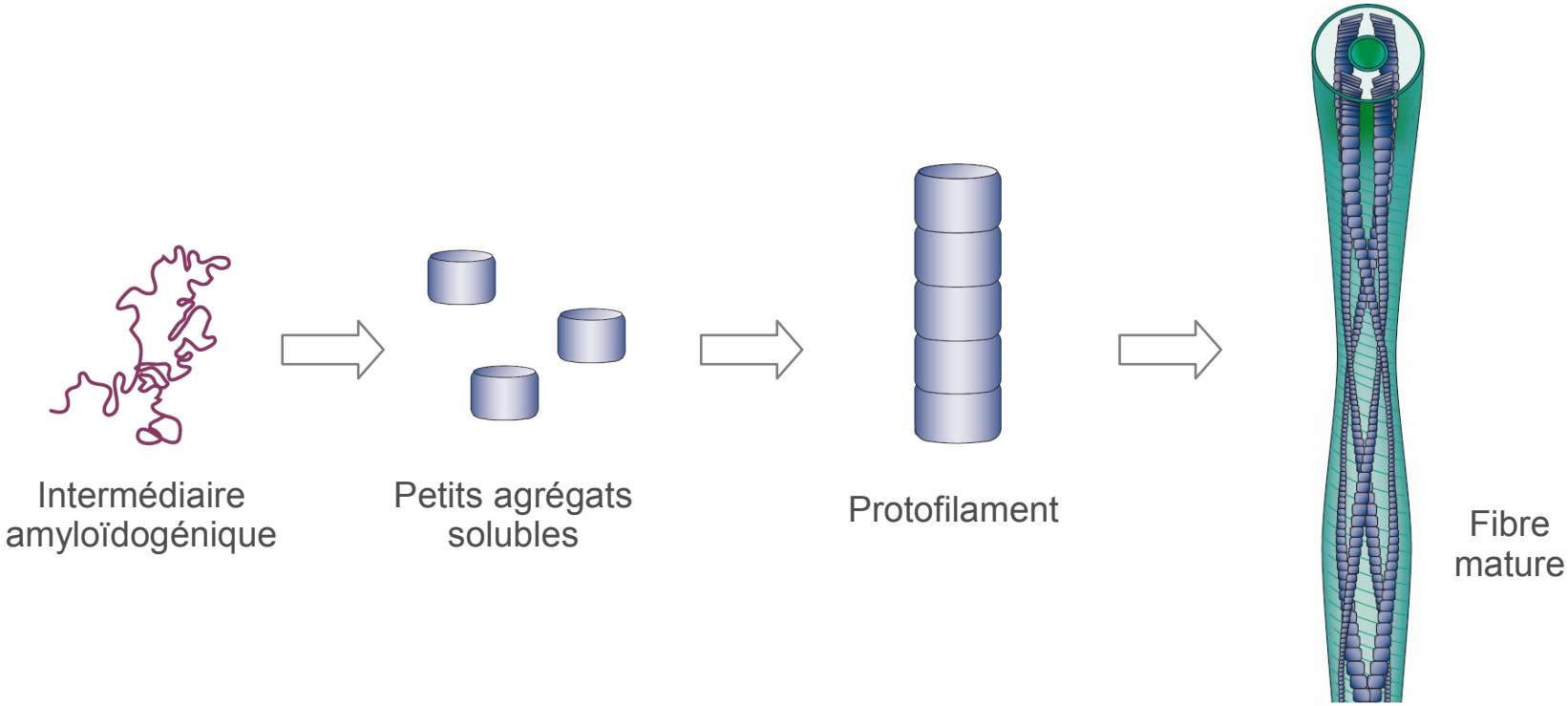
X 70 000



X 200 000

Agrégats de fibres amyloïdes observés au microscope électronique

Modèle de la formation des fibres amyloïdes



- ◊ Structure cross-β (empilement de feuillets β perpendiculairement à l'axe de la fibre)
- ◊ Fibres résistantes aux protéases

Conditions induisant la formation d'amyloïde

- Protéolyse partielle
  - 7 familles de protéines amyloïdes pour lesquelles seul un fragment s'agrège
- Mutations déstabilisantes
  - 10 familles de protéines amyloïdes pour lesquelles des mutations sont à l'origine de l'agrégation
  - 5 familles de protéines amyloïdes pour lesquelles il y a agrégation de la protéine normale ou de mutants
- Surexpression des protéines

Les différents types d'amyloïdoses

- Amyloïdoses systémiques
  - Causées par des protéines sécrétées et circulantes
  - Dégâts physiques au niveau des tissus et perturbation de l'activité des récepteurs et canaux cellulaires
- Amyloïdoses limitées à un seul organe
  - Causées par des protéines sécrétée non circulantes
  - Dégâts physiques au niveau des tissus et perturbation de l'activité des récepteurs et canaux cellulaires
- Amyloïdoses intracellulaires
  - Causées par des protéines non sécrétées

Les familles de protéines amyloïdes

- 30 familles de protéines amyloïdes, avec près de 1200 séquences
  - Amyloïde A sérique, calcitonine, cystatine C, fibrinogène a, tau, APP, …

- Le cas particulier des prions
  - Particule infectieuse dépourvue d'acide nucléique
  - Sont capables de propager le phénomène d'agrégation à d'autres organismes

  - 6 familles de protéines prioniques
    - 1 chez les vertébrés : PrP (Prion Protein)

Les protéines amyloid-like et prion-like

- Découverte de nouvelles protéines possédant des capacités d'agrégation similaires à celles des protéines strictement amyloïdes et à celles des protéines prioniques

- Amyloid-like
  - Microcine E492
    - Bacteriocine produite par Klebsiella pneumoniae
    - Régulation de son activité par la formation de fibres amyloïdes

- Prion-like
  - ApCPEB1
    - Protéine neuronale impliquée dans la régulation de la traduction des ARNm
    - La forme prionique pourrait être impliquée dans la mémoire à long terme
  - Tia-1
    - Arrêt de la traduction en cas de stress grâce à la formation de granules de stress

Analyse comparative des protéines amyloïdes

- ◊ Hétérogénéité des conditions induisant la formation d'amyloïde
- ◊ Hétérogénéité des amyloïdoses
- ◊ Hétérogénéité des familles de protéines

- ◊ Pourtant, un point commun, la formation de fibres amyloïdes
  - ◊ Organisation cross-β
  - ◊ Résistance aux protéases

→ Existence d'un ou plusieurs facteur commun

◊ ***AmyPDB, Amyloid Protein DataBase***

◊ Découverte et analyse de motifs

◊ Cas du motif V-Q-I-V-x-K

◊ Conclusions et perspectives

AmyPDB, Amyloid Protein DataBase

Banques généralistes

- ◊ Uniprot, Medline, Prosite

Outils bioinformatiques

- ◊ Clustal, Pratt, Wapam, Inclusion Test

AmyPDB, un environnement de travail quotidien

- ◊ Sets de travail
- ◊ Data mining

◊ AmyPDB, Amyloid Protein DataBase

◊ ***Découverte et analyse de motifs***

◊ Cas du motif V-Q-I-V-x-K

◊ Conclusions et perspectives

Découverte et analyse de motifs

- ◊ Découverte de motifs en masse avec Advanced Pratt
- ◊ Analyse de la sensibilité et de la sélectivité des motifs avec Wapam
- ◊ Comparaison de motifs avec Inclusion Tool
- ◊ Data mining avec AmyPDB
- ◊ Recherche de nouveaux gènes codant potentiellement pour des protéines amyloïdes avec Wapam

Découverte de motifs protéiques

- Découverte de motifs de classe F :
  - classe A : T-C-T-T-G-A
  - classe B : D-R-C-C-x(2)-H-D-x-C
  - classe C : G-G-G-T-F-[ILV]-[ST]-[ILV]
  - classe D : V-x-P-x(2)-[RQ]-x(4)-G-x(2)-L-[LM]
  - classe E : G-C-x(1,3)-C-P-x(8,10)-C-C
  - **classe F : C-x(2,4)-C-x(3)-[ILVFYC]-x(8)-H-x(3,5)-H**
  - classe G : D-T-A-G-Q-E-*-L-V-G-N-K
  - classe H : D-T-A-G-[NQ]-*-L-V-G-N-[KEH]
  - classe I : D-T-A-x(2,5)-G-[NQ]-*-L-V-G-N-[KEH]

Découverte de motifs avec Advanced Pratt

- Découverte de motifs spécifiques de chaque famille de protéines
  - Dont certains motifs potentiellement impliqués dans l'agrégation

- Méthodologie utilisée
  - Choix des paramètres d'Advanced Pratt
  - Création d'un jeu de séquences pour chaque famille protéique
  - Découverte de motifs pour chaque jeu de séquences
  - Intégration des résultats dans AmyPDB

- Découverte de motifs communs à plusieurs familles
  - Utilisation de combinaisons des jeux de séquences de chaque famille

Paramétrage d'Advanced Pratt

- Pratt permet l’utilisation de clusters d’acides aminés
  - Clusters en fonction des propriétés physico-chimiques
    - Accessibilité, charge, hydophobicité, volume, masse, …
  - Clusters personnels
    - Propension des acides aminés à former des feuillets β ou des hélices α
    - Propension des acides aminés à se retrouver au niveau des interfaces d'interaction entre protéines

Analyse de la qualité des motifs avec Wapam

- Pour chaque motif, recherche dans Uniprot des protéines contenant ce motif
- Evaluation du nombre de faux négatifs et de faux positifs

Vrais positifs

Protéines de la famille considérée contenant le motif

Faux négatifs

Protéines de la famille considérée ne contenant pas le motif

Faux positifs

Protéines contenant le motif mais n'appartenant pas à la famille considérée

Protéines amyloïdes

Protéines non amyloïdes

Data mining avec AmyPDB

- Résultats d'Advanced Pratt, de Wapam et d'Inclusion Test intégrés dans AmyPDB
- Motifs et résultats d'analyses mis en corrélation
  - Requêtes spécifiques afin de trier et sélectionner les motifs selon certains critères
- Mise en évidence des motifs les plus intéressants parmi les 3300 motifs déjà stockés dans AmyPDB

◊ AmyPDB, Amyloid Protein DataBase

◊ Découverte et analyse de motifs

◊ ***Cas du motif V-Q-I-V-x-K***

◊ Conclusions et perspectives

Tau, MAP 2 et MAP 4

- Tau (Tubule Associated Unit)
- MAP 2 (Microtubule Associated Protein 2)
- MAP 4 (Microtubule Associated Protein 4)

  - Tau et MAP 2 : expression dans le système nerveux
  - MAP 4 : expression dans d'autres tissus

  - Assemblage et stabilisation des microtubules
  - Domaine répété dans la région C-terminale

  - Tau et MAP2 impliquées dans la maladie d'Alzheimer

Motif V-Q-I-V-x-K

◊ Etude de Tau par Von Bergen et al., 2000

→ Détermination du plus petit fragment de Tau impliqué dans l'agrégation

→ Séquence **VQIVYK** (PHF6) située au début de la répétition 3

◊ Tau

◊ MAP 2

◊ MAP 4

Peptides synthétisés

- ◊ Chez Tau : VQIV**Y**K
  - ◊ S'agrège et acquiert une conformation en feuillet β (Von Bergen et al, 2000 et 2005; Goux et al, 2004)

- ◊ Chez MAP2 : VQIV**T**K

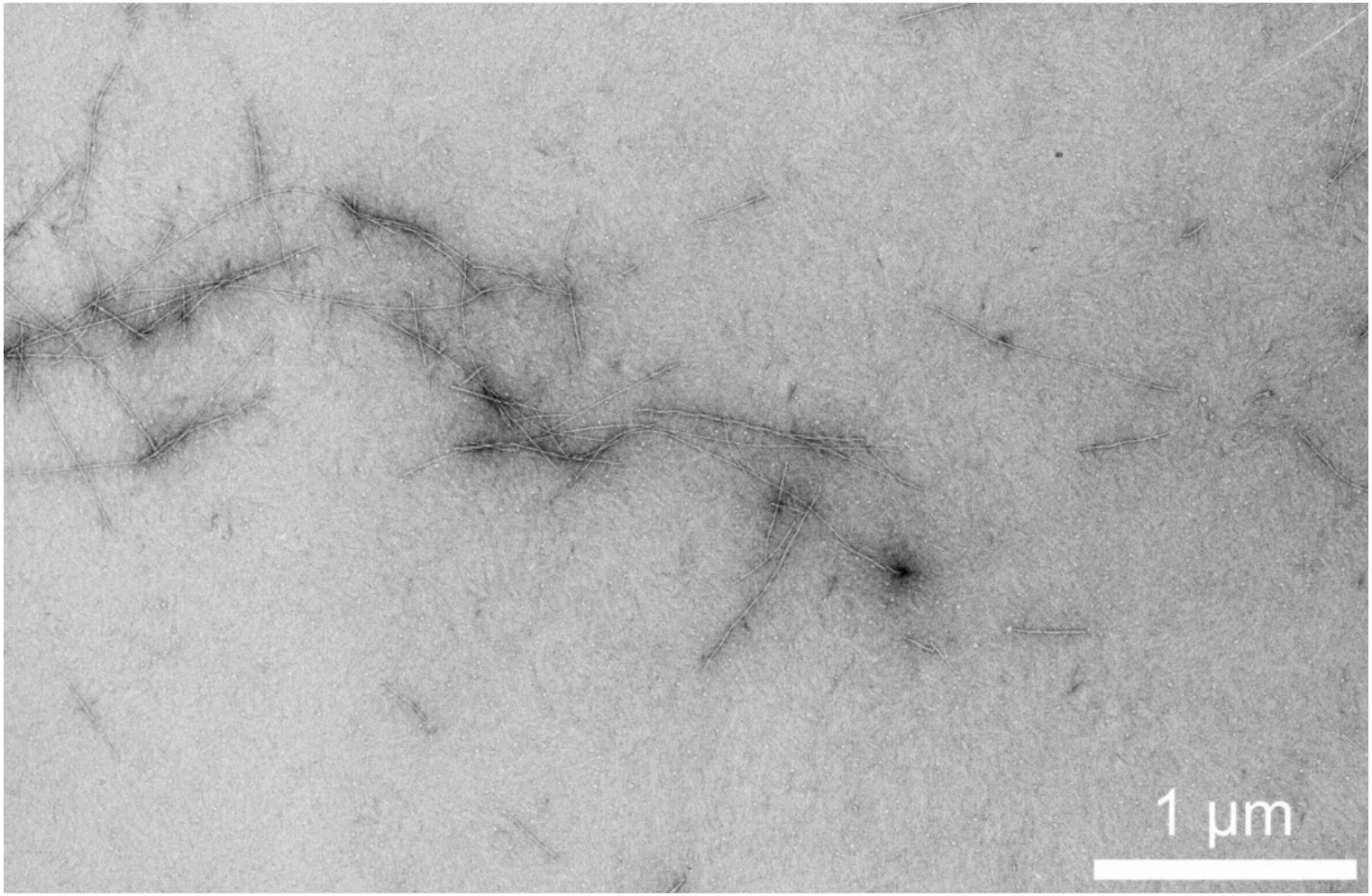
  → Ce peptide est-il impliqué dans la séquestration de MAP2 dans les agrégats d'amyloïde ?

- ◊ Chez MAP4 : VQIV**S**K

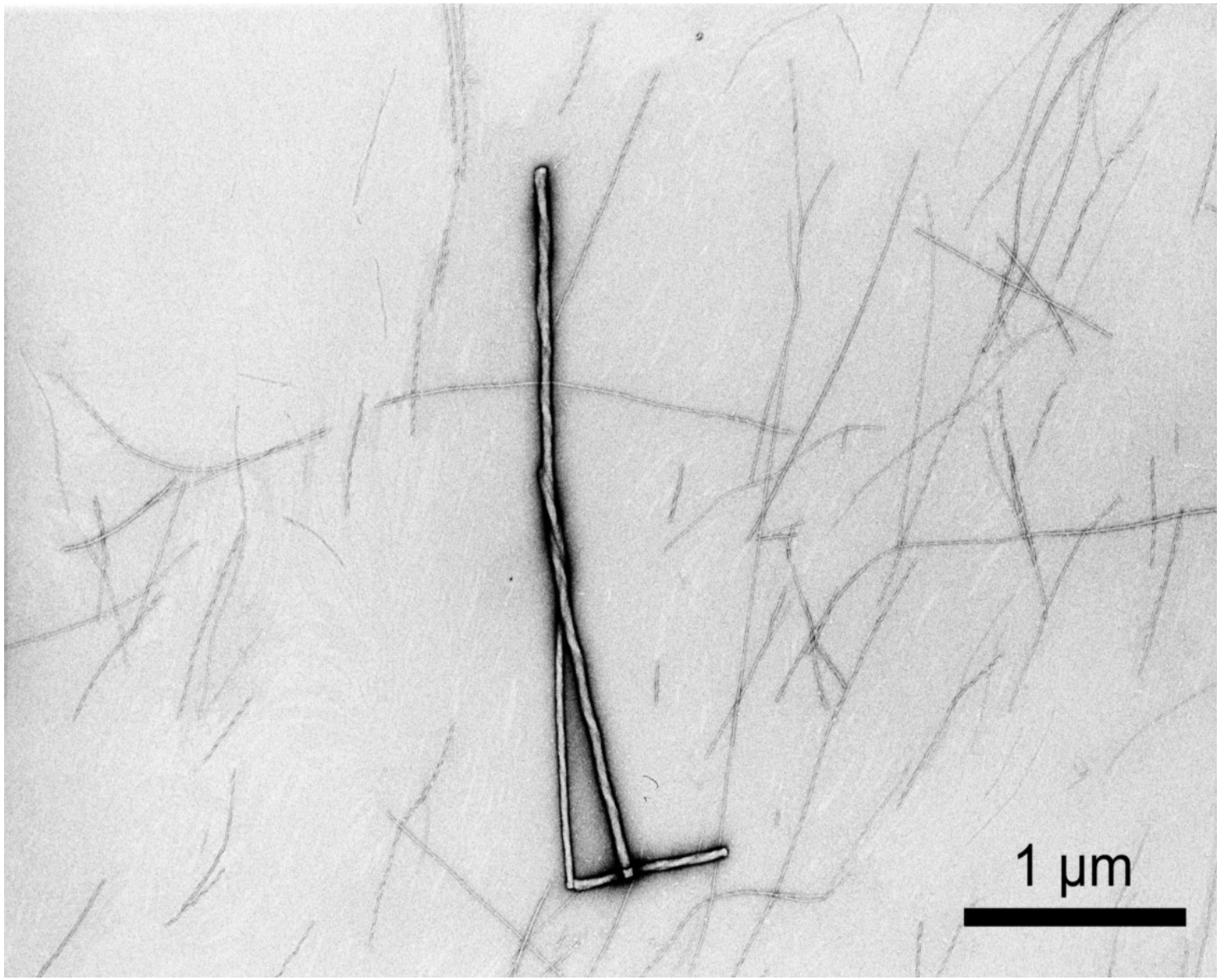
  → Bien que MAP4 n'ai jamais été retrouvée dans des agrégats, ce peptide possède-t-il des capacités d'agrégation ?

- ◊ Peptide témoin : VQIV**R**K
  - ◊ Peroxydase 59 d'Arabidopsis Thaliana
  - ◊ Structure déterminée par diffraction aux rayons X : hélice α
  - → Un peptide adoptant normalement une conformation en hélice α aura-t-il le même comportement agrégatif que les peptides précédents ?

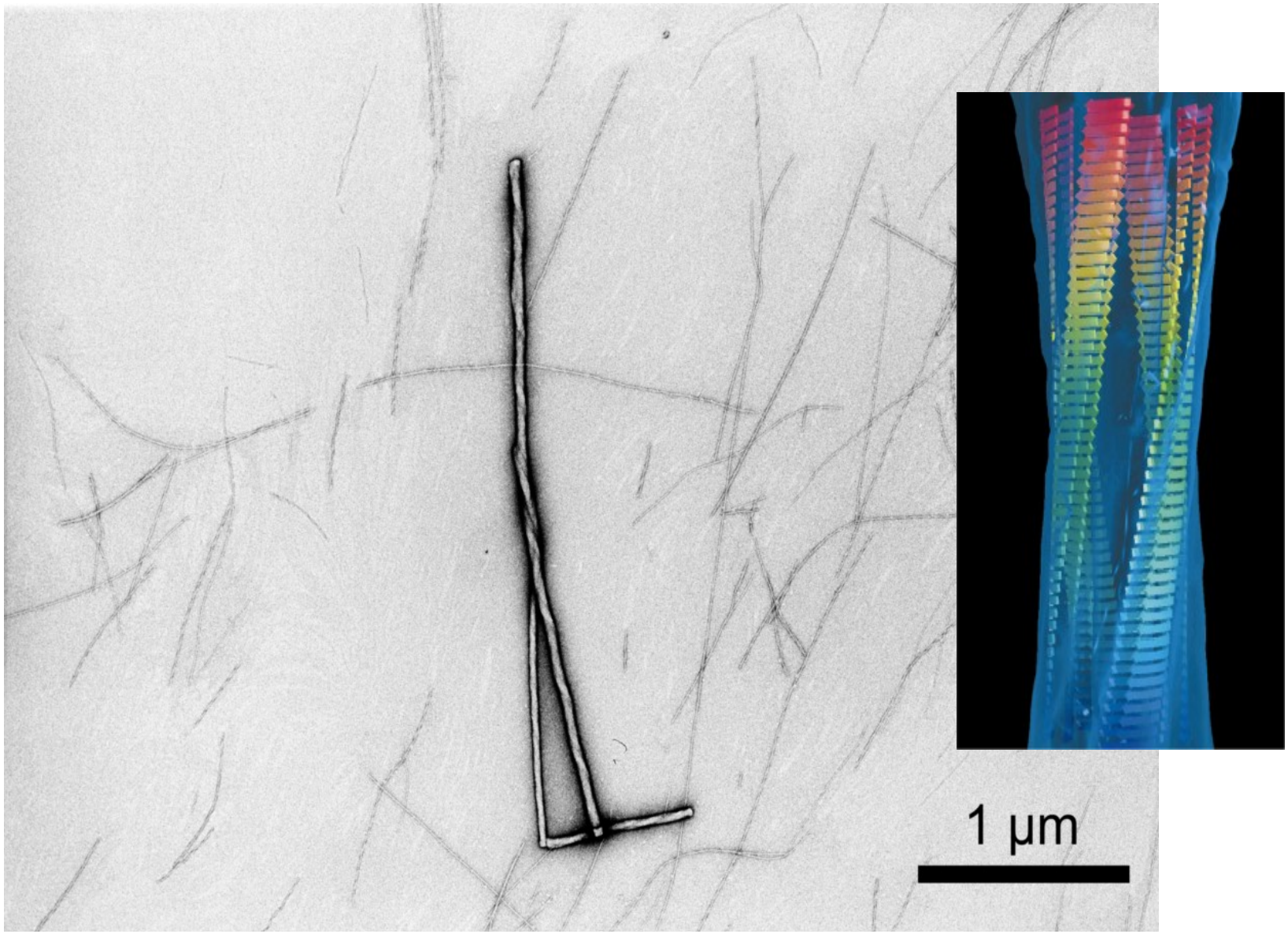
Agrégation de PEP-Tau à t0



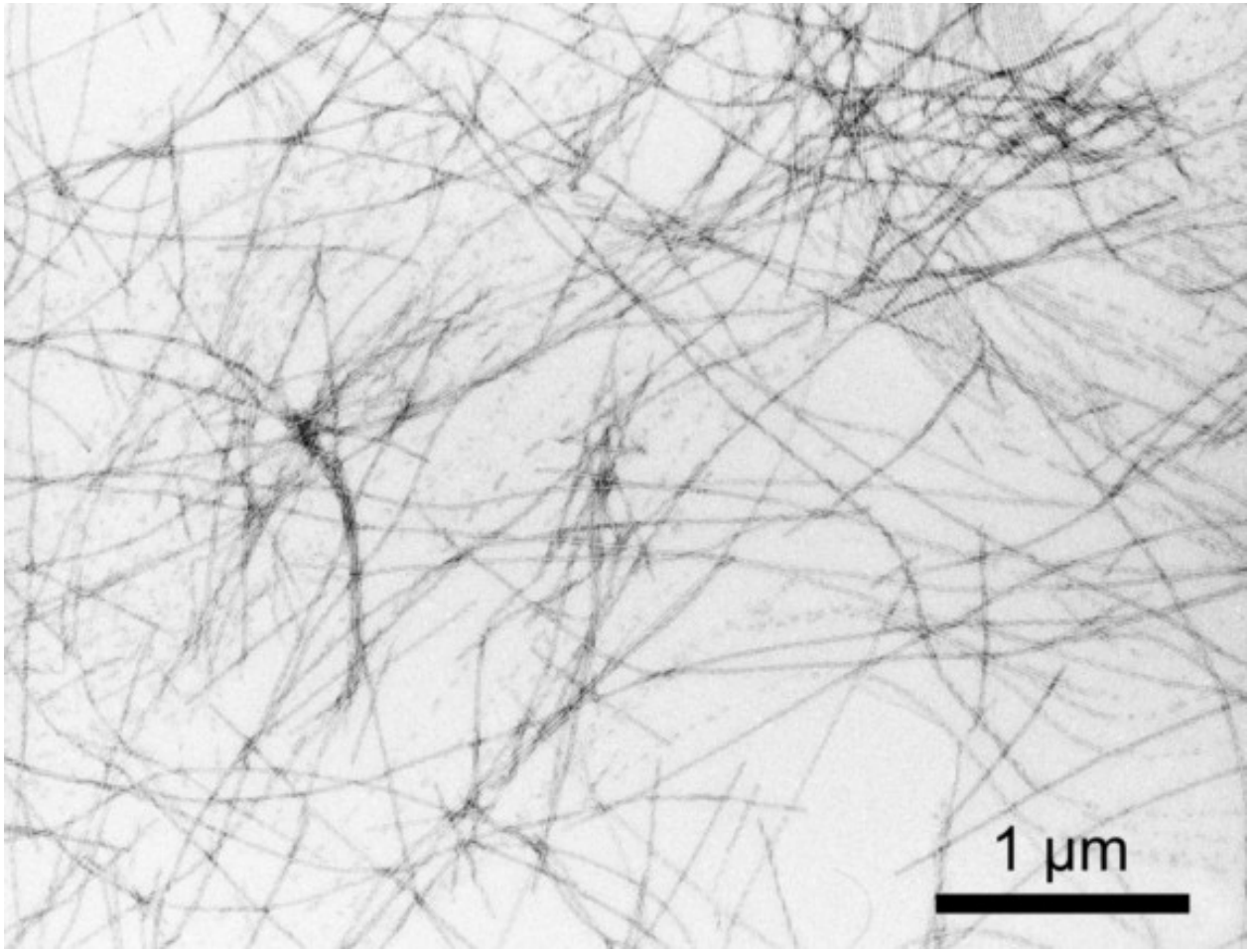
Agrégation de PEP-Tau à 1h



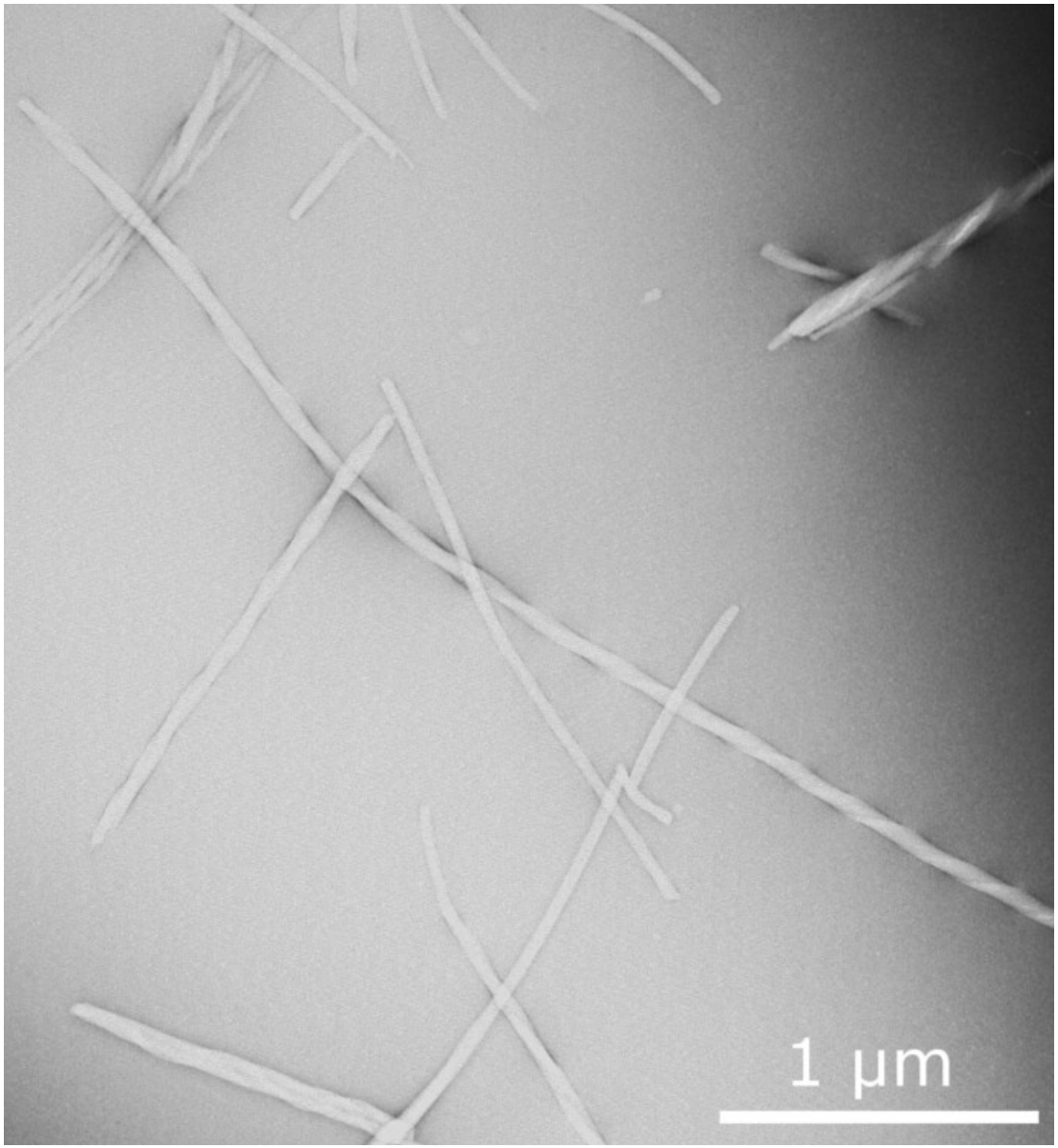
Agrégation de PEP-Tau à 1h



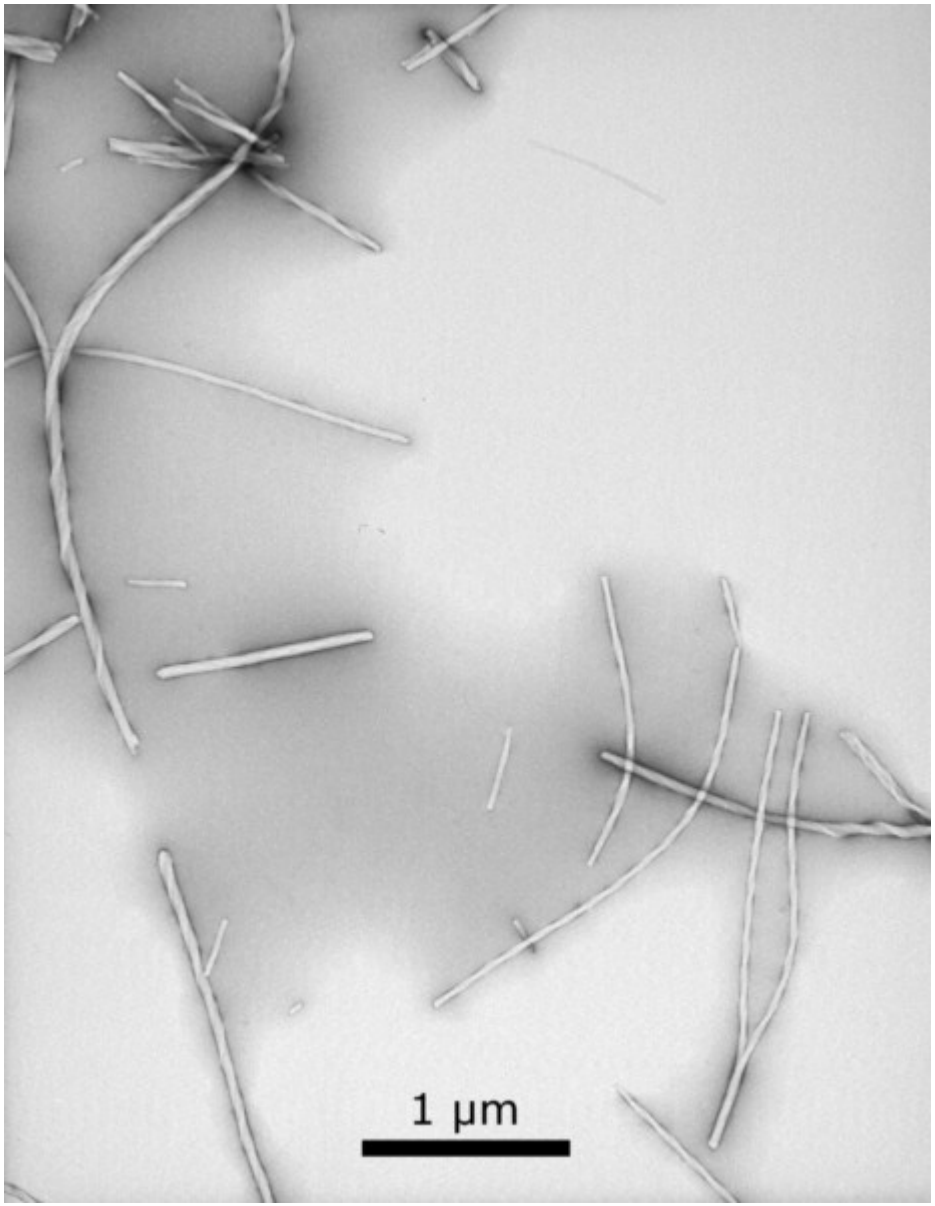
Agrégation de PEP-Tau à 72h



Agrégation de PEP-Map2 à t0

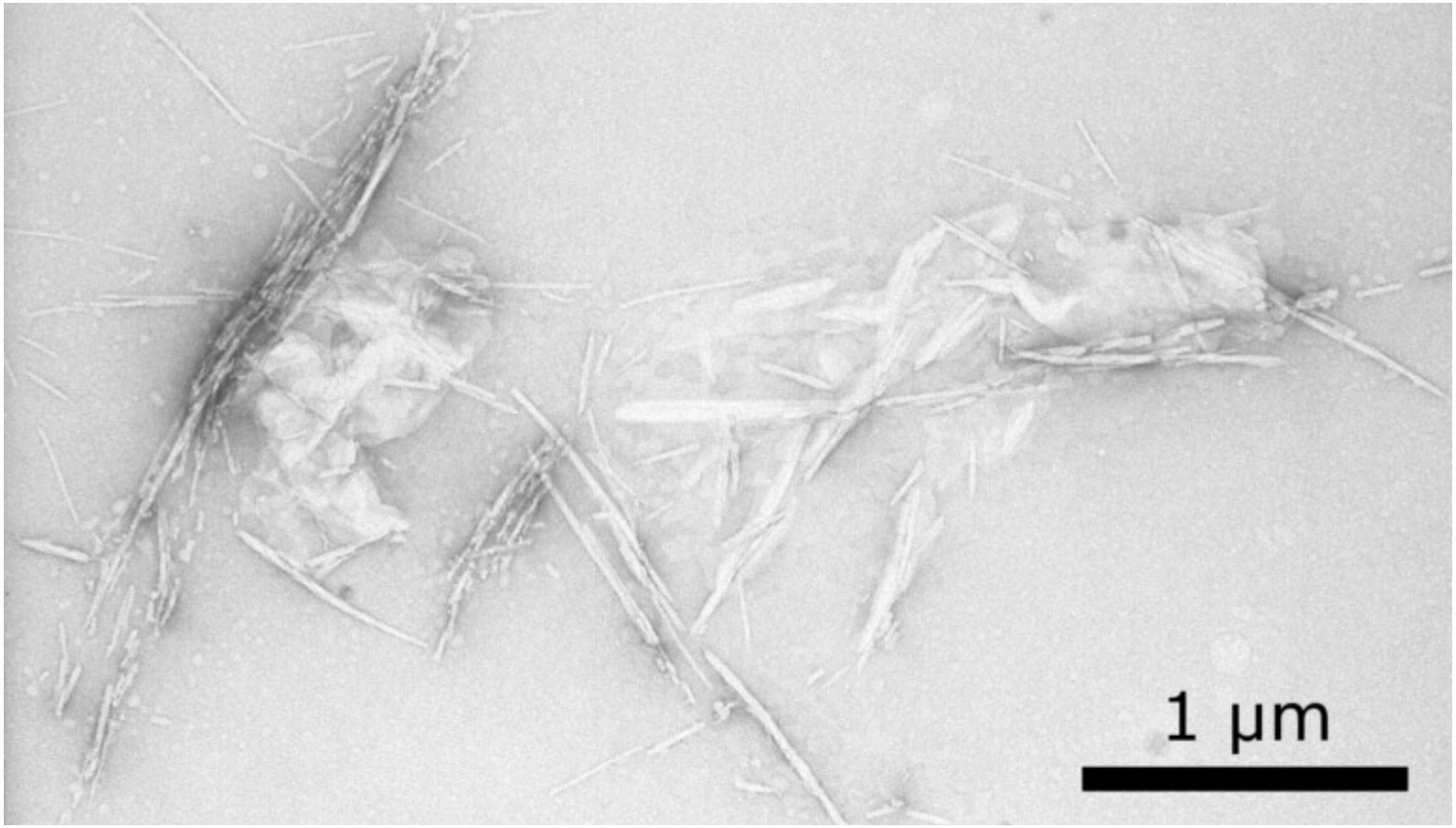


Agrégation de PEP-Map2 à 1h

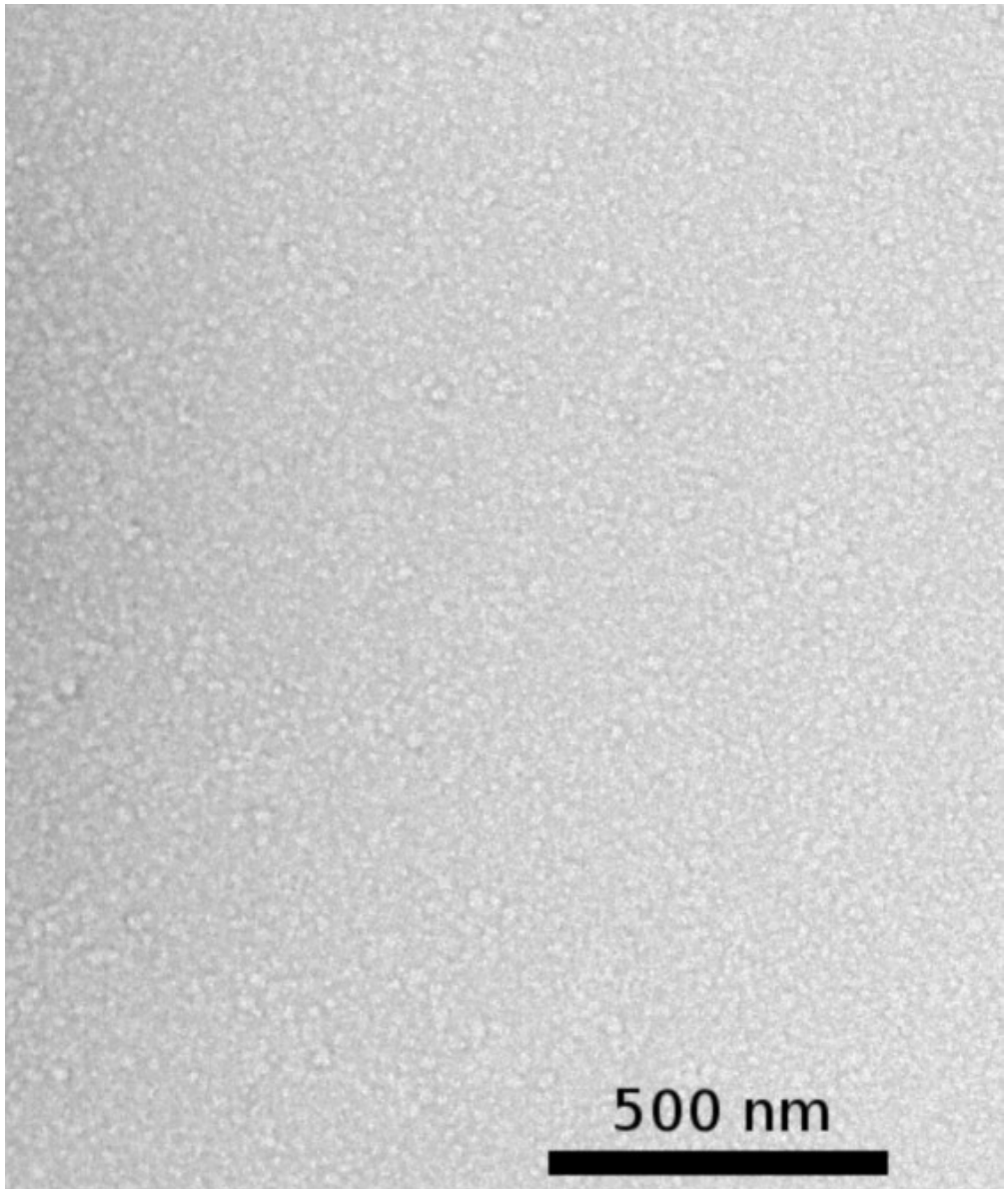


Agrégation de PEP-Map2 : t 72h

Fibres de 7 à 15 nm de large, jusqu'à ~31 nm



Agrégation de PEP-Map4 et PEP-α : t 72h



Quels peptides forment des fibres ?

- Chez Tau : VQIV**Y**K
  - Conformation en feuillet β
  - Fibres droites et torsadées, fines et larges
  - Petits agrégats ronds
- Chez MAP2 : VQIV**T**K
  - Fibres droites et torsadées, larges
  - Dégradation des fibres au temps 72 h
- Chez MAP4 et le peptide témoin : VQIV**S**K
  - Petits agrégats ronds

◊ AmyPDB, Amyloid Protein DataBase

◊ Découverte et analyse de motifs

◊ Cas du motif V-Q-I-V-x-K

◊ ***Conclusions et perspectives***

Conclusion et perspectives

- Etude du comportement agrégatif de peptides synthétiques
  - Analyse des premières étapes de la formation des fibres amyloïdes
  - Etude de la structure secondaire par dichroïsme circulaire
  - Approche pertinente pour vérifier l'implication éventuelle d'un motif dans l'agrégation protéique

- Poursuite de l'analyse des motifs contenus dans AmyPDB
  - Mise en évidence des motifs les plus remarquables
  - Recherche de gènes codant potentiellement pour des protéines amyloïdes
  - Vérification de l'implication dans l'agrégation par l'étude de peptides synthétiques