

L'analyse du mode d'action de la chaperonne DnaK sur une protéine entière montre une activité de type « Holdase »
Marie-Claude Sauvé
25036038

RÉSUMÉ

Les protéines sont de longues chaînes d'acides aminés qui doivent se positionner de façon très précise pour accomplir leur fonction. Pour les assister dans leur repliement, la cellule dispose de chaperonnes moléculaires. Il existe plusieurs familles de chaperonnes, presque toutes composées de protéines de choc thermique, qui coopèrent entre elles par la combinaison de leur fonctions spécifiques et la reconnaissance de substrats.

La représentante bactérienne de la famille des protéines de choc thermique de 70kDa, DnaK, réalise sa fonction de chaperonne sur les polypeptides en élongation, lors de chocs thermiques et pour assurer le transfert de substrats entre les familles de chaperonnes. Il est probable que plusieurs mécanismes soient employés par DnaK pour agir sur les protéines. Il a été proposé que les rôles de protection des polypeptides et de leur conservation à l'état déplié soient régulés par un mécanisme de « holdase ». Cette théorie préconise que plusieurs molécules de DnaK se lient à un seul polypeptide, engendrant un encombrement stérique empêchant le substrat de se replier incorrectement. L'objectif de mon étude était de vérifier l'existence d'un tel mode d'action sur un modèle polypeptidique mimant une protéine dénaturée, la lactalbumine réduite et carboxyméthylée.

Pour appuyer cette théorie, on procédera d'abord à la vérification de l'existence d'un complexe formé des deux protéines ; la chaperonne et son substrat. Par la suite, en utilisant l'anisotropie de fluorescence, on vérifiera la spécificité de la liaison en se basant sur le comportement de DnaK en présence de nucléotides. C'est avec cette même technique que la constante de dissociation du complexe sera révélée par un titrage de DnaK avec une quantité de lactalbumine invariable. La caractérisation de la stabilité de la liaison et de sa dissociation est essentielle à la fois à la réalisation des expériences et à la vérification de la théorie de « holdase ».

Par la suite, on pourra entamer les mesures calorimétriques qui serviront à décrire le système du point de vue thermodynamique et à déterminer le nombre de sites de liaison de DnaK sur la lactalbumine. Un titrage calorimétrique isotherme fournira ces informations. C'est sur la base du nombre de sites de liaison qu'un protocole utilisant des gels de polyacrylamide et la spectroscopie de masse sera élaboré. Cette expérience permettra d'identifier les sites de liaison de DnaK sur la lactalbumine, dans le but de comparer nos résultats avec les valeurs d'affinité déjà publiées pour la chaperonne et ses substrats. C'est avec tous ces éléments qu'on pourra conclure que DnaK agit en « holdase » sur la lactalbumine mimant le polypeptide déplié.