

Etude structurale de la RNase Y, une enzyme membranaire essentielle impliquée dans la dégradation des ARN messagers et le contrôle de l'expression des gènes.

Laboratoire de Chimie des Processus Biologiques, CNRS FRE3488, Collège de France, 11 place Marcelin Berthelot, 75005 Paris, Encadrant: Béatrice Golinelli-Pimpaneau (beatrice.golinelli@college-de-france.fr)
<http://www.college-de-france.fr/site/laboratoires/laboratoire-de-chimie-des-processus-biologiques.htm>
Projet en collaboration avec Harald Putzer, Institut de Biologie Physicochimique, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris (putzer@ibpc.fr)
http://www.ibpc.fr/UPR9073/equipe_HaraldJackie/AccueilHP.htm

Résumé : Chez la bactérie *Bacillus subtilis*, la RNase Y, une endonucléase membranaire essentielle, initie la dégradation des ARN messagers et apparaît donc comme un acteur majeur de la régulation de l'expression des gènes. La RNase Y est ancrée à la membrane par son domaine N-terminal, qui est crucial pour ses interactions avec d'autres enzymes au sein d'un complexe appelé dégradosome. Cette nucléase est prédite comme étant intrinsèquement désordonnée. Par des méthodes structurales (dichroïsme circulaire, diffraction des rayons X), nous étudierons l'interaction de la RNase Y, entière ou tronquée de son domaine N-terminal, avec ses partenaires du dégradosome et avec un ARN substrat. L'obtention de la structure de ces complexes devrait aider au design d'inhibiteurs à activité antibactérienne.

Projet : Le contrôle de la stabilité des ARN messagers est important pour la régulation des gènes. Il permet aux bactéries de rapidement adapter leur synthèse protéique aux changements de conditions. L'instabilité de l'ARN est également fondamentale pour tout contrôle transcriptionnel de l'expression génétique. Beaucoup de bactéries comme *Bacillus subtilis* ne possèdent pas une RNase E, qui est l'enzyme clé dans le métabolisme de l'ARN chez *E. coli*. A la place, *Bacillus subtilis* possède la RNase Y, une endonucléase essentielle, qui partage des fonctionnalités avec la RNase E, sans que les deux enzymes ne partagent une quelconque similarité de séquence. La RNase Y initie la dégradation des ARN messagers et les produits de coupure sont ensuite dégradés par des exonucléases. Il a été montré que la RNase Y interagit avec d'autres RNases comme la polynucleotide phosphorylase (PNPase), avec l'ARN hélicase CshA et les enzymes glycolytiques émolase et phosphofruktokinase au sein d'un complexe appelé dégradosome. La localisation de la RNase Y dans la membrane est essentielle à la fois pour la viabilité de *B. subtilis* et pour toutes les interactions avec ses partenaires protéiques. Du fait de sa présence dans de nombreuses familles de bactéries dont beaucoup d'espèces pathogènes, la RNase Y est une cible intéressante pour développer de nouveaux antibiotiques. La partie N-terminale de la RNase Y est constituée d'un domaine transmembranaire et d'un domaine « coil-coil ». Il a été prédit que c'est une région intrinsèquement désordonnée qui s'organiserait lors de son oligomérisation ou lors de son interaction avec ses partenaires protéiques ou ARN. Nous essaierons de délimiter expérimentalement l'organisation en domaines de la RNase Y par protéolyse ménagée suivie de la spectrométrie de masse des domaines obtenus après digestion. Puis, nous produirons la protéine tronquée du domaine N-terminal, Δ N-RNase Y et essaierons de la cristalliser. Pour vérifier que le domaine N-terminal est intrinsèquement désordonné, nous proposons de comparer la structure secondaire de la RNase Y et de Δ N-RNase Y par dichroïsme circulaire. L'interaction de la RNase Y avec les différentes protéines participant au dégradosome sera quantifiée par ITC ou fluorescence. L'influence de ces protéines sur la structuration de la RNase Y sera évaluée par dichroïsme circulaire. La cristallisation de la RNase Y et/ou Δ N-RNase Y avec ses partenaires protéiques du dégradosome ou en complexe avec un analogue de substrat ARN sera envisagée. Les données de diffraction seront enregistrées au synchrotron SOLEIL. En parallèle, nous étudierons l'activité enzymatique *in vitro* des diverses constructions de la RNase Y et mesurerons l'effet sur l'activité de l'ajout des autres protéines qui font partie du dégradosome. La résolution de la structure 3D de la RNase Y seule et/ou en complexe avec l'ARN ou des protéines donnerait des informations très pertinentes afin de construire de nouveaux mutants. Ceci permettrait de déterminer l'importance des différents domaines de la RNase Y pour son fonctionnement *in vivo* et d'étudier le rôle de la formation d'un dégradosome pour le métabolisme de l'ARN.

Références : 1 *EMBO J.* **2009**, **28**, 3523-33. RNase Y, a novel endoribonuclease, initiates riboswitch turnover in *Bacillus subtilis*. 2 *Mol Microbiol.* **2010**, **77**, 958-971. The RNA degradosome in *Bacillus subtilis*: identification of CshA as the major RNA helicase in the multiprotein complex. 3 *Mol Microbiol.* **2011**, **81**, 1526-41. RNase Y is responsible for uncoupling the expression of translation factor IF3 from that of the ribosomal proteins L35 and L20 in *Bacillus subtilis*. 4 *Biomolecular Concepts*, **2**, 491-506. mRNA degradation and maturation in prokaryotes : the global players. 5 *J Bacteriol.* **2011**, **193**, 5431-41. RNase Y in *Bacillus subtilis*: a Natively disordered protein that is the functional equivalent of RNase E from *Escherichia coli*. 6 *Mol Microbiol.* **2011**, **81**:1459-73. RNA processing in *Bacillus subtilis*: identification of targets of the essential RNase Y. 7 *Mol Microbiol.* **2012**, **84**,1005-17. RNA degradation in *Bacillus subtilis*:

an interplay of essential endo- and exoribonucleases. **8 PLoS One. 2013;8:e54062.** *Bacillus subtilis* RNase Y activity in vivo analysed by tiling microarrays.