

UE : **EXPRESSION DES GENES ET BIOSYNTHESE DES PROTEINES**

ECRIT CT sujet de M. H. Becker

Durée 1 heure 30

Enseignant référant : Pr. H. Becker

***L'usage des téléphones portables est interdit pendant toute la durée des épreuves.***

N° d'anonymat :

Des chercheurs s'intéressent à la traduction des ARNm de mitochondries du nématode *Ascaris Sum*. L'analyse de la séquence génomique d'*A. sum* révèle la présence d'un gène codant pour l'homologue du facteur d'élongation EF-Tu bactérien (*mtAsumEF-Tu*) possédant une séquence d'adressage mitochondrial (MTS) ainsi qu'une extension C-terminale de 17 résidus. L'alignement des séquences de *mtAsumEF-Tu* avec celle de l'EF-Tu mitochondrial bovin (de *Bos tauros* ; *mtBtaEF-Tu*) montre que la principale différence entre *mtAsumEF-Tu* et *mtBtaEF-Tu* se situe à dans l'extrémité C-terminale de *mtAsumEF-Tu*, qui est plus longue de 5 résidus par rapport à celle de *mtBtaEF-Tu* (**Figure 1**).

**C-terminal extension**

<i>mtAsumEF-Tu</i>	MTS	Domains similar to regular EF-Tu	DHVAVEKHNLKKS <b>AEKM</b>
<i>mtAsumEF-Tu</i> (-)7 aa	MTS	Domains similar to regular EF-Tu	DHVAVEKHNL <sup>deletion</sup>
<i>mtAsumEF-TuEF-Tu</i> (-)3 aa	MTS	Domains similar to regular EF-Tu	DHVAVEKHNLKKS <sup>deletion</sup> A
<i>mtBtaEF-Tu</i>	MTS	Domains similar to regular EF-Tu	<b>MTEEDKNIKWS</b>

**Figure 1 : Schematic depiction of the comparison of sequences and domain organizations of *mtAsumEF-Tu* (WT WT and (-)7 or (-)3 aa) and bovine *mtBtaEF-Tu*.** The amino acid (aa) sequence of the C-terminal extensions is shown. Seven- and three-aa deletions ((-)7 aa and (-)33 aa) in *mtAsumEF-Tu* mutants that were generated by PCR-mutagenesis, are indicated by dashed squares labelled "deletion". MTS: Mitochondrial Targeting Sequence.

Le but de leurs recherches est d'essayer de comprendre pourquoi *mtAsumEF-Tu* possède une extension C-terminale par rapport aux EF-Tu bactériens et pourquoi elle est plus longue que celle de *mtBtaEF-Tu*. Ils analysent tout d'abord la séquence de l'ADN mitochondrial (*mtADN*) d'*A. sum* et découvrent qu'il code bien les 20 ARNt isoaccepteurs nécessaires à la traduction de l'ensemble des codons des gènes codé par l'ADN mitochondrial. Parmi ces gènes, celui d'un des ARNt<sup>Ser</sup> mitochondriaux (*mtAsumARNt<sup>Ser\*</sup>*), est particulier puisqu'il n'est pas de classe 2 et ne possède que 57 nucléotides (nt ; voir séquence ci-dessous) contrairement à l'ARNt<sup>Ser</sup> mitochondrial bovin (*mtBtaARNt<sup>Ser</sup>*) qui est de classe 2 et de structure secondaire tout à fait normale (**voir Annexes**).

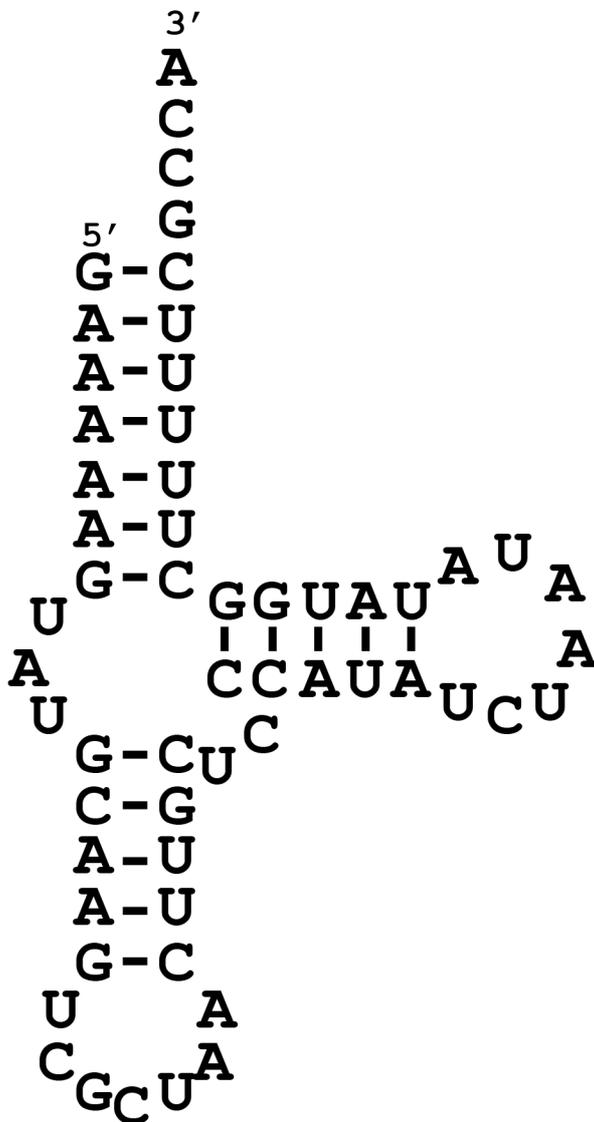
Séquence nucléotidique du gène codant *mtAsumARNt<sup>Ser\*</sup>* :

5' **GAAAAAGUAUGCAAGCUGCUAACUUGCUCCCAUAUCUAAUAUAUGGCUUUUUCGCCA3'**

Attention : lisez la suite avant de vous lancer dans l'établissement de la structure !!!!

Ils modélisent la structure secondaire que cet ARNt pourrait adopter et trouvent que par rapport à la structure consensus des ARNt (voir annexe), le bras et la boucle du D de cet *mtAsumARNt<sup>Ser\*</sup>* est remplacée par 1 nt et que la boucle variable ne contient que 2 nt.

Q1 : Dessinez la structure secondaire en feuille de trèfle de cet *mtARNt<sup>Ser</sup>*. (8 points)



La question qu'ils se posent alors est de savoir s'il existe un lien entre l'extension C-terminale plus longue de *mtAsumEF-Tu* et le fait que le *mtAsumARNt<sup>Ser\*</sup>* soit privé du bras et de la boucle D. Pour explorer cette possibilité ils effectuent les expériences suivantes :

Ils surproduisent et purifient *mtAsumEF-Tu* (sauvage et les 2 mutants, cf **Figure 1**), *mtBtaEF-Tu*, les séryl-ARNt synthétases mitochondriales d'*A. sum* (*mtAsumSerRS*) et de *B. tauros* (*mtBtaSerRS*) ainsi que le *mtAsumARNt<sup>Ser\*</sup>* et le *mtBtaARNt<sup>Ser</sup>* et les utilisent dans les expériences suivantes :

1) Préparation des [<sup>14</sup>C]Ser-*mtAsumARNt<sup>Ser\*</sup>* et [<sup>14</sup>C]Ser-*mtBtaARNt<sup>Ser</sup>*

Dans 2 tubes eppendorfs séparés, Ils aminoacylent (milieu réactionnel final de 500 µL) les *mtAsumARNt<sup>Ser\*</sup>* et le *mtBtaARNt<sup>Ser</sup>* avec de la serine (Ser) radiomarquée au [<sup>14</sup>C] ([<sup>14</sup>C]Ser) en présence de respectivement *mtAsumSerRS* et de *mtBtaSerRS* jusqu'à obtenir un plateau

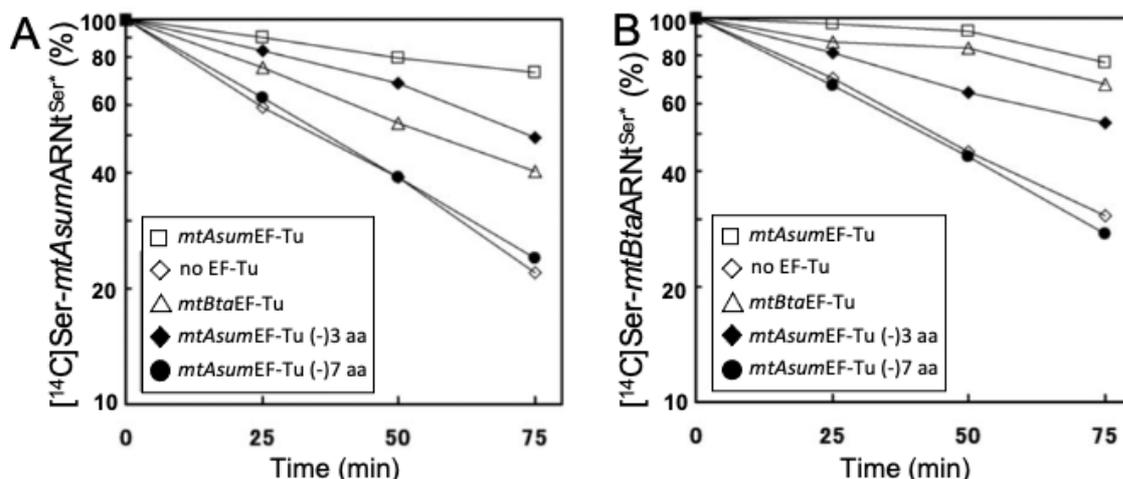
d'aminocyclation dans les 2 cas. Lorsque le plateau d'aminocyclation est obtenu ils rajoutent 50  $\mu\text{L}$  d'acétate de potassium 1 M, pH 4,5 et procèdent à l'extraction des  $[^{14}\text{C}]\text{Ser-}mtAsum\text{ARNt}^{\text{Ser}^*}$  et  $[^{14}\text{C}]\text{Ser-}mtBta\text{ARNt}^{\text{Ser}}$ . Cette extraction consiste à rajouter 1 volume de phénol tamponé d'acétate de potassium 100 mM, pH 4,5, à vortexer le mélange et à le centrifuger à 10.000 X g pendant 10 min à 4 °C. Après centrifugation ils récupèrent 540  $\mu\text{L}$  de la phase aqueuse (contenant les ARNt non chargés, les  $[^{14}\text{C}]aa$  en excès et les  $[^{14}\text{C}]aa\text{-ARNt}$ ) qui se trouve au-dessus de la phase organique (phénol) qu'ils transfèrent dans un nouvel eppendorf (à l'interface entre les 2 phase se trouve un disque blanchâtre qui est composé de protéines dénaturées). Dans cet eppendorf, ils rajoutent 25  $\mu\text{L}$  de NaCl 5 M et 2,5 volumes d'éthanol 100 % (v/v) afin de précipiter les  $[^{14}\text{C}]\text{Ser-}mtAsum\text{ARNt}^{\text{Ser}^*}$  et  $[^{14}\text{C}]\text{Ser-}mtBta\text{ARNt}^{\text{Ser}}$ . Après centrifugation à 10.000 X g pendant 10 min à 4 °C, ils enlèvent les surnageants des 2 tubes, sèchent les précipités de  $[^{14}\text{C}]aa\text{-ARNt}$  se trouvant au fond des tubes et les reprennent dans 55  $\mu\text{L}$  d' $\text{H}_2\text{O}$  stérile et conservent les tubes à 4°C.

## 2) Mesure de l'efficacité de liaison des $[^{14}\text{C}]\text{Ser-}mtAsum\text{ARNt}^{\text{Ser}^*}$ et $[^{14}\text{C}]\text{Ser-}mtBta\text{ARNt}^{\text{Ser}}$ par $mtAsum\text{EF-Tu}$ et $mtBta\text{EF-Tu}$

Ils transfèrent 10  $\mu\text{L}$  de  $[^{14}\text{C}]\text{Ser-}mtAsum\text{ARNt}^{\text{Ser}^*}$  dans 5 tubes eppendorfs différents dans lesquels ils rajoutent un large excès (plus de 10 fois) de soit  $mtAsum\text{EF-Tu}$ , soit  $mtAsum\text{EF-Tu}$  (-)3aa, soit  $mtAsum\text{EF-Tu}$  (-)7aa, soit  $mtBta\text{EF-Tu}$ , et dans le dernier tube juste de l'eau stérile. Après avoir mélangé les tubes ils rajoutent du tampon Tris-HCl pH 8,8 (concentration finale dans les tubes de 100 mM) et ajuste les volumes réactionnels des tubes à 50  $\mu\text{L}$  final (avec de l'eau stérile). Après avoir mélangé chaque tube ils déclenchent le chronomètre et prélèvent 10  $\mu\text{L}$  de chaque tube et les dépose sur un bout de papier whatman avant de plonger ces papiers dans une solution 5 % (p/v) d'acide trichloroacétique. Ils répètent le prélèvement d'aliquotes de 10  $\mu\text{L}$  à des intervalles de temps correspondant à 25, 50 et 75 min.

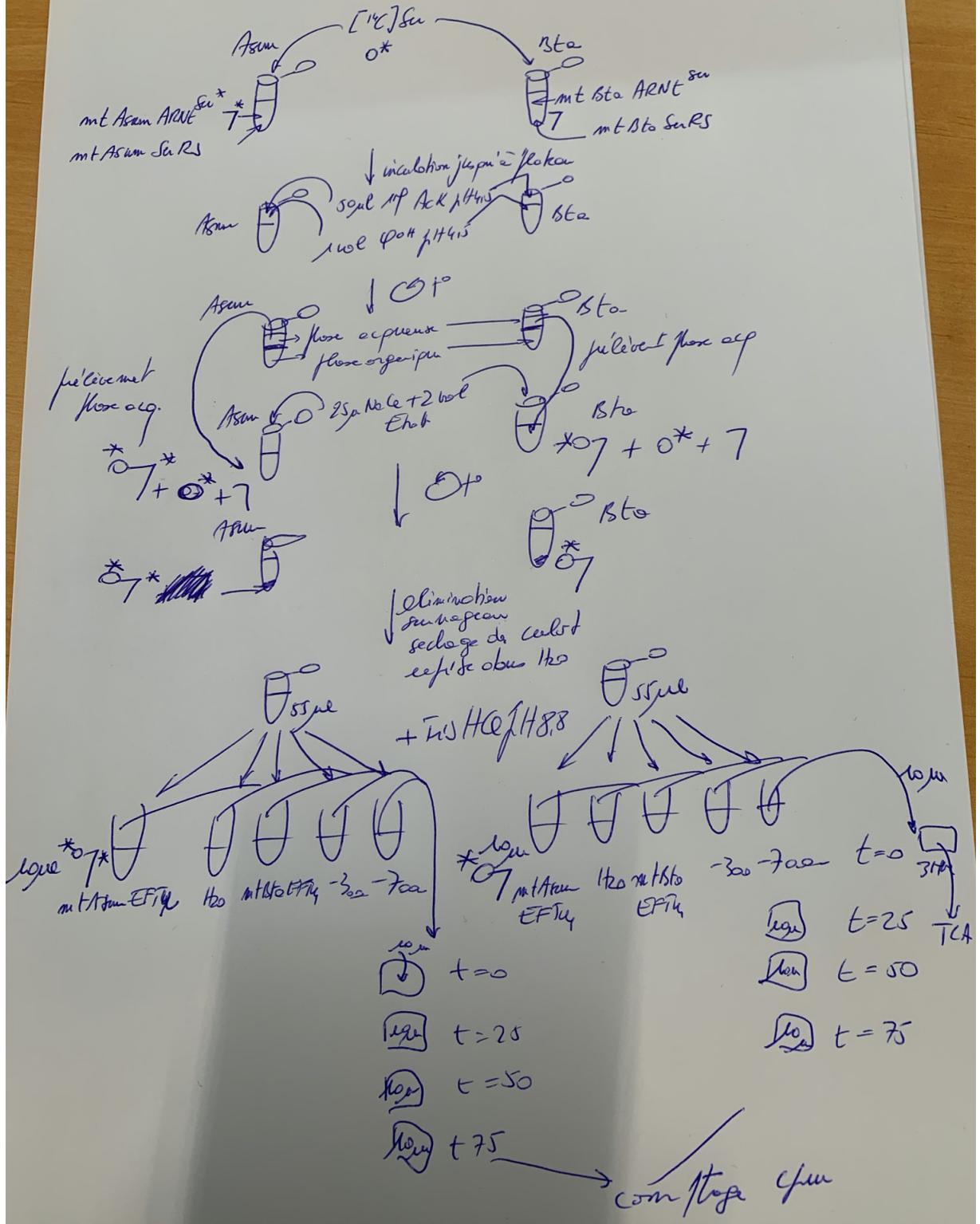
Ils refont exactement la même série d'expériences (5 tubes) en utilisant cette fois-ci le  $[^{14}\text{C}]\text{Ser-}mtBta\text{ARNt}^{\text{Ser}}$ .

Ils récupèrent ensuite tous les papiers whatman qui avaient été plongés dans la solution d'acide trichloroacétique, ils les séchent et comptent la radioactivité acidoprécipitée grâce à un compteur à scintillation. Les résultats de cette expérience sont présentés dans la **Figure 2**.



**Figure 2 : Binding of  $mtBta\text{EF-Tu}$  and WT and mutant  $mtAsum\text{EF-Tu}$  to  $[^{14}\text{C}]\text{Ser-}mtAsum\text{tRNA}^{\text{Ser}^*}$  (A) or  $[^{14}\text{C}]\text{Ser-}mtBtat\text{RNA}^{\text{Ser}}$  (B). The assays were carried out as described above. The percentage (%) of remaining  $[^{14}\text{C}]\text{Ser-}mtAsum\text{tRNA}^{\text{Ser}^*}$  or  $[^{14}\text{C}]\text{Ser-}mtBtat\text{RNA}^{\text{Ser}}$  is shown and calculated relative to the one at  $t=0$  min.**

**Q2 : Faites un schéma précis de l'expérience ayant conduit aux résultats présentés dans la Figure 2. Vous schématiserez les ARNt, aa, aa-ARNt et EF-Tu. (5 points)**



Q3 : Pourquoi rajoutent-ils de l'acétate de K 1M pH4,5 avant l'extraction phénolique et pourquoi font-ils la mesure de l'efficacité de liaison des [<sup>14</sup>C]Ser-*mtAsumARNt*<sup>Ser\*</sup> et [<sup>14</sup>C]Ser-*mtBtaARNt*<sup>Ser</sup> par *mtAsumEF-Tu* et *mtBtaEF-Tu* dans un tampon 100 mM Tris-HCl pH 8,8? Justifiez votre réponse (1 point).

1M Kac pH4,5 : pour empêcher l'hydrolyse de la liaison ester entre [<sup>14</sup>C]Ser et les *mtAsumARNt*<sup>Ser\*</sup> ou *mtBtaARNt*<sup>Ser</sup> durant l'extraction phénolique

100 mM Tris-HCl pH 8,8 : parce qu'à pH 8,8 la liaison ester entre [<sup>14</sup>C]Ser et les *mtAsumARNt*<sup>Ser\*</sup> ou *mtBtaARNt*<sup>Ser</sup> s'hydrolyse si elle n'est pas protégée par la liaison à EF-Tu. En fonction de l'affinité des différents variants d'EF-Tu pour chacun des [<sup>14</sup>C]Ser-ARNt il y aura plus ou moins de protection contre l'hydrolyse de la liaison ester à pH alcalin

Q4 : D'après la Figure 2 ci-dessus, quelle est la différence principale des propriétés de reconnaissance des Ser-ARNt entre *mtAsumEF-Tu* et *mtBtaEF-Tu* ? Justifiez votre réponse (2 points).

En comparant les courbes de protection de la Figure 2A triangle et carré on remarque que *mtBtaEF-Tu* (triangles) protège nettement moins [<sup>14</sup>C]Ser-*mtAsumARNt*<sup>Ser\*</sup> que *mtBtaEF-Tu* (carrés) : 80 % de [<sup>14</sup>C]Ser-*mtAsumARNt*<sup>Ser\*</sup> en présence de *mtAsumEF-Tu* au bout de 75 min d'incubation à pH alcalin contre 40 % de [<sup>14</sup>C]Ser-*mtAsumARNt*<sup>Ser\*</sup> en présence de *mtBtaEF-Tu*.

En revanche, En comparant les courbes de protection de la Figure 2B triangle et carré on remarque que *mtAsumEF-Tu* (carrés) protège quasi aussi efficacement [<sup>14</sup>C]Ser-*mtBtaARNt*<sup>Ser</sup> que *mtBtaEF-Tu* (triangles) : 70 % de [<sup>14</sup>C]Ser-*mtBtaARNt*<sup>Ser</sup> en présence de *mtAsumEF-Tu* au bout de 75 min d'incubation à pH alcalin contre 80 % de [<sup>14</sup>C]Ser-*mtBtaARNt*<sup>Ser</sup> en présence de *mtBtaEF-Tu*.

En conclusion *mtAsumEF-Tu* est capable de lier efficacement les 2 types de mttRNA<sup>Ser</sup> (avec et sans bras et boucle du D) alors que le *mtBtaEF-Tu* lie 2 fois moins efficacement le mttRNA<sup>Ser</sup> dépourvu de bras et boucle D qu'un mttRNA<sup>Ser</sup> ayant une structure canonique.

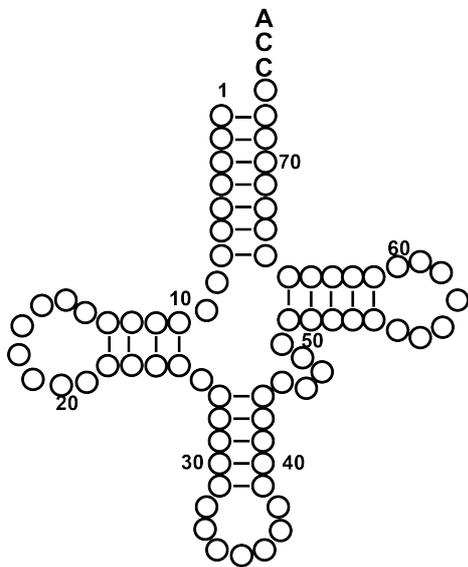
Q5 : Les résultats de la figure 2 permettent-ils de cerner (ou d'émettre des hypothèses) quel est le rôle de l'extension C-terminale de *mtAsumEF-Tu* ? Justifiez votre réponse (2 points)

En comparant les courbes de protection de la Figure 2A carré diamant et cercles noirs, on remarque que le *mtAsumEF-Tu* délété de 3aa (diamant noir) dans l'extension C-t conserve une capacité de liaison (et du coup de protection de la liaison ester) du [<sup>14</sup>C]Ser-*mtAsumARNt*<sup>Ser\*</sup> de 75% de celle du *mtAsumEF-Tu* WT (60/80\*100 à t=75 min) mais la délétion de 4 aa supplémentaire (-7aa : cercle noir) abolie complètement sa capacité de liaison au [<sup>14</sup>C]Ser-*mtAsumARNt*<sup>Ser\*</sup> puisqu'à t=75 la quantité de [<sup>14</sup>C]Ser-*mtAsumARNt*<sup>Ser\*</sup> restante en présence de *mtAsumEF-Tu* (-)7 aa est équivalente au contrôle sans EF-Tu (diamant blanc). Les 4 ou certains des aa présents dans l'extension Ct- du variant (-)3 aa et absents dans (-)7aa (KKSA) sont donc essentiels pour la reconnaissance du [<sup>14</sup>C]Ser-*mtAsumARNt*<sup>Ser\*</sup>.

Q6: Quel(s) autre(s) type(s) de mutant(s) de *mtAsumEF-Tu* auriez-vous créé pour identifier le rôle de l'extension C-terminale de *mtAsumEF-Tu* dans la reconnaissance du *mtAsumtRNA<sup>Ser\*</sup>*? Justifiez votre réponse. (2 points)

Comme le *mtAsumEF-Tu* reconnaît un aa-ARNt et que i) le domaine de liaison à la partie ARNt de l'aa-ARNt d'EF-Tu se trouve en C-t, ii) la délétion de cette partie abolit la reconnaissance de l'aa-ARNt par l'EF-Tu mutant (-7aa) cette extension est sûrement importante pour la reconnaissance et liaison de la partie ARNt de l'aa-ARNt. L'ARNt étant chargé négativement, les aa chargés positivement seront les cibles privilégiées que je muterais pour avoir plus d'informations sur le rôle de cette extension C-t. Je muterais les 2 lysines séparément ou ensembles du motif KKSA en alanine et je ferais le test de protection de l'hydrolyse de la liaison ester du [<sup>14</sup>C]Ser-*mtAsumARNt<sup>Ser\*</sup>* avec ces 3 mutants, le WT (contrôle positif) et H<sub>2</sub>O (contrôle négatif) ;

### Annexes



		Deuxième lettre				
		U	C	A	G	
Première lettre	U	Phe Phe	Ser Ser	Tyr Tyr	Cys Cys	U C
	C	Leu Leu	Ser Ser	Stop Stop	Stop Trp	A G
		A	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg
	G	Ile Ile Ile	Thr Thr Thr	Asn Asn Lys	Ser Ser Arg	U C A
Met		Thr	Lys	Arg	G	
Troisième lettre	U	Val Val	Ala Ala	Asp Asp	Gly Gly	U C
		C	Val Val	Ala Ala	Glu	Gly Gly