



**HAL**  
open science

# Étude structurale et fonctionnelle du complexe Rpf2/Rrs1 impliqué dans la biogenèse du ribosome

Clément Madru

► **To cite this version:**

Clément Madru. Étude structurale et fonctionnelle du complexe Rpf2/Rrs1 impliqué dans la biogenèse du ribosome. Biochimie [q-bio.BM]. Université Sorbonne Paris Cité, 2017. Français. NNT : 2017USPCB142 . tel-01908702

**HAL Id: tel-01908702**

**<https://theses.hal.science/tel-01908702>**

Submitted on 30 Oct 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# Université Paris Descartes

École doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie, Imageries

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

Biochimie Structurale

## Étude structurale et fonctionnelle du complexe Rpf2/Rrs1 impliqué dans la biogenèse du ribosome

Par Clément Madru

Dirigée par le Pr. Nicolas Leulliot et le Dr. Simon Lebaron

*Laboratoire Cristallographie et RMN biologiques, UMR 8015, PARIS*

Présentée publiquement le 12 octobre 2017

### Membres du jury :

**Dr. Micheline FROMONT-RACINE**, Institut Pasteur

Rapportrice

**Dr. Emmanuelle SCHMITT**, DR, École polytechnique

Rapportrice

**Dr. Olivier GADAL**, DR, LMBE

Examinateur

**Dr. Dieter KRESSLER**, université de Fribourg

Examinateur

**Pr. Nicolas LEULLIOT**, Professeur, LCRB

Directeur de thèse

**Dr. Simon LEBARON**, CR, LCRB

Co-directeur de thèse



# Table des matières

Table des matières .....	1
Liste des abréviations .....	5
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>7</b>
Préambule .....	9
<b>I. Généralités sur le ribosome eucaryote .....</b>	<b>10</b>
<b>II. La biogenèse du ribosome .....</b>	<b>13</b>
1. Organisation des ADNr et du nucléole .....	13
2. L'ARN polymérase I .....	15
a. Organisation structurale de l'ARN polymérase I .....	15
b. Initiation de la transcription de l'ARN polymérase I .....	16
3. Les facteurs d'assemblage de la biogenèse du ribosome .....	16
a. Les facteurs d'assemblage impliqués dans les modifications des ARNr .....	17
b. Les facteurs d'assemblage NTP-dépendants .....	18
c. Les facteurs d'assemblage dépourvus d'activité enzymatique .....	18
4. Transcription des ARNr et assemblage co-transcriptionnel .....	19
5. Clivages aux sites A0, A1 et A2 .....	20
6. Les étapes précoces de la biogenèse de la grande sous-unité du ribosome .....	21
7. Les étapes intermédiaires de la biogenèse de la grande sous-unité du ribosome .....	23
8. Les étapes nucléaires tardives de la biogenèse de la grande sous-unité du ribosome .....	25
9. Les étapes cytoplasmiques de la biogenèse de la grande sous-unité du ribosome .....	26
<b>III. Liens entre biogenèse du ribosome et contrôle de la prolifération cellulaire .....</b>	<b>27</b>
1. Régulation de la transcription des ARNr .....	27
2. La synthèse des ribosomes, au coeur du contrôle de la prolifération cellulaire (Revue) .....	29
3. Rôle de la particule 5S dans la régulation de p53 .....	38
a. Le couple p53-MDM2 .....	38
b. Rôle de Rpl5 et de Rpl11 dans la régulation de p53 .....	39
c. Rôle de l'ARNr 5S dans la régulation de p53 .....	40
d. Régulation de la voie MDM2/p53/5S .....	41
<b>IV. Synthèse de l'ARNr 5S et intégration dans le ribosome .....</b>	<b>42</b>
1. Historique .....	43
2. L'ARNr 5S dans le ribosome .....	43
3. Biogenèse de l'ARNr 5S .....	46
a. Transcription par l'ARN polymérase III .....	46
b. Maturation et contrôle qualité de l'ARNr 5S .....	48
c. Stockage cytoplasmique de l'ARNr 5S chez le xénope .....	48
4. Association des protéines Rpl5 et Rpl11 avec l'ARNr 5S .....	50
5. Import nucléaire de Rpl5 et de Rpl11 par une importine spécialisée .....	51
6. Rôle des facteurs Rpf2 et Rrs1 .....	53
<b>V. Objectifs .....</b>	<b>54</b>
<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>57</b>
<b>Chapitre I : Étude structurale et fonctionnelle du dimère Rpf2/Rrs1 .....</b>	<b>59</b>
<b>I. Production, purification et cristallisation du complexe Rpf2/Rrs1 .....</b>	<b>60</b>
1. Production et purification du complexe Rpf2/Rrs1 .....	60
2. Essais de cristallisation sur le complexe de protéines natives .....	60
3. Protéolyse ménagée du complexe .....	62
4. Enregistrement des données au synchrotron .....	63
<b>II. Diffraction des rayons X et traitement des données .....</b>	<b>63</b>
1. Organisation d'un cristal .....	63

2.	Diffraction des rayons X par un cristal .....	64
3.	Traitement des données .....	65
a.	Détermination de la maille et du groupe d'espace .....	65
b.	Intégration des données .....	66
c.	Mise à l'échelle, moyennation et conversion des intensités .....	66
d.	Contenu de l'unité asymétrique .....	67
<b>III.</b>	<b>Phasage et construction du modèle .....</b>	<b>68</b>
1.	Remplacement moléculaire .....	68
2.	Phasage expérimental .....	68
a.	Le remplacement isomorphe (SIR) .....	69
b.	La diffusion anormale (SAD) .....	69
c.	Le SIRAS .....	70
3.	Phasage de la structure du complexe Rpf2/Rrs1 .....	71
a.	Traitement des jeux de données de cristaux dérivés .....	71
b.	Phasage .....	72
4.	Affinement du modèle .....	75
<b>IV.</b>	<b>Analyse de la structure .....</b>	<b>77</b>
<b>V.</b>	<b>Étude fonctionnelle .....</b>	<b>79</b>
<b>VI.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>103</b>
<b>Chapitre II : Étude structurale du complexe Rpf2/Rrs1/ARNr 5S</b>		<b>107</b>
<b>I.</b>	<b>Reconstitution du complexe Rpf2/Rrs1/5S et essais de cristallisation .....</b>	<b>108</b>
1.	Purification d'ARNr 5S endogène de <i>S. cerevisiae</i> .....	108
2.	Association avec Rpf2/Rrs1 et essais de cristallisation .....	108
<b>II.</b>	<b>Production d'une forme tronquée d'ARNr 5S et essais de cristallisation .....</b>	<b>110</b>
1.	Choix de la construction d'ARN .....	110
2.	Transcription in vitro .....	111
3.	Purification du complexe Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$ .....	112
4.	Reconstitution du complexe 5S $\Delta$ /Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$ et essais de cristallisation .....	114
<b>III.</b>	<b>Reconstitution de la boucle E de l'ARNr 5S et essais de cristallisation .....</b>	<b>114</b>
1.	Choix de la construction d'ARN .....	114
2.	Reconstitution du complexe et essais de cristallisation .....	115
<b>IV.</b>	<b>Résolution de la structure .....</b>	<b>117</b>
1.	Traitement des données de diffraction .....	117
2.	Phasage et construction du modèle .....	118
<b>V.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>121</b>
<b>Chapitre III : Rpf2 et Rrs1 dans la régulation de la transcription par l'ARN polymérase I</b>		<b>123</b>
<b>I.</b>	<b>Rpf2 et Rrs1 s'associent à la chromatine et stimulent la transcription des ARNr .....</b>	<b>124</b>
<b>II.</b>	<b>Caractérisation des interactions entre le dimère Rpf2/Rrs1 et l'ARN polymérase I .....</b>	<b>126</b>
1.	Test d'association in vitro entre Rpf2/Rrs1 et l'ARN polymérase I .....	128
2.	Test d'association in vitro entre Rpf2/Rrs1 et Rpa49/Rpa34 .....	129
3.	Caractérisation des interactions au sein du complexe Rpf2/Rrs1/Rpa49/Rpa34 .....	130
<b>III.</b>	<b>Discussion et perspectives .....</b>	<b>132</b>
<b>DISCUSSION .....</b>		<b>135</b>
1.	Les protéines à domaine BRIX et leurs partenaires .....	137
2.	La particule 5S et la régulation de la transcription des ARNr .....	138
3.	Le complexe Rpf2/Rrs1 comme cible thérapeutique .....	139
<b>MATÉRIELS &amp; METHODES .....</b>		<b>141</b>
<b>I.</b>	<b>Souches et plasmides .....</b>	<b>143</b>
1.	Souches bactériennes .....	143
2.	Souches de levure .....	143

3. Plasmides.....	143
<b>II. Expression et purification des protéines recombinantes.....</b>	<b>144</b>
1. Culture bactériennes .....	144
a. Rpf2/Rrs1 et formes tronquées.....	144
b. Rpa49/Rpa34 .....	145
2. Purification du dimère Rpf2/Rrs1 et des formes tronquées .....	145
a. Lyse des cellules .....	145
b. Chromatographie d'affinité de type His-trap.....	145
c. Chromatographie d'exclusion stérique .....	146
<b>III. Production et purification des ARN .....</b>	<b>146</b>
1. Extraction d'ARNr endogène de levure.....	146
2. Transcription in vitro de l'ARNr 5SΔ .....	147
a. Préparation de l'ADN matrice .....	147
b. Transcription in vitro et clivage des ribozymes .....	147
c. Purification de l'ARNr 5SΔ sur gel.....	147
<b>IV. Cristallogénèse .....</b>	<b>148</b>
1. Cristallisation du complexe Rpf2/Rrs1 .....	148
2. Cristallisation des complexes ARN/Rpf2/Rrs1 .....	148
a. Reconstitution du complexe ARNr 5S/Rpf2/Rrs1 et essais de cristallisation .....	148
b. Reconstitution du complexe 5SΔ/Rpf2Δ/Rrs1Δ et essais de cristallisation .....	149
c. Reconstitution des duplexes A et B, association avec le complexe Rpf2Δ/Rrs1Δ et essais de cristallisation .....	149
<b>V. Purification de l'ARN polymérase I et tests d'association avec le complexe Rpf2/Rrs1 .....</b>	<b>150</b>
1. Culture des levures et lyse des cellules .....	150
2. Purification sur billes d'IgG sépharose .....	150
3. Association avec le complexe Rpf2/Rrs1 .....	151
4. Clivage à la TEV et analyse en SDS-PAGE.....	151
<b>VI. Tests d'association par capture d'affinité entre Rpf2/Rrs1 et Rpa49/Rpa34 .....</b>	<b>151</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>153</b>



## Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ADP/ATP	Adénosine diphosphate/triphosphate
BRIX	<i>Biogenesis of Ribosome In Xenopus</i>
C-ter	Carboxyl-Terminal
CF	Centre fibrillaire
CF	<i>Core Factor</i>
CFD	Centre fibrillaire dense
CG	Centre granuleux
ChIP	<i>Chromatin immunoprecipitation</i>
CRAC	<i>UV Crosslinking and Analysis of cDNA</i>
Da	Dalton
DO	Densité optique
ETS	<i>External transcribed spacer</i>
g	Gramme
GDP/GTP	Guanosine diphosphate/triphosphate
HTP	Étiquette polyHistidine - Site TEV - Protéine A
ICR	<i>Internal control region</i>
IE	<i>Internal element</i>
IgG	Immunoglobulines G
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
IP	Immunoprécipitation
kb	Kilobase
MBP	<i>Maltose binding protein</i>
min	Minute
mol	Mole
NES	<i>Nuclear export signal</i>
NLS	<i>Nuclear localisation signal</i>
NOR	<i>Nucleolus Organizer Region</i>



Liste des abréviations

NTP	Nucléoside triphosphate
NTS	<i>Non-transcribed sequence</i>
NPC	<i>Nuclear pore complex</i>
N-ter	Amino-terminal
ORC	<i>Origin Recognition Complex</i>
PAGE	<i>Poly-acrylamide gel electrophoresis</i>
PET	<i>Polypeptide exit tunnel</i>
pré-ARNr	Précurseur d'ARN ribosomique
PTC	<i>Peptidyl-transferase center</i>
RNP	<i>Ribonucleoprotein complex</i>
Rpl	<i>Ribosomal protein Large</i>
Rps	<i>Ribosomal protein Small</i>
RMSD	<i>Root mean square deviation</i>
pdb	Paire de bases
s	Seconde
S	Svedberg
SAXS	<i>Small Angle X-ray Scattering</i>
SDS	Dodécysulfate de sodium
SAD	<i>Single-wavelength anomalous</i>
SIRAS	<i>Single isomorphous replacement with anomalous scattering</i>
snRNA	<i>Small nuclear RNA</i>
snoRNA	<i>Small nucleolar RNA</i>
SnoRNP	<i>Small Nucleolar RNP</i>
SU	Sous-unité
TAP	<i>Tandem affinity purification</i>
TOR	<i>Target of rapamycin</i>
UA	Unité d'absorbante
UAF	<i>Upstream Activation Factor</i>
UV	Ultra-violet

# INTRODUCTION

---



## Préambule

La production des deux sous-unités ribosomiques débute dans le nucléole avec la synthèse par l'ARN polymérase I d'un long ARN transcrit contenant les séquences des ARNr 5.8S, 18S et 25S, qui s'associe de manière co-transcriptionnelle à des protéines ribosomiques et à des facteurs d'assemblage. Le quatrième ARNr, l'ARNr 5S est transcrit séparément par l'ARN polymérase III, et s'associe avec les protéines ribosomiques Rpl5 et Rpl11 en dehors du ribosome. Ce sous-complexe, appelé particule 5S, est ensuite intégré au sein de la grande sous-unité. Outre son rôle constitutif dans les ribosomes, la particule 5S est également impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire. En effet, en cas de trouble de la biogenèse du ribosome, la particule 5S s'accumule dans le nucléoplasme et interagit directement avec l'ubiquitine-ligase MDM2, provoquant la stabilisation du suppresseur de tumeur p53.

Durant ma thèse, je me suis intéressé aux rôles des protéines Rpf2 et Rrs1 dans la biogenèse des ribosomes. Ces deux facteurs, conservés chez les eucaryotes, sont requis pour l'assemblage de la grande-sous unité ribosomique en favorisant l'intégration de la particule 5S. Ils jouent également un rôle dans la régulation de la synthèse des ARNr, en stimulant la transcription par l'ARN polymérase I.

La première partie de l'introduction sera consacrée à l'organisation structurale et fonctionnelle des ribosomes eucaryotes. La seconde partie proposera une revue des connaissances actuelles sur la transcription des ARNr et l'assemblage des sous-unités ribosomiques. La troisième partie traitera des liens entre la biogenèse des ribosomes et le contrôle de la prolifération cellulaire. Enfin, la dernière partie de cette introduction sera consacrée à la biogenèse de l'ARNr 5S et à la formation de la particule 5S.

## I. Généralités sur le ribosome eucaryote

Les ribosomes sont des complexes ribonucléoprotéiques (RNP) essentiels à toute vie cellulaire. Dans tous les domaines du vivant, ils assurent la traduction des ARN messagers (ARNm) en protéines en déchiffrant le code génétique à l'aide d'ARN de transferts (ARNt). Observés pour la première fois dans les années 40 par Albert Claude et George Palade, ces « granules » essentiellement composés de pentoses ont d'abord été suspectés de jouer un rôle dans le métabolisme des glucides (Claude, 1943 ; Palade, 1955). Ce n'est que dans les années 50 que l'équipe de Paul Zamecnik leur attribue un rôle dans la synthèse de protéines (Keller et al. 1954). Les premiers ribosomes ont été isolés en 1956 lors d'expériences d'ultracentrifugation de lysats cellulaires et sont depuis identifiés par leurs coefficients de sédimentation donnés en Svedberg (S) : on parlera de ribosomes 70S pour les Procaryotes et de ribosomes 80S pour les Eucaryotes. Ils sont constitués de deux sous-unités asymétriques : une grande sous-unité (60S chez les Eucaryotes, 50S chez les Procaryotes) et une petite sous-unité (40S chez les Eucaryotes, 30S chez les Procaryotes). Ces deux sous-unités s'assemblent en présence d'un ARNm pour former un ribosome fonctionnel et capable de réaliser la traduction.

Chez *S. cerevisiae*, le ribosome est constitué de quatre ARN ribosomiques (ARNr) et de 79 protéines. La grande sous-unité est formée des ARNr 5S, 5.8S et 25S (28S chez l'Homme) et de 46 protéines (appelées Rpl pour *Ribosomal protein Large*), tandis que la petite sous-unité est composée de l'ARNr 18S et de 33 protéines (appelées Rps pour *Ribosomal protein Small*). Même si la composition en ARN et en protéines des sous-unités ribosomiques est connue depuis le début des années 70, la résolution de la structure tri-dimensionnelle du ribosome a pendant longtemps été un véritable défi. Ce n'est que depuis 2005 que des structures à l'échelle atomique de ribosomes complets ont pu être résolues : les structures du ribosome 70S de *E. coli* à 3,5Å (Schuwirth et al. 2005) et du ribosome 80S de *S. cerevisiae* à 3Å (Ben-Shem et al. 2010) déterminées par cristallographie aux rayons X ont permis de visualiser la place prépondérante des ARNr au coeur de la structure, conservée entre Procaryotes et Eucaryotes. En effet, même si le ribosome eucaryote présente de nombreuses extensions spécifiques (environ 750 nucléotides pour les ARNr et 27 protéines ribosomiques), la structure du ribosome reste extrêmement bien conservée au cours de l'évolution.

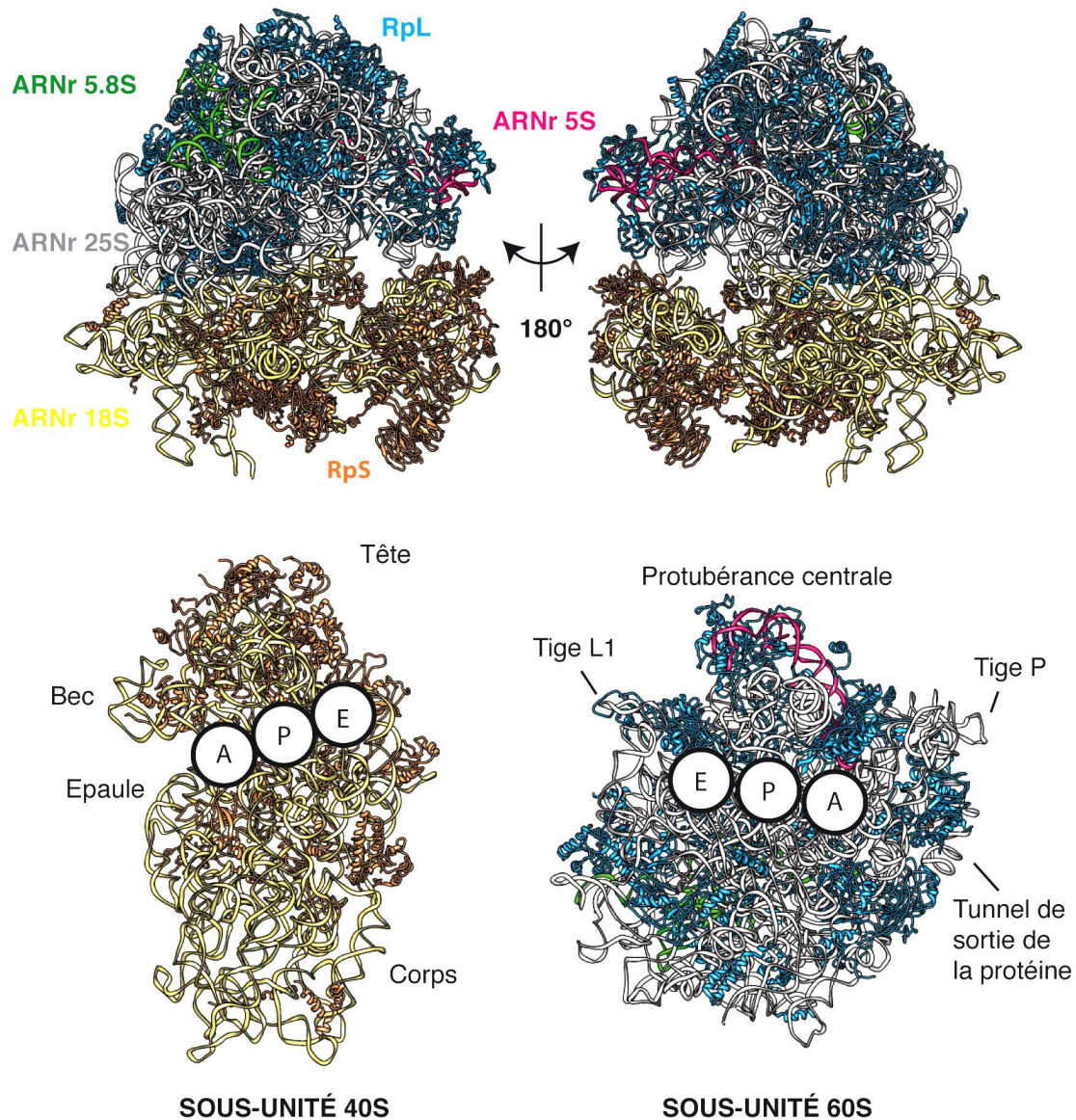
La petite sous-unité a une forme allongée qui rappelle celle d'un canard, et contient 5 domaines caractéristiques : le bec, la tête, le corps, l'épaule et la plateforme. Cette sous-unité est responsable de l'initiation de la traduction, en assurant la fixation des ARNt et le décodage de l'information portée par l'ARNm. Il est à noter que ce rôle est principalement assuré par l'ARN 18S, composant majeur du centre de décodage de la petite sous-unité. La grande sous-unité est hémisphérique, et est composée d'un domaine central associé à 3 protubérances : la

protubérance centrale et les tiges P et L1. Elle assure l'élongation de la traduction, et abrite le site peptidyl-transferase (PTC pour *peptidyl-transferase center*) qui catalyse la formation des liaisons peptidiques. Étonnamment, les protéines ribosomiques les plus proches sont situées à plus de 15Å du PTC : c'est l'ARNr 25S qui assure seul la fonction catalytique, faisant du ribosome un ribozyme. La grande sous-unité contient également le canal de sortie du polypeptide neosynthétisé (PET pour *polypeptide exit tunnel*), situé au niveau de la zone d'interaction avec la petite sous-unité. À l'interface entre les deux sous-unités, on retrouve les sites de liaisons aux ARNt. Ils sont appelés A, P et E : le site A (pour *Aminoacyl*) fixe l'ARNt aminoacylé entrant dans le ribosome, le site P (pour *Peptidyl*) contient l'ARNt portant la chaîne polypeptidique en cours d'élongation et le site E (pour *Exit*) correspond à la position de l'ARNt déaminoacylé juste avant qu'il ne quitte le ribosome (**Figure 1**).

La construction de ces gigantesques machines moléculaires est cruciale pour la cellule. En effet, le nombre de ribosomes dans une cellule détermine sa capacité à croître, à se différencier, ou à proliférer (Rudra et Warner, 2004), et des erreurs dans la biogenèse des ribosomes sont à l'origine de pathologies sévères, comme l'anémie de Blackfan-Diamond, la dyskératose congénitale ou le syndrome de Treacher Collins. Ces maladies génétiques, appelées ribosomopathies, sont associées à des mutations touchant les protéines ribosomiques ou les facteurs impliqués dans leur assemblage (Narla et Ebert, 2010). Elles se caractérisent par des défauts de l'hématopoïèse et du développement, et prédisposent les malades à l'apparition de cancers.

Chez les Eucaryotes, l'assemblage des sous-unités ribosomiques nécessite l'intervention d'environ 200 facteurs d'assemblage. Ils peuvent jouer un rôle dans le repliement, la modification et le clivage des ARNr, être impliqués dans le recrutement de protéines ribosomiques, ou encore agir comme cargo, pour transporter ces différents acteurs de part et d'autre de la membrane nucléaire. L'ensemble de ces événements doit être ordonné, et finement régulé. En combinant des ARNr et des protéines ribosomiques de la bactérie *E. coli*, il est possible de provoquer l'auto-assemblage de sous-unités ribosomiques (Held et al. 1973). De telles reconstitutions *in vitro* sont impossibles avec des ribosomes eucaryotes, ce qui souligne la complexité plus importante de la structure de ses sous-unités et de leurs mécanismes d'assemblage. La biogenèse des ribosomes est étudiée depuis plus de 30 ans chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cet organisme modèle présente d'énormes avantages au niveau génétique (premier génome eucaryote séquencé, génération rapide de mutants, criblages génétiques...) et biochimiques (purifications en tandem de complexes protéiques, étude de l'interactome). La plupart des facteurs impliqués dans l'assemblage des sous-unités ribosomiques sont conservés de la levure à l'Homme. Je m'attacherai donc dans un premier

temps à décrire la biogenèse du ribosome chez *S. cerevisiae*, et je soulignerai ensuite les différences notoires retrouvées dans cette voie métabolique chez l'Homme.



**Figure 1 : Structure du ribosome 80S de *S. cerevisiae***

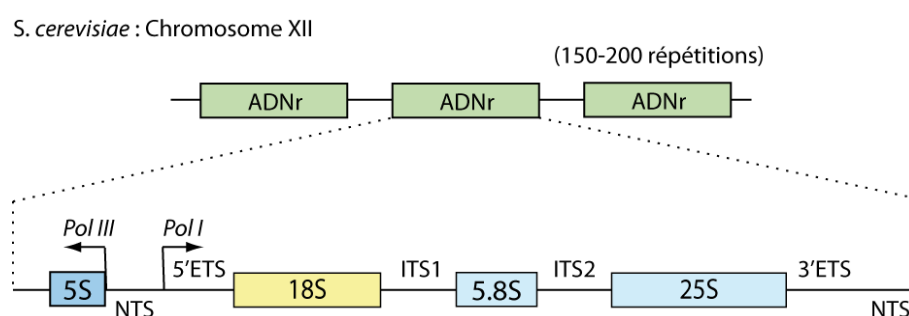
Structure cristallographique du ribosome de *S. cerevisiae* à 3Å de résolution (code PDB : 4V7R). En bas sont représentées des vues de l'interface de la structure de la grande et de la petite sous-unité. Les sites de fixation A, P et E des ARNt y sont schématisés.

## II. La biogenèse du ribosome

L'assemblage des ribosomes implique l'action coordonnée des trois ARN polymérases eucaryotes. L'ARN polymérase I transcrit les ARNr 18S, 5.8S et 25S (28S chez l'Homme) sous la forme d'un long précurseur polycistronique appelé pré-ARNr 35S (47S chez l'Homme). L'ARN polymérase II synthétise les ARNm codant les protéines ribosomiques et les facteurs d'assemblage ou de modification. Elle catalyse également la biosynthèse de petits ARN nucléaires (snRNA et snoRNA) impliqués dans les modifications des ARNr. L'ARN polymérase III transcrit quant à elle l'ARNr 5S. Je commencerai ici par rappeler brièvement les connaissances actuelles sur la synthèse du pré-ARNr 35S. La biogenèse de l'ARNr 5S sera traitée dans la quatrième partie de l'introduction.

### 1. Organisation des ADNr et du nucléole

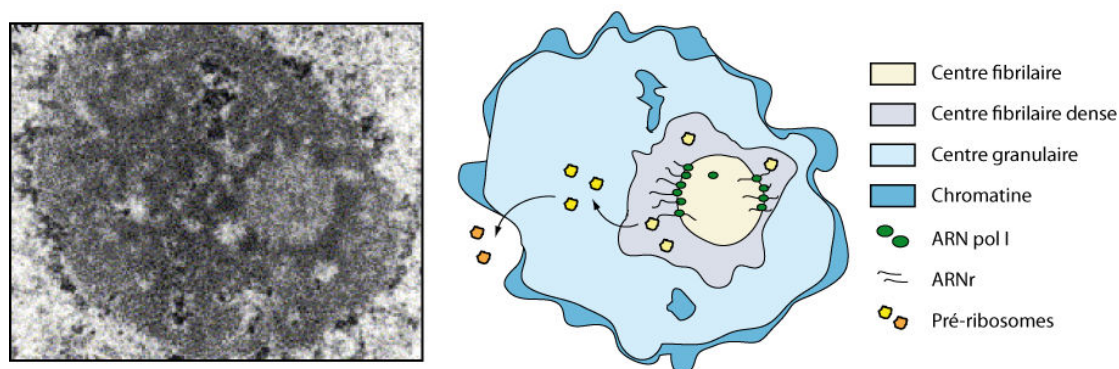
Chez les Eucaryotes, les gènes codant pour les ARNr (ADNr) sont présents en plusieurs centaines de copies répétées en tandem. Ces copies sont situées sur des loci chromosomiques appelés NOR (pour *Nucleolus Organizer Region*). Chez *S. cerevisiae*, on compte entre 150 à 200 copies d'ADNr regroupées sur le chromosome XII (Kobayashi et al. 1998). Chaque répétition contient la séquence codante pour les quatre ARNr (**Figure 2**). Chez l'Homme, environ 400 copies des gènes codants pour les ARNr 18S, 5.8S et 28S sont regroupées sur les bras courts des chromosomes XIII, XIV, XV, XX1 et XXII. Les gènes codant pour l'ARNr 5S sont regroupés dans un autre locus situé sur le chromosome I. L'assemblage et la maturation des sous-unités ribosomiques débutent de manière co-transcriptionnelle dans le voisinage des NOR, entraînant



**Figure 2 : Organisation de l'ADNr chez *S. cerevisiae***

Les ADNr sont répétés entre 150 à 200 fois sur le chromosome XII. Chaque unité de transcription contient le gène codant pour l'ARNr 5S, qui sera transcrit par l'ARN polymérase III, et les gènes codants les ARNr 18S, 5.8S et 25S séparés par des espaceurs internes (ITS) et externes (ETS). Les différentes séquences codantes sont séparées par des espaceurs non transcrits (NTS).





**Figure 3 : Organisation du nucléole**

*Observation en microscopie électronique d'un nucléole humain (à gauche) et représentation schématique de l'organisation nucléolaire de la cellule humaine et de la levure (à droite). (adapté de Thiry et Lafontaine, 2005)*

la formation du nucléole. Le nucléole n'est pas un organite puisqu'il n'est pas entouré de membrane. C'est un territoire dynamique, riche en ARN et en protéines, et dont l'apparence varie en fonction de son activité. Il est organisé en trois composants majeurs, facilement observables en microscopie électronique. Les centres fibrillaires (CF) contiennent l'ADNr et les ARN polymérase I, alors que les transcrits naissants s'accumulent dans les centres fibrillaires denses (CFD). Ces deux composants sont enchâssés dans le composant granulaire (CG) qui est le lieu de maturation et d'assemblage des sous-unités ribosomiques (**Figure 3**). Chez la levure en phase exponentielle de croissance, environ 2000 ribosomes sont produits par minute. Pour cela, 60% de l'activité transcriptionnelle de la cellule va être dédiée à la fabrication des sous-unités ribosomiques (Warner, 1999). La plupart de cette activité est assurée par l'ARN polymérase I qui doit maintenir une vitesse d'élongation de 40 à 60 nucléotides par seconde (Kos and Tollervey, 2010). Le taux de synthèse des ARNr varie en fonction des conditions environnementales et est contrôlé par la voie métabolique de réponse aux nutriments TOR (pour *Target Of Rapamycin*) (Iadevaia et al, 2014). Par ailleurs, la synthèse des ARNr est régulée par 3 événements majeurs : la disponibilité et l'activation de l'ADNr, la formation du complexe d'initiation, et l'élongation de la transcription.

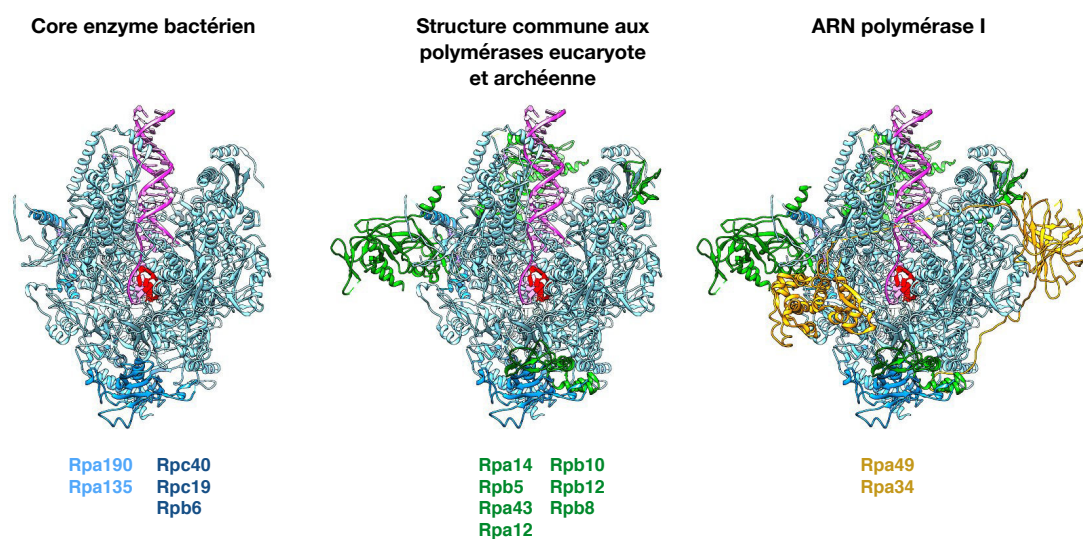
Chez la levure, le nombre de locus d'ADNr transcriptionnellement actifs décroît en phase stationnaire, indiquant que la proportion de gènes actifs peut être modulée en fonction des conditions de croissance cellulaire (Damman et al, 1993). Chez *S. cerevisiae*, seulement la moitié des ADNr sont activement transcrits (Toussaint et al. 2005). Ils sont dépourvus d'histones, et associés à la protéine Hmo1 (UBF1 chez l'Homme) (Merz et al. 2008). Les autres sont maintenus dans un état inactif. Chez l'Homme, ces inactivations peuvent être dues à des méthylations de l'ADNr, absentes chez la levure.

## 2. L'ARN polymérase I

### a. Organisation structurale de l'ARN polymérase I

L'ARN polymérase I est un complexe de 590 kDa constituée de 14 protéines. Parmi elles, cinq sous-unités (Rpa190, Rpa135, Rpc40, Rpc19 et Rpb6) forment le « core enzyme », conservé entre toutes les polymérases bactériennes, archéennes et eucaryotes. Le « core enzyme » se structure autour des deux plus grandes sous-unités de l'ARN polymérase I, Rpa135 et Rpa190,. Ces protéines forment le canal ADN, la pince (*clamp*) qui permet en se fermant une association efficace avec l'ADN, et la poche catalytique. Autour de cette structure ancestrale, on retrouve différentes sous-unités, communes aux polymérases Archéennes et Eucaryotes, qui ne sont pas directement impliquées dans le processus catalytique (**Figure 4**).

Les sous-unités Rpa14, Rpa34, Rpa43 et Rpa49 sont impliquées dans le fonctionnement spécifique de l'ARN polymérase I. Rpa43 et Rpa14 forment un hétérodimère spécialisé dans le recrutement du facteur d'initiation de la transcription Rrn3. La structure en « tige » formée par ce dimère est d'ailleurs un attribut structural spécifique de l'ARN polymérase I



**Figure 4 : Structure de l'ARN polymérase I**

(À gauche) Les sous unités de l'ARN polymérase I correspondant au core enzymatique bactérien ont été représentées en bleu. (Au centre) Les sous-unités de l'ARN polymérase I retrouvées chez les polymérases archéennes et eucaryotes ont été représentées en vert. (À droite) Les sous-unités Rpa49 et Rpa34 spécifiques de l'ARN polymérase I ont été représentées en jaune. Dans les trois représentations, l'ADN est représenté en rose, et l'ARN en rouge (code PDB : 5M64)

(Kuhn et al. 2007). Rpa49 et Rpa34 sont impliquées dans l'élongation de la transcription (Beckouet et al. 2008 ; Geiger et al. 2010 ; Albert et al. 2011).

Les sous-unités Rpa49 et Rpa34 n'ont pas d'équivalent dans les autres polymérase eucaryotes. Ces deux sous-unités sont structurellement homologues aux facteurs de transcription TFIIF et TFIIE, nécessaires à l'initiation par l'ARN polymérase II (Geiger et al. 2010). Cependant, la présence de domaines additionnels et d'extensions spécifiques à Rpa49 et Rpa34 suggère que ces sous-unités ont évolué de façon à garantir une initiation spécifique aux promoteurs des ADNr.

#### **b. Initiation de la transcription de l'ARN polymérase I**

L'ARN polymérase I ne peut pas fixer directement l'ADNr, mais est recrutée par deux facteurs de pré-initiation, le *Core Factor (CF)* (SL1 chez l'Homme) qui reconnaît le promoteur basal, et le *Upstream Activation Factor (UAF)* qui fixe les régions activatrices en amont du promoteur. Ce complexe est reconnu par l'ARN polymérase I associée au facteur d'initiation spécialisé Rrn3 (TIFIA chez l'Homme). Rrn3 empêche la dimérisation de l'ARN polymérase I et la maintient dans un état monomérique actif (Milkereit et Tschochner. 1998 ; Engel et al. 2016). Curieusement, seulement 2% des ARN polymérase I contenues dans un extrait total de levure sont actives et compétentes pour initier la transcription. D'autre part, la protéine Hmo1 qui maintient les ADNr dans un état transcriptionnellement actif semble également jouer un rôle dans le recrutement du complexe d'initiation (Kasahara et al. 2011). La transcription par l'ARN polymérase I est un processus complexe qui implique également de nombreux facteurs d'élongation et de terminaison dont la description sort du contexte de cette thèse. Je me contenterai donc de discuter du couplage entre transcription et assemblage des sous-unités ribosomiques.

### **3. Les facteurs d'assemblage de la biogenèse du ribosome**

Chez la levure, la biogenèse du ribosome fait intervenir environ 200 facteurs impliqués dans la maturation des ARNr et l'assemblage des sous-unités. Le criblage génétique, le développement des méthodes de purification de particules ribosomiques et l'essor de la protéomique ont permis d'identifier la majorité de ces facteurs. Chez l'homme, un criblage systématique par siRNA mené sur 625 protéines nucléolaires de cellules HeLa a permis d'identifier 286 protéines nécessaires à la maturation des ARNr. Parmi elles, 153 possèdent un orthologue requis pour la biogenèse des ribosomes chez la levure. 59 autres protéines sont conservées chez la levure, mais ne semblent pas être impliquées dans la maturation des ARNr. Enfin, 74 facteurs d'assemblages ne possèdent pas d'homologues encore identifiés chez la

levure, ce qui semble indiquer la complexification du processus d'assemblage des sous-unités ribosomiques chez l'Homme (Tafforeau et al. 2013). Même si la déplétion de ces protéines conduit à des défauts de la biogenèse des ribosomes, les rôles précis de beaucoup d'entre elles restent à élucider. Certains de ces facteurs sont impliqués dans le clivage ou la modification des ARNr (endo- et exo-nucléases, sno-RNP et méthyltransférases). D'autres jouent un rôle dans la modification post-traductionnelle de protéines (kinases et phosphatases). Enfin, certains facteurs ATP-dépendants sont à l'origine de remaniements structuraux au sein des pré-ribosomes (hélicases, ATPases).

#### a. Les facteurs d'assemblage impliqués dans les modifications des ARNr

La maturation des ARNr requiert l'intervention de différentes nucléases, séquentiellement dans le nucléole, le nucléoplasme et le cytoplasme. Ces endo- et exo-nucléases sont responsables des différents clivages que subissent les pré-ARNr tout au long de l'assemblage des sous-unités ribosomiques. Ces clivages conduisent à l'élimination des séquences dites "espaceurs" qui flanquent les séquences matures des ARNr.

Chez la levure, environ 2% des nucléotides contenus dans les ARNr portent des modifications chimiques, comme des 2'-O-méthylations ou des pseudouridylations. Ces modifications sont le plus souvent concentrées dans des régions fonctionnelles importantes du ribosome, comme le site peptidyl-transférase ou le centre de décodage, et leurs absences mènent à des défauts de croissance cellulaire (Liang et al. 2009). La plupart de ces modifications sont catalysées dans le nucléole par des petits complexes ribonucléoprotéiques appelés snoRNP (pour *Small Nucleolar RNP*) qui peuvent appartenir à deux classes : les snoRNP à boîtes H/ACA responsables de l'isomérisation de l'uridine en pseudouridine, et les snoRNP à boîtes C/D qui catalysent des méthylations sur le groupement hydroxyle en position 2' des riboses. Dans ces deux cas, elles sont constituées d'un ARN variable appelé snoRNA associé à quatre protéines. La reconnaissance du site de modification du pré-ARNr est assurée par la composante ARN, qui positionne le complexe à proximité du nucléotide à modifier. La catalyse est réalisée par une protéine : Cbf5 (dyskérine chez l'Homme) pour les boîtes H/ACA et Nop1 (fibrillarine chez l'Homme) pour les boîtes C/D. En plus de leur rôle dans la maturation et le repliement des ARNr, certaines études montrent que ces snoRNP peuvent également être impliquées dans l'épissage alternatif d'ARNm (Kishore et al. 2006), la régulation de l'expression génique (Ono et al. 2010), ou même la réponse au stress métabolique (Michel et al. 2011).

Des méthyl-transférases sont également impliquées dans la modification des ARNr. Par exemple, la protéine Dim1 est responsable de la méthylation du pré-ARNr 20S dans le cytoplasme chez la levure (Lafontaine et al. 1995). La protéine DIMT1L, homologue de Dim1 chez l'Homme, catalyse cette réaction dans le noyau (Zorbas et al. 2015), ce qui souligne

l'existence de différences fonctionnelles notoires entre certains facteurs conservés entre la levure et l'Homme.

### **b. Les facteurs d'assemblage NTP-dépendants**

Chez *S. cerevisiae*, la biogenèse des ribosomes implique 19 hélicases à ARN, toutes conservées chez l'Homme (à l'exception de Dbp3). Elles appartiennent toutes (à l'exception de Mtr4) à la superfamille SF2, dans laquelle on distingue les hélicases à boîte DEAD des hélicases à boîte DEAH. La plupart d'entre elles utilisent l'énergie de l'ATP ou du GTP pour moduler des interactions ARNr-ARNr ou ARNr-protéine au sein des pré-ribosomes. Elles sont notamment impliquées dans les mécanismes d'assemblage et de dissociation de snoRNP (Bohnsack et al. , 2008 ; Srivastava et al. 2010). Par ailleurs, certaines études suggèrent que des hélicases seraient nécessaires aux clivages des pré-ARNr, en préparant les sites de coupure à l'attaque des nucléases (Pertschy et al. 2009 ; Weaver et al. 1997).

Les hélicases ne sont pas les seuls facteurs d'assemblage énergie-dépendants. En effet, la biogenèse des ribosomes chez *S. cerevisiae* est guidée par trois AAA-ATPases : Rix7, Rea1 et Drg1, qui interviennent à des étapes distinctes pour promouvoir la dissociation de certains facteurs d'assemblage. Elles utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour générer de larges remaniements structuraux au sein de la particule pré-60S, d'abord dans le nucléole (Rix7), dans le nucléoplasme (Rea1) et enfin dans le cytoplasme (Drg1).

La biogenèse des ribosomes implique également des GTPases. On peut citer par exemple le facteur eIF5B, requis pour l'association de la sous-unité 60S avec la particule pré-40S lors de l'étape finale de maturation de la petite sous-unité (Lebaron et al. 2012 ; Strunk et al. 2012).

### **c. Les facteurs d'assemblage dépourvus d'activité enzymatique**

De nombreux facteurs d'assemblage ne possèdent pas d'activités enzymatiques encore identifiées, mais comportent des domaines d'interaction ARN-protéine (doigts de zinc, RRM, GAR...), ou protéine-protéine (WD40, HEAT, HAT...). Ils organisent la maturation des sous-unités ribosomiques en recrutant protéines ribosomiques et facteurs d'assemblage. Certains forment des sous-complexes, intégrés « en bloc » durant la maturation des pré-ARNr. C'est notamment le cas des complexes UTPA et UTPB, nécessaires aux premières étapes de la biogenèse des ribosomes.

D'autres facteurs, appelés "placeholder", organisent l'assemblage des particules pré-ribosomiques en occupant les mêmes sites de fixation que certaines protéines ribosomiques. Ces facteurs contrôlent la progression de la maturation des sous-unités ribosomiques en empêchant l'association précoce de certaines protéines et en prévenant la formation de

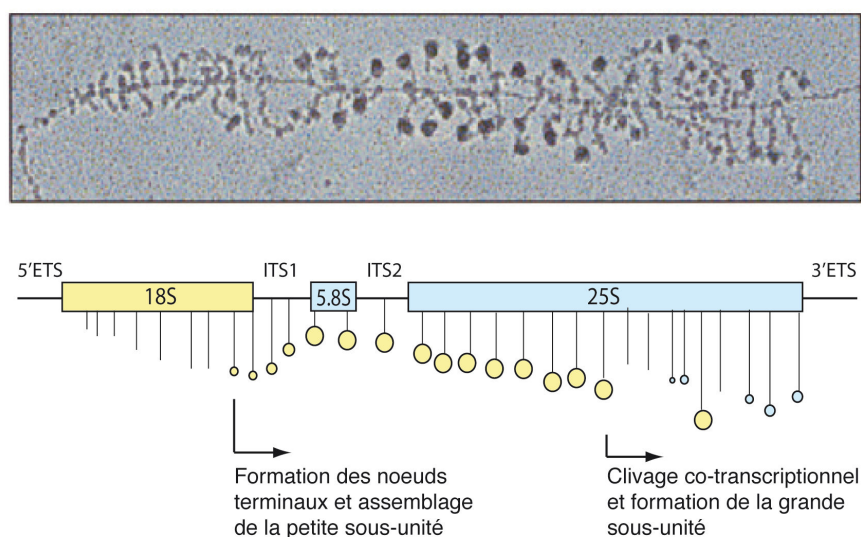
structures aberrantes. C'est notamment le cas des facteurs Mrt4 et Mex67, qui occupent tour à tour le site de liaison de la protéine ribosomique P0 au niveau de la tige P de la grande sous-unité (Rodriguez-Moteos et al. 2009 ; Sarkar et al. 2016). Parmi ces facteurs, on peut également citer le facteur d'assemblage Rlp24 qui occupe le même site de liaison sur la grande sous-unité que la protéine ribosomique Rpl24. Ces deux protéines possèdent un domaine N-terminal homologue, qui fixe la même région de l'ARNr 25S. Par ailleurs, Rlp24 permet le recrutement de différents facteurs d'assemblages essentiels à la maturation de la grande sous-unité. L'association de Rlp24 est par exemple couplée à celle de la GTPase Nog1 (Saveanu et al, 2003). Sa dissociation dans le cytoplasme est due à l'AAA-ATPase Drg1, qui fixe directement l'extension C-terminale de Rlp24 (Pertschy et al. 2007; Kappel et al. 2012).

Dans ce manuscrit, je m'intéresserai particulièrement aux facteurs d'assemblage portant des domaines BRIX (pour *Biogenesis of Ribosome In Xenopus*) retrouvés chez cinq protéines différentes : Rpf2, Rpf1, Imp4, Brix1, et Ssf1 (Wehner and Baserga 2002). La fonction de ce domaine BRIX n'est pas bien connue. Des tests d'interaction *in vitro* ont montré que ces protéines étaient capables d'interagir *in vitro* avec des ADN et ARN synthétiques (poly(A), poly(U), poly(G)), mais aucun partenaire ARN ou ADN de ces cinq protéines n'a pour l'instant été clairement identifié *in vivo*. Dans ce manuscrit, je m'appliquerai à décrire le rôle de ces différents facteurs d'assemblage, impliqués dans différentes étapes de la synthèse de la grande et de la petite sous-unité.

#### 4. Transcription des ARNr et assemblage co-transcriptionnel

Chez *S. cerevisiae*, la maturation de l'ARNr pré-35S est co-transcriptionnelle. Ce phénomène peut être mis en évidence par microscopie électronique en observant les « arbres de Miller » obtenus après étalement des ADNr en train d'être transcrits (Miller and Beatty, 1969). L'ADNr est totalement recouvert d'ARN polymérase I, desquelles émanent les transcrits néo-synthétisés. Cette structure rappelle celle d'un sapin de Noël, avec un tronc formé d'ADNr et d'ARN polymérase I, des branches correspondant aux ARNr décorées de boules terminales qui correspondent aux particules pré-ribosomiques qui se forment de manière co-transcriptionnelle (Figure 5).

Dès le début de la transcription, la 5'ETS est pris en charge par les complexes protéiques UTPA et UTPB ainsi que la snoRNP U3 (Hunziker et al. 2016). Le snoRNA U3 s'hybride au pré-ARN au niveaux de quatre régions différentes du 18S et du 5'ETS pour chaperonner l'assemblage des pré-ribosomes (Beltrame et Tollervey 1995). La protéine Rrp5, qui contient 12 motifs S1 de liaison à l'ARN et 7 domaines TPR de liaison protéique guide les différents clivages endonucléolytiques que va subir le pré-ARN : son domaine N-terminal est



**Figure 5 : Visualisation de la transcription par étalement de chromatine**

Observation en microscopie électronique d'un étalement de chromatine de levure (en haut) et représentation schématique de la transcription par l'ARN polymérase I (en bas).

nécessaire au clivage au site  $A_3$  et son domaine C-terminal est requis pour les clivages aux sites  $A_0$  et  $A_2$  (Lebaron et al. 2013).

Certains facteurs d'assemblage forment des sous-complexes avant de s'associer aux pré-ribosomes. C'est notamment le cas de la protéine à domaine BRIX Imp4, qui s'associe avec les facteurs Imp3 et Mpp10 (Granneman et al. 2003) en dehors des particules ribosomiques. In vitro, ce complexe s'associe avec le snoRNA U3 pour modifier ses appariements avec le pré-ARNr (Gerczei et al. 2004, 2009).

## 5. Clivages aux sites $A_0$ , $A_1$ et $A_2$

Le pré-ARNr 35S contient les séquences des ARNr 18S, 5.8S et 25S, flanquées par deux séquences espaceurs externes (5'ETS et 3'ETS) et séparées par deux séquences espaceurs internes (ITS1 et ITS2) (Figure 6). Le pré-ARNr 35S va subir trois clivages endonucléolytiques précis : l'espaceur 5'ETS va être éliminé après deux étapes de coupures successives en  $A_0$  et  $A_1$  et l'espaceur ITS1 va être clivé au niveau du site  $A_2$ . L'enchaînement des clivages en  $A_0$ ,  $A_1$  et  $A_2$  est variable : tous les intermédiaires ARN sont retrouvés et l'ordre des clivages n'affecte pas la structure globale de la particule 90S (Sun et al. 2017). Chez la Levure, le clivage au site  $A_1$  conduit directement à la formation de l'extrémité 5' de l'ARNr 18S et à l'élimination de l'espaceur 5'ETS (Venema et Tollervey 1995). Chez l'Homme, plusieurs études *in vitro* suggèrent l'existence d'autres étapes nécessaires à la formation de cette extrémité (Yu et

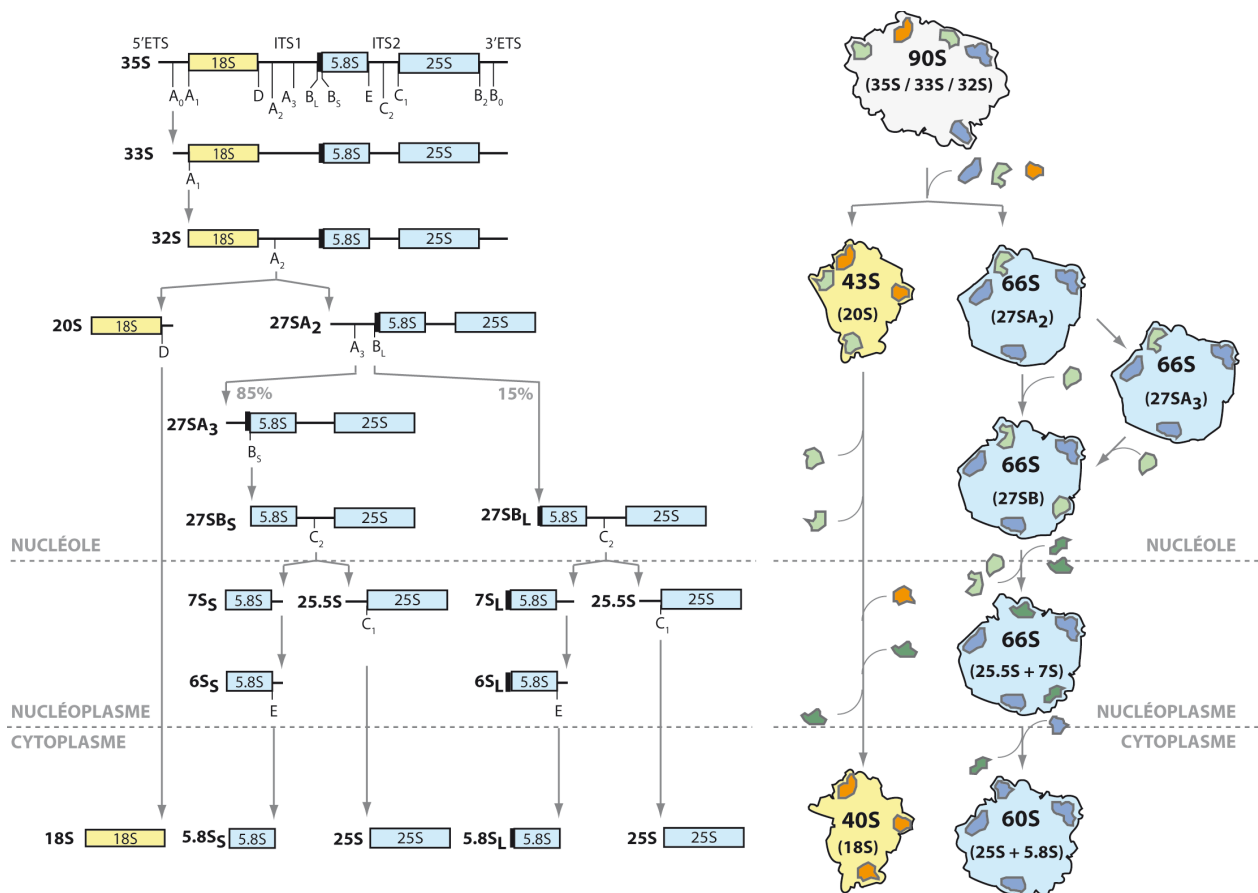
Nilsen, 1992). Si l'enzyme responsable du clivage en  $A_0$  reste encore méconnue, plusieurs études ont souligné l'importance des protéines Utp23 et Utp24 dans les clivages aux sites  $A_1$  et  $A_2$  (Wells et al. 2017 ; Bleichert et al. 2006), remettant en cause le rôle de l'endonucléase Rcl1 (Horn et al, 2011). Le clivage en  $A_2$  génère les ARNr 20S et 27SA<sub>2</sub> et sépare les voies d'assemblage de la petite et de la grande sous-unité. D'un côté, le 20S est assemblé en particules 43S (Udem and Warner 1973) qui seront exportées dans le cytoplasme pour les dernières étapes de maturation (Fatica et al. 2003) De l'autre, le 27SA<sub>2</sub> est assemblé en particules 66S (Trapman et al. 1975) qui va suivre une maturation plus longue et plus complexe. Chez la Levure, il est maintenant admis que le clivage en ITS1 se fait majoritairement de manière co-transcriptionnelle (Kos et Tollervey, 2010). En revanche, ce clivage demeure principalement post-transcriptionnel chez les vertébrés.

Dans la suite de ce manuscrit, je m'attacherai à décrire l'assemblage et la maturation de la grande sous-unité du ribosome (les détails concernant la maturation de la petite sous-unité peuvent être retrouvés dans les revues suivantes : Henras et al., 2008 et 2015). En fonction du contenu ARN des particules pré-60S, on peut séparer la biogenèse de la grande sous-unité en différentes étapes. (1) Les étapes précoces consistent au clivage et à l'élimination de l'espaceur ITS1 pour générer l'ARNr 27SB. (2) Les étapes intermédiaires conduisent au clivage de l'ITS2 qui sépare les ARNr 5.8S et du 25S. (3) Les étapes nucléaires tardives mènent à l'élimination de l'espaceur ITS2 et à l'export des sous-unités ribosomiques dans le cytoplasme. (4) Les étapes finales de maturation qui ont lieu dans le cytoplasme et sont associées à des contrôles qualité des différents sites fonctionnels (Figure 6).

## 6. Les étapes précoces de la biogenèse de la grande sous-unité du ribosome

Après le clivage en  $A_2$  qui sépare les voies d'assemblage de la grande et de la petite sous-unité, le pré-ARNr 27SA<sub>2</sub>, précurseur des ARNr 25S et 5.8S suit deux voies de maturation alternatives. Ces deux voies diffèrent par la manière dont est éliminé l'espaceur ITS1. Chez la levure, 80 à 90% des pré-ARNr sont clivés au site  $A_3$  par l'endonucléase MRP pour former le pré-ARNr 27SA<sub>3</sub> (Lindahl et al, 1992 ; Schmitt et Clayton 1993). Dans cette voie dite « majeure », les séquences restantes de l'espaceur ITS1 sont éliminées jusqu'au site  $B_{1s}$  par les exonucléases Rat1, Xrn1 et Rrp17, formant ainsi le pré-ARN 27SB<sub>s</sub> (Henry et al. 1994 ; Oeffinger et al. 2009). Les 10 à 20% des pré-ARNr 27SA<sub>2</sub>, restants sont directement clivés au site  $B_{1L}$  par une enzyme encore inconnue. Cette voie dite « mineure » aboutit à la formation du pré-ARNr 27SB<sub>L</sub> (Henry et al. 1994). Les pré-ARNr 27SB<sub>L</sub> et 27SB<sub>s</sub>, diffèrent par la présence de 6 nucléotides à l'extrémité 5' de la séquence de l'ARNr 5.8S. Cette hétérogénéité ne sera pas





**Figure 6 : La biogenèse du ribosome chez *S. cerevisiae***

Maturation de l'ARNr pré-35S chez *S. cerevisiae* (à gauche). Les séquences des ARNr 18S, 5.8S et 25S sont flanquées par des espaceurs externes (ETS) et internes (ITS) qui vont être éliminés à la suite de clivages endo- et exo-nucléolytiques, successivement dans le nucléole, le nucléoplasme et le cytoplasme. Compartimentation cellulaire de la biogenèse du ribosome (à droite). La composition protéique des pré-ribosomes est très dynamique : des facteurs d'assemblage (en vert) et des protéines ribosomiques (en orange et en bleu) s'associent dans le nucléole, le nucléoplasme et le cytoplasme.

corrigée, et on retrouvera deux populations distinctes d'ARNr 5.8S au sein des ribosomes matures (5.8S<sub>S</sub> et 5.8S<sub>L</sub>).

L'élimination de l'espaceur ITS1 requiert douze facteurs d'assemblage appelés « facteurs A<sub>3</sub> » (Ebp2, Brx1, Pwp1, Nop12, Nop7, Ytm1, Erb1, Rlp7, Nop15, Cic1, Drs1 et Has1) et 11 protéines ribosomiques (Rpl3, Rpl4, Rpl6, Rpl8, Rpl16, Rpl18, Rpl20, Rpl32, Rpl33, Rpl36) dont l'absence mène à une accumulation du pré-ARNr 27SA<sub>3</sub> (Woolford et Baserga, 2013).

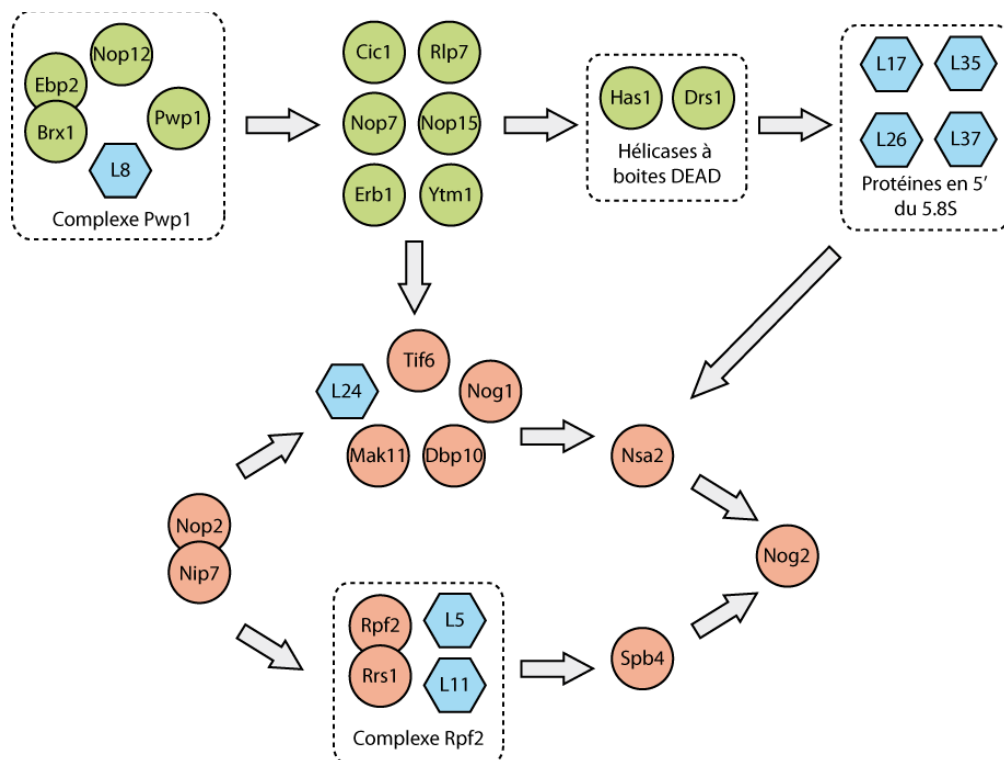
Hormis les hélicases à boîte DEAD Drs1 et Has1, aucun des facteurs A3 n'a d'activité enzymatique identifiée à ce jour. Ils ne catalysent donc pas directement la clivage des pré-ARNr mais semblent jouer un rôle structural stabilisateur propice au recrutement des différentes nucléases. Par ailleurs, ces facteurs A3 contiennent des motifs de liaison à l'ARN. C'est notamment le cas de Brx1, qui contient un domaine BRIX. Son rôle dans la biogenèse du ribosome est encore mal caractérisé. Brx1 serait nécessaire pour le recrutement des facteurs d'assemblages Ebp2, Pwp1 et Nop12, et des protéines ribosomiques Rpl8, Rpl34 et Rpl36, tous requis pour la maturation du 27SA<sub>2</sub> en 27SA<sub>3</sub> (Wan et al. 2015) (**Figure 7**). Le recrutement des facteurs A<sub>3</sub> aboutit également à la fixation de Rpl17 au niveau de l'extrémité 5' de l'ARNr 5.8S. La liaison de Rpl17 semble empêcher la dégradation de l'ARNr 5.8S au delà du site B1<sub>s</sub>.

## 7. Les étapes intermédiaires de la biogenèse de la grande sous-unité du ribosome

Ces étapes incluent de larges remaniements structuraux menant à la formation des sites fonctionnels de la grande sous-unité (PTC et PET) ainsi qu'au clivage et à l'élimination de l'espaceur ITS2. Elles correspondent également à la sortie des pré-ribosomes du nucléole.

Environ 75 facteurs d'assemblage sont associés aux particules 66S. Quatorze sont nécessaires au clivage du pré-ARNr 27SB en C<sub>2</sub>, et sont appelés facteurs B. L'absence de chacune de ces protéines mène à une accumulation du pré-ARNr 27SB et à une diminution des pré-ARNr 25.5S et 7S. La résolution ou la prédiction des structures de ces facteurs a permis de les classer en plusieurs catégories. On compte quatre hélicases (Drs1, Has1, Sbp4 et Dbp10), deux GTPases (Nog1 et Nog2), cinq protéines contenant des domaines de liaison à l'ARN (Rpf2, Nip7, Nsa2, Rlp24 et Tif6), une protéine « scaffold » (Mak11) et une méthyltransferase putative (Nop2). Enfin, une de ces protéines, Rrs1, n'a pas de domaine identifiable à partir de l'analyse de sa séquence primaire. Les protéines Rrs1 et Rpf2 (une autre protéine à domaine BRIX) sont impliquées dans l'intégration de l'ARNr 5S au sein de la protubérance centrale des pré-ribosomes (Zhang et al. 2007). Le rôle de ces deux facteurs d'assemblage est l'objet majeur de cette thèse.

L'espaceur ITS2 est clivé au site C<sub>2</sub> par l'endonucléase Las1 (Schillewaert et al. 2012). L'assemblage hiérarchisé de chacun des quatorze facteurs B est requis pour ce clivage. Ils s'associent aux pré-ribosomes à travers deux voies d'assemblage parallèles, qui convergent pour recruter Nog2, le dernier facteur B à s'associer aux pré-ribosomes avant le clivage en C2 (**Figure 7**) (Talkish et al. 2012). Il est intéressant de noter qu'aucun de ces facteurs B ne semblent interagir directement avec l'espaceur ITS2, mais qu'ils seraient plutôt impliqués dans l'organisation structurale de sites fonctionnels, comme le PET ou le PTC. C'est notamment le cas de la GTPase Nog1, dont l'extrémité C-terminale s'engouffre dans le PET jusqu'à contacter



**Figure 7 : Recrutement séquentiel des facteurs A3 et des facteurs B**

Les facteurs A3 sont représentés en vert, les facteurs B en rouge, et les protéines ribosomiques en bleu.

le PTC (Wu et al. 2016, Fuentes et al. 2007). Nog1 pourrait ainsi participer à la formation du PET, tout en prévenant l'association précoce d'autres facteurs d'assemblages avec ce site fonctionnel. La déplétion ou l'inactivation de Nog1 mène d'ailleurs à une absence de clivage en C<sub>2</sub> (Fuentes et al. 2007, Lapik et al. 2007). La fixation de Nog1 constituerait ainsi une étape de contrôle qualité du PET dont la bonne organisation serait requise pour les étapes ultérieures de maturation de la grande sous-unité.

La construction du PTC semble également requise avant le clivage en C<sub>2</sub>. Cinq facteurs d'assemblage différents (Nsa2, Nog2, Dbp10, Nug1 et Rsa4) se lient autour du PTC (Barrio-Garcia et al. 2015; Wu et al. 2016) et sont tous nécessaires à l'élimination de l'espaceur ITS2 (Bassler et al. 2001 ; Matsuo et al. 2014 ; Manikas et al. 2016).

Durant ces étapes, de nombreux facteurs d'assemblages vont être dissociés de la grande sous-unité. Ces mécanismes de recyclage sont pour la plupart mal connus. Certains impliquent l'intervention de AAA-ATPases comme Rix7 qui participe au relargage de Nsa1 (Kressler et al. 2008), ou comme Rea1 qui dissocie le complexe Ytm1/Erb1 et le facteur Rsa4 (Bassler et al. 2010). Ces ATPases contactent leurs substrats protéiques par leurs extrémités N-

terminales et utilisent l'énergie de l'ATP pour permettre leur recyclage. La structure à basse résolution de la particule 66S purifiée en utilisant le facteur d'assemblage Rix1 comme appât a été résolue en microscopie électronique en 2009. Les domaines AAA de Rea1 s'associent avec la protubérance centrale en contactant les facteurs Rix1/Ipi1/Ipi3 (Ulbrich et al. 2009).

Depuis le début de ma thèse, de nombreuses études ont révélé d'importants remaniements structuraux au sein de la protubérance centrale (Leidig et al. 2014; Barrio-Gracia et al. 2016 ; Wu et al. 2016) qui ont profondément bouleversé notre compréhension des mécanismes d'assemblage de l'ARNr 5S au sein de la grande sous-unité. J'ai fait le choix délibéré ici de ne pas les décrire durant l'introduction mais de les discuter à la suite des résultats.

## **8. Les étapes nucléaires tardives de la biogenèse de la grande sous-unité du ribosome**

Ces étapes mènent à l'élimination de l'espaceur ITS2, qui conduit à la maturation de l'extrémité 5' de l'ARNr 25S et de l'extrémité 3' de l'ARNr 5.8S. Ces derniers clivages sont accompagnés de remaniement structuraux qui préparent la particule 60S à son export dans le cytoplasme.

À la suite du clivage en C2, les séquences résiduelles de l'ITS2 situées à l'extrémité 5' du pré-ARNr 25.5S sont rapidement éliminées par les exonucléases Rat1 et Rrp17 (Geerlings et al. 2000). La maturation de l'extrémité 3' du pré-ARNr 7S en pré-ARNr 6S est quant à elle assurée par l'exosome, directement recruté au niveau des pré-ribosomes par le facteur d'assemblage Nop53 (Thoms et al. 2015). Les clivages du pré-ARNr 6S en ARNr 5.8S<sub>S</sub> et 5.8S<sub>L</sub> matures seront ensuite réalisés en deux étapes, dans le cytoplasme. La maturation du pré-ARNr 7S en 5.8S requiert la présence de 7 facteurs d'assemblages « tardifs », dont l'AAA ATPase Rea1 et le sous-complexe Rix1/Ipi1/Ipi3 (Galani et al. 2004). Plusieurs études ont suggéré que le recyclage des facteurs Ytm1, Erb1 et Rsa4 par Rea1 était nécessaire pour préparer la maturation du pré-ARNr 7S. Ces dissociations seraient préalables au recrutement du facteur Nop53 et de l'hélicase Mtr4, requis pour l'activité de l'exosome. Chez l'Homme, l'AAA ATPase NvL2 (homologue de Rix7 chez la levure) est également nécessaire au recrutement de l'exosome (Nagahama et al. 2006 ; Hiraishi et al. 2015 ; Yoshikatsu et al. 2015).

Les sous-unités pré-60S sont exportées dans le cytoplasme au travers du complexe du pore nucléaire (NPC). Ce transport doit être rapide, afin d'éviter l'accumulation de pré-ribosomes dans le noyau, et d'assurer à la cellule une capacité de synthèse protéique constante. Chez *S. cerevisiae*, on considère que le passage d'un ribosome à travers un NPC s'effectue en 2 à 3 secondes (Warner 1999). D'autre part, la sous-unité pré-60S (environ 2 MDa chez les Eucaryotes) possède une surface très hydrophile qui doit être dissimulée pour naviguer au milieu

du maillage hydrophobe formé par les extensions FG des nucléoporines. La zone d'interaction avec la petite sous-unité est particulièrement exposée, puisqu'elle est encore dépourvue de protéines ribosomiques qui s'associeront plus tard dans le cytoplasme. Cette surface va être recouverte par différents facteurs d'assemblage (Nmd3, Mex67, Mtr2, Tif6 et Arx1 notamment). Les facteurs Mex67, Mtr2 et Arx1 guident les pré-ribosomes vers le NPC, en favorisant leur interaction avec les extensions FG des nucléoporines (Yao et al. 2007 et 2008). Par ailleurs, de nombreux facteurs d'assemblage sont relargués avant le passage au travers du NPC. C'est notamment le cas de la GTPase Nog2, qui quitte le PTC. La protéine Nmd3 prend alors sa place à l'interface entre les deux sous-unités (Matsuo et al. 2014) et agit comme un adaptateur d'export, en fixant le transporteur Crm1 (Ho et al. 2000 ; Gadal et al. 2001).

## 9. Les étapes cytoplasmiques de la biogenèse de la grande sous-unité du ribosome

Ces étapes regroupent la maturation de l'extrémité 3' de l'ARNr 5.8S, l'association de protéines ribosomiques cytoplasmiques, le recyclage des derniers facteurs d'assemblages encore associés, ainsi que l'inspection et le contrôle qualité de sites fonctionnels.

La maturation du pré-ARNr 6S en ARNr 5.8S<sub>S</sub> et 5.8S<sub>L</sub> est réalisée en deux étapes par les exonucléases Rex1 et Rex2 (Van Hoof et al. 2000) puis par Ng12 (Faber et al. 2002 ; Thomson et Tollervey 2010). Ces étapes marquent la fin de la maturation des pré-ARNr de la grande sous-unité en ARNr matures. Pourtant, ces ARNr sont encore associés à de nombreux facteurs d'assemblage qui facilitent l'association des dernières protéines ribosomiques, et préviennent l'interaction des pré-ribosomes avec la machinerie traductionnelle. En effet, les dernières étapes de maturation de la grande sous-unité concernent essentiellement la zone d'interaction avec la petite sous-unité. La présence tardive des facteurs Tif6 et Nmd3 empêcherait l'association des sous-unités pré-60S immatures avec des sous-unités 40S matures (Gartmann et al. 2010). Par ailleurs, c'est sur cette surface que s'associent les dernières protéines ribosomiques (Rpl10, Rpl24, Rpl29, Rpl40, Rpl42, RpP0 et RpP1). Ces associations sont pour la plupart couplées aux recyclages des derniers facteurs d'assemblage, médiés par quatre NTPases différentes (Drg1, Ssa1, Efl1 et Lsg1).

### **III. Liens entre biogenèse du ribosome et contrôle de la prolifération cellulaire**

Le nombre de ribosomes dans une cellule influe directement sur sa capacité à croître et à proliférer. La biogenèse des ribosomes doit donc être finement régulée et est dépendante des conditions environnementales. Elle est d'ailleurs directement contrôlée par la voie métabolique de réponse aux nutriments mTOR, la voie des MAP-kinases MAPK/ERK, ou la voie MYC qui influent directement sur la transcription des trois ARN polymérases eucaryotes. La synthèse des ribosomes est également sous le contrôle de facteurs suppresseurs de tumeurs et de proto-oncogènes, qui adaptent la production des sous-unités ribosomiques en fonction des conditions environnementales. Le taux de production de ribosome peut, en retour, influencer l'expression de p53. En effet, plusieurs études ont montré que différents composants du ribosome étaient capables de lier l'ubiquitine-ligase MDM2, principal régulateur de p53. La particule 5S, composée de l'ARNr 5S et des protéines ribosomiques Rpl5 et Rpl11, joue un rôle primordial dans la stabilisation de p53 en cas de trouble de la biogenèse des ribosomes. L'équilibre entre sa forme libre et sa forme liée au ribosome conditionne les capacités de prolifération cellulaire.

Durant ma thèse, j'ai étudié le rôle de deux facteurs d'assemblage appelés Rpf2 et Rrs1. Ces protéines assurent deux fonctions distinctes : elles sont requises pour l'association de la particule 5S avec la sous-unité pré-60S, et stimulent la transcription des ARNr par l'ARN polymérase I. Elles sont donc impliquées dans deux événements fondamentaux qui conditionnent les capacités de prolifération cellulaire.

Dans cette partie de l'introduction, je commencerai par détailler différentes voies de signalisation qui régulent la transcription des ARNr en fonction des conditions environnementales. La deuxième partie contient une revue, publiée en 2017 dans le journal médecine/science, qui résume les récentes découvertes associant des défauts de la biogenèse du ribosome au contrôle de la prolifération cellulaire. Enfin, la troisième partie de ce chapitre décrit le rôle prépondérant de l'ARNr 5S et des protéines Rpl5 et Rpl11 dans la régulation du suppresseur de tumeur p53.

#### **1. Régulation de la transcription des ARNr**

La voie mTOR est une voie de signalisation intracellulaire jouant un rôle-clé dans l'homéostasie cellulaire par sa fonction de régulation de l'apoptose, de la croissance et du cycle cellulaire. La protéine-kinase S6K1, effecteur de la voie mTOR, est responsable de l'activation de plusieurs facteurs d'initiation et d'élongation de la traduction. Plusieurs études ont montré que cette kinase était également impliquée dans la régulation de la transcription des ADNr. En effet,

S6K1 est capable d'activer le facteur de transcription TIF1A (Rrn3 chez la levure) nécessaire à l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase I (Mayer et al. 2004). S6K1 participe également à la phosphorylation des protéines UBF qui s'associent spécifiquement avec les ADNr (Hannan et al. 2003). D'autre part, l'activation de la voie mTOR stimule la transcription de l'ARNr 5S par l'ARN polymérase III, en promouvant le recrutement des facteurs de transcription TFIIIB et TFIIIC (Mayer et Grummt, 2006).

La biogenèse des ribosomes est également stimulée par la présence de facteurs de croissance. L'activation de la voie des MAP-kinases MAPK/ERK en réponse à des facteurs mitotiques conduit à la phosphorylation des protéines UBF (Stefanovsky et al. 2001; Stefanovsky et al. 2006) et du facteur de transcription TFIIIB (Grummt 2010). Certains facteurs de croissance activent également la voie MYC qui stimule la transcription par les trois polymérases eucaryotes. MYC favorise le recrutement du facteur d'initiation SL1, nécessaire à la transcription par l'ARN polymérase I et active le facteur TFIIIB, requis pour la transcription par l'ARN polymérase III (Gomez-Roman et al. 2006 ; van Riggelen et al. 2010).

La synthèse des ribosomes est réprimée par certains facteurs suppresseurs de tumeurs comme p53, ou pRb. En réponse à des stress cellulaires, le facteur de transcription p53 induit l'arrêt du cycle cellulaire et la mise en place d'une réponse adaptée, pouvant aller de la réparation du dommage à l'apoptose. La mise en place de cette réponse pro-apoptotique passe par un arrêt de la biogenèse du ribosome. En effet, p53 peut inhiber la transcription par l'ARN polymérase I en liant directement le facteur d'initiation SL1 (Zhai et al. 2000), et réprime l'ARN polymérase III en interagissant avec TFIIIB (Felton-Edkins et al. 2003). Le suppresseur de tumeur pRb, qui contrôle le déroulement du cycle cellulaire en régulant la transition G1/S, peut également réprimer la transcription des ARNr en liant les facteurs d'initiation TFIIIB (Felton-Edkins et al. 2003) et SL1 (Hannan et al, 2000).

## 2. La synthèse des ribosomes, au coeur du contrôle de la prolifération cellulaire (Revue)



### La synthèse des ribosomes, au coeur du contrôle de la prolifération cellulaire

Clément Madru, Nicolas Leulliot et Simon Lebaron

revue publiée dans le journal médecine/science (Juin-juillet 2017)

#### Résumé :

Les ribosomes sont au cœur de l'expression génique. Leur synthèse suit un processus complexe et coûteux en énergie qui fait l'objet de nombreux contrôles afin d'assurer à la cellule un taux de production de ribosomes optimal. Dans cette revue, nous détaillons les récentes découvertes associant des perturbations de l'assemblage des ribosomes au contrôle du cycle cellulaire, notamment par l'intermédiaire du suppresseur de tumeur p53. La particule 5S, un sous-complexe ribosomique, est au cœur de cette régulation qui s'intègre à d'autres signaux contrôlant la progression dans le cycle cellulaire tels que p14ARF, SRSF1 ou PRAS40. Ces données font de l'assemblage des ribosomes une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement de certains cancers.





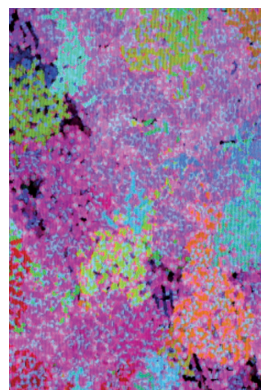
► Les ribosomes sont au cœur de l'expression génique. Leur synthèse suit un processus complexe et coûteux en énergie qui fait l'objet de nombreux contrôles afin d'assurer à la cellule un taux de production de ribosomes optimal. Dans cette revue, nous détaillons les récentes découvertes associant des perturbations de l'assemblage des ribosomes au contrôle du cycle cellulaire, notamment par l'intermédiaire du suppresseur de tumeur p53. La particule 5S, un sous-complexe ribosomique, est au cœur de cette régulation qui s'intègre à d'autres signaux contrôlant la progression dans le cycle cellulaire tels que p14<sup>ARF</sup>, SRSF1 ou PRAS40. Ces données font de l'assemblage des ribosomes une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement de certains cancers. ◀

Les ribosomes assurent la traduction des ARN messagers (ARNm) en protéines. Ils sont ainsi au cœur de l'expression génique. La stabilité structurale et la fidélité du système de traduction expliquent certainement la conservation du ribosome au cours de l'évolution. Son utilisation est commune à l'ensemble des cellules vivantes. Ces macro-particules sont formées de deux sous-unités dénommées chez les eucaryotes, *petite* ou 40S et *grande* ou 60S. Chez l'homme, la petite sous-unité 40S est composée d'un ARN ribosomique (ARNr) appelé 18S, associé à 33 protéines ribosomiques (RPS pour *ribosomal protein of the small subunit*). La grande sous-unité est constituée de 3 ARNr (5S, 5,8S et 28S) et de 47 protéines (RPL pour *ribosomal protein of the large subunit*). Les ARNr sont au centre de l'activité du ribosome, ils définissent sa structure globale et supportent l'activité peptidyl-transférase qui catalyse la formation des liaisons peptidiques. Dans les cellules eucaryotes, la production de ribosomes matures suit un processus complexe et hautement régulé. En effet, la voie de synthèse dédiée à la biogenèse des ribosomes est très élaborée, marquée par une forte

Vignette (Photo © Inserm - Patrick Delapierre).

## La synthèse des ribosomes, au cœur du contrôle de la prolifération cellulaire

Clément Madru<sup>1</sup>, Nicolas Leulliot<sup>1</sup>, Simon Lebaron<sup>1,2</sup>

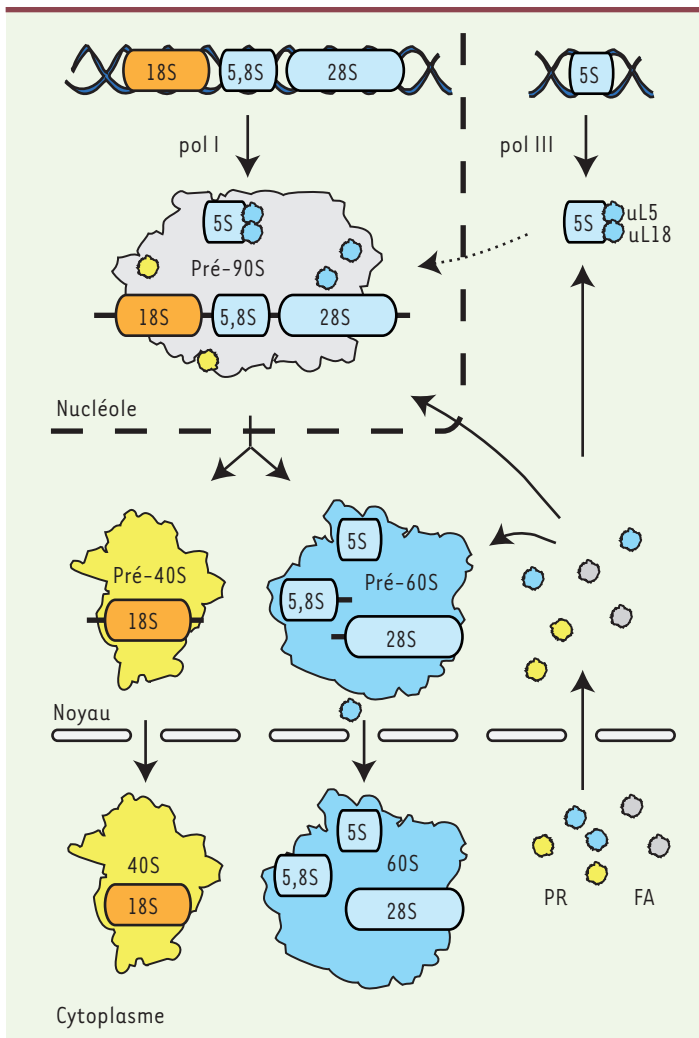


<sup>1</sup> Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques, UMR, CNRS 8015, Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie, Sorbonne Paris Cité, 75006 Paris, France.

<sup>2</sup> Institut national de la santé et de la recherche médicale, Paris, France.

[simon.lebaron@inserm.fr](mailto:simon.lebaron@inserm.fr)

production et par conséquent excessivement coûteuse en énergie [1]. Ce processus fait donc l'objet de nombreux contrôles et régulations. La synthèse des ribosomes commence dans le nucléole, un compartiment nucléaire formé autour des unités répétées d'ADN ribosomique (NOR, *nucleolar organisation regions*) sur la chromatine. C'est dans ce nucléole que les ARNr 18S, 28S et 5,8S sont co-transcrits par l'ARN polymérase I (Pol I) sous la forme d'un long transcrit primaire (47S) qui contient, outre les séquences des ARNr matures, des séquences additionnelles dites espaceurs internes (ITS) et externes (ETS). Ces pré-ARNr sont immédiatement reconnus par deux classes de protéines pour former des particules pré-ribosomiques 90S : les protéines ribosomiques et les facteurs d'assemblage requis pour la maturation des pré-ribosomes mais absents des sous-unités matures. C'est au sein de ces particules ribonucléoprotéiques (RNP) que les pré-ARNr subissent de nombreuses étapes de maturation telles que des modifications chimiques ou l'élimination des séquences additionnelles par digestions endo- et exo-nucléolytiques [2, 3]. Ces modifications du composant ARN s'accompagnent de réorganisations structurales et de changements dans la composition protéique des différentes particules pré-ribosomiques. À la suite d'une coupure spécifique dans l'espaceur interne 1 (ITS1), ces pré-ribosomes précoces vont être scindés en deux, formant les particules pré-60S et pré-40S. Les particules pré-40S et pré-60S suivent ensuite des voies de maturation distinctes, transitant par le nucléoplasme avant d'être exportées dans le cytoplasme (Figure 1). Il a été montré récemment chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* que, durant les dernières étapes de maturation de la petite sous-unité ribosomique dans le cytoplasme, la particule pré-40S pouvait s'associer à une grande sous-unité ribosomique mature. Cette étape servirait de contrôle qualité, testant la



**Figure 1. La synthèse des ribosomes chez l'homme.** La biogenèse du ribosome débute dans le nucléole avec la transcription du pré-ARN 47S par l'ARN polymérase I. Ce long transcrite primaire qui contient les séquences des ARNr 5,8S, 18S et 28S s'associe de manière co-transcriptionnelle avec plusieurs protéines ribosomiques (PR) et différents facteurs d'assemblage (FA) pour former le pré-ribosome 90S. L'ARNr 5S suit une voie de synthèse et d'assemblage totalement différente, puisqu'il est d'abord transcrit par l'ARN polymérase III en périphérie du nucléole, reconnu par deux protéines ribosomiques, uL18 et uL5, et s'associe ensuite aux particules pré-ribosomiques en cours d'assemblage. Ces particules vont subir différentes étapes de clivages et de maturations dans le nucléoplasme, puis le cytoplasme, qui aboutiront à la formation de sous-unités 40S et 60S matures, capables d'assurer la traduction des ARNm.

capacité des sous-unités pré-40S à initier la traduction avant qu'elles ne soient dirigées vers les ultimes étapes de maturation [4, 5].

L'ARNr 5S est transcrit indépendamment par l'ARN polymérase III. Il est rapidement reconnu par deux protéines ribosomiques (RPL5/uL18 and RPL11/uL5), formant ce que l'on appelle la particule 5S. Celle-ci est ensuite intégrée aux particules pré-ribosomiques pré-60S précoces.

De nombreuses études menées durant les vingt dernières années ont permis d'identifier près de 200 facteurs intervenant dans la biogenèse des ribosomes [2, 3]. Cependant, les fonctions moléculaires précises de la majorité d'entre eux ne sont toujours pas connues. Outre la caractérisation structurale et fonctionnelle de ces différents facteurs d'assemblage dans la biogenèse du ribosome, beaucoup d'études récentes ont été menées pour étudier les liens entre la synthèse des ribosomes et le contrôle de la prolifération cellulaire.

### Liens entre synthèse des ribosomes et cancers

De par son coût énergétique et sa complexité, le processus de synthèse des ribosomes doit être finement régulé et doit rapidement s'adapter à l'environnement cellulaire. Ainsi, les cellules qui se multiplient ont un besoin accru en protéines dont la production ne peut être assurée que par un grand nombre de ribosomes. La régulation de la production des ribosomes a été observée pour la première fois chez la levure par la mise en évidence du régulon *Ribi*<sup>1</sup>, constitué de plus de 200 gènes contrôlant la synthèse des ribosomes en réponse à des signaux environnementaux ou génétiques [6-8]. La synthèse des ribosomes est ainsi directement contrôlée par la voie métabolique de réponse aux nutriments mTOR (*target of rapamycin*) mais également par le facteur de transcription Runx1 (*runt-related transcription factor 1*) qui contrôle, entre autre, l'hématopoïèse [9, 10]. Le facteur de transcription c-Myc, un proto-oncogène qui stimule la prolifération cellulaire et dont l'expression est altérée dans de nombreux cancers, a également été impliqué comme régulateur de la biogenèse des ribosomes. Il contrôle l'expression de plusieurs gènes, notamment ceux du régulon *Ribi* [11]. Ainsi, la surexpression de c-Myc stimule la synthèse des ribosomes en agissant directement sur la transcription des pré-ARNr (via Pol I et Pol III) et sur l'expression de facteurs d'assemblage et de protéines ribosomiques. La prolifération cellulaire et la synthèse des ribosomes sont donc deux processus étroitement liés.

La dérégulation de la synthèse des ribosomes peut être à l'origine d'altérations du cycle cellulaire et de la croissance cellulaire, aboutissant à une prolifération incontrôlée propice au développement de cancers. La dérégulation de la synthèse des ribosomes provoque également un phénomène appelé *stress nucléolaire* qui conduit le plus souvent à une modification de la taille et du nombre de nucléoles. L'observation des nucléoles

<sup>1</sup> Ensemble de gènes impliqués dans la régulation d'une réponse à l'environnement.

est d'ailleurs utilisée comme indicateur de sévérité clinique ou de réponse à la chimiothérapie [12].

Différentes équipes ont observé une surexpression de plusieurs facteurs impliqués dans la synthèse des ribosomes en corrélation avec la sévérité de certains cancers. Parmi ces facteurs, on retrouve la protéine GPATCH2 (*G-patch domain-containing protein 2*) qui régule l'activité de l'hélicase Prp43 (*pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase*), le facteur d'assemblage hCINAP (*human coilin-interacting nuclear ATPase protein*), l'endonucléase Nob1 (*NIN1/PSMD8 binding protein 1 homolog*) et la kinase RIOK2 (*RIO kinase 2*) [13-15]. L'ensemble de ces observations ont engendré différentes hypothèses sur l'existence de liens directs entre synthèse des ribosomes et progression tumorale [16]. Mais ce n'est que depuis une dizaine d'année que les composants impliqués dans ces connections ont pu être mis en évidence.

### Contrôle de la stabilité de p53 par les protéines ribosomiques

La protéine p53 est un facteur de transcription qui promeut l'arrêt du cycle cellulaire, pouvant engager la cellule dans un programme apoptotique en réponse à des lésions de l'ADN ou à des stress oncogéniques. Cette protéine est un acteur majeur de la réponse anti-tumorale [57] (→). Ce supresseur de tumeur, aussi appelé « gardien du génome », est le facteur pro-apoptotique le plus fréquemment muté dans les lignées cancéreuses : 50 % des cancers présentent une ou plusieurs mutation(s)/délétion(s) au sein de ce gène. Dans la majorité des autres cancers, c'est sa régulation qui est affectée. Les premiers liens entre la synthèse des ribosomes et la régulation de p53 ont été établis en 2001 dans une étude montrant que la délétion de la protéine Bop1 (*block of proliferation 1*), requise pour les premières étapes de maturation des ribosomes, provoquait un arrêt de croissance induit par p53 [17]. En 2004, une autre étude réalisée chez le poisson zèbre montrait que plusieurs mutations de gènes codant des protéines ribosomiques provoquaient l'apparition de cancers [18].

Pourtant, aucune interaction directe n'avait jusqu'alors été montrée entre des protéines ribosomiques et p53. C'est à partir de l'étude de son principal régulateur, Mdm2 (*murine double minute 2*), que les premières bases moléculaires de la régulation de p53 par des protéines ribosomiques ont été découvertes. Mdm2 est une ubiquitine-ligase qui cible spécifiquement p53 et permet sa dégradation après adressage au protéasome. Lors d'un stress oncogénique, plusieurs signaux inhibent cette interaction, ce qui a pour effet de stabiliser p53.

De nombreuses études ont mis en évidence l'existence d'interactions entre Mdm2 et des protéines ribosomiques en réponse à un stress nucléolaire [19]. Parmi celles-ci, on retrouve uS3 et eS25, appartenant à la petite sous-unité, et uL5 et uL18, composants de la grande sous-unité [20-23]. D'autres protéines ont également été impliquées mais leur interaction avec Mdm2 reste controversée [24]. Les protéines ribosomiques interagissent avec Mdm2 au niveau de son domaine acide et/ou de son domaine à doigt de zinc, dans lesquels des mutations sont retrouvées dans plusieurs cancers [25].

La formation des deux sous-unités ribosomiques étant indépendantes, il n'est pas surprenant de retrouver des protéines appartenant à chacune des sous-unités impliquées dans le processus de régulation de p53. Ce mécanisme pourrait ainsi permettre à la cellule de signaler rapidement des défauts d'assemblage des deux sous-unités, mais cette hypothèse fait actuellement débat. En effet, il semblerait que seule la déplétion de certaines protéines de la grande sous-unité soit capable d'induire significativement la stabilisation de p53 (dont le taux est alors 5 fois supérieur au taux normal) [26]. Néanmoins, il est clair qu'en cas de stress nucléolaire, qui peut conduire à la production de ribosomes déficients, certaines protéines ribosomiques, non encore assemblées, sont capables d'induire la stabilisation de p53 et de promouvoir un arrêt du cycle cellulaire, voire une apoptose de la cellule.

### Le rôle particulier de la particule 5S

Parmi les différentes protéines ribosomiques interagissant avec Mdm2, les protéines uL5 et uL18 semblent être au cœur de la régulation de p53. Ces deux protéines s'associent en dehors du ribosome avec l'ARN 5S pour former la particule 5S. L'intégration de cette particule au sein des ribosomes pré-60S est une étape cruciale qui intervient très précocement dans l'assemblage de la grande sous-unité. En son absence, la maturation de la grande sous-unité est stoppée dans le noyau, ce qui conduit rapidement à un déficit en sous-unités 60S fonctionnelles [27]. Toute altération de la synthèse des ribosomes a en fait pour effet de réduire la production de particules pré-60S, augmentant ainsi la quantité de particules 5S libres dans le nucléoplasme.

La découverte, en 1994, d'un complexe extra-ribosomique formé de l'assemblage de Mdm2, uL18 et de l'ARNr 5S, a suggéré un rôle de la particule 5S dans la régulation de p53 [22]. uL18, uL5, et l'ARNr 5S ont depuis été identifiés comme des partenaires de Mdm2, capables d'inhiber son activité ubiquitine-ligase et ainsi de stabiliser p53. La particule 5S joue donc un rôle particulier dans le contrôle de p53. En l'absence d'un de ces composants, l'inhibition de synthèse des ribosomes ne conduit plus à la stabilisation de p53 [28, 29]. L'examen de l'impact de la déplétion des différentes protéines ribosomiques sur l'intégrité du nucléole et la stabilisation de p53 a montré que l'effet le plus important est observé en l'absence de la particule 5S [26]. Récemment, la structure de la protéine uL5 associée aux domaines acide et doigt de zinc de Mdm2 a pu être résolue par cristallographie aux rayons X [23]. Cette analyse structurale révèle que Mdm2 interagit avec uL5 au niveau du site de liaison de uL5 à l'ARNr 28S,

(→) Voir la Synthèse de O. Albagli, m/s n° 10, octobre 2015, page 869

montrant ainsi que l'interaction entre les deux protéines ne peut se produire qu'en absence de l'ARNr 28S et donc vraisemblablement en dehors du ribosome, ou *via* un changement de conformation de la particule 5S au sein du ribosome.

La particule 5S est au cœur de la coordination entre la synthèse des ribosomes et la prolifération cellulaire. Il est intéressant de noter que l'ARN 5S est transcrit par l'ARN polymérase III, indépendamment des autres ARNr qui sont transcrits par l'ARN polymérase I. Ainsi, l'inhibition de la transcription dépendant de la polymérase I par différents signaux, ne s'accompagne pas inévitablement de l'inhibition de la transcription par la polymérase III, créant ainsi un déséquilibre entre la quantité de particules 5S libres et celle associée aux ribosomes. La particule 5S pourrait ainsi véritablement jouer le rôle de détecteur fonctionnel de la biogenèse du ribosome, indiquant à la cellule quel état adopter pour la prolifération.

### La double régulation de la synthèse des ribosomes et de la stabilité de p53 en réponse à des stress oncogéniques

La synthèse des ribosomes est régulée par de nombreux signaux cellulaires. Parmi les différents acteurs de cette régulation, on retrouve certains facteurs pro-oncogéniques. La protéine p14<sup>ARF</sup> est un suppresseur de tumeur provenant de l'épissage alternatif du locus *Ink4a/Arf* (*ADP-ribosylation factor* ou Cdkn2A [*cyclin dependent kinase inhibitor 2A*]), deuxième locus le plus fréquemment muté après celui de *P53* dans les cancers humains [30]. La protéine p14<sup>ARF</sup> s'accumule dans les cellules à la suite de signaux oncogéniques comme ceux produits par c-Myc et Ras [30]. Dans les cellules sauvages, p14<sup>ARF</sup>, en s'associant directement avec Mdm2, est à l'origine de la stabilisation de p53 [31]. Outre ce rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire par l'intermédiaire de p53, p14<sup>ARF</sup> régule aussi directement la synthèse des ribosomes [32, 33] (→). Deux équipes ont en effet montré que la particule 5S était nécessaire à la stabilisation de p53 par p14<sup>ARF</sup> [28, 34], p14<sup>ARF</sup> pouvant s'associer avec Mdm2 et avec la particule 5S. Il est donc possible qu'à la suite de son activation par des signaux oncogéniques, p14<sup>ARF</sup> altère la prolifération cellulaire à deux niveaux : en modifiant la synthèse des ribosomes afin de réduire la production des protéines et en formant un complexe avec la particule 5S et Mdm2 pour activer p53. Le facteur d'épissage *Srsf1* (*serine and arginine-rich splicing factor 1*) est un proto-oncogène impliqué dans l'épissage alternatif de différents oncogènes. En réponse à sa surexpression induite par les signaux oncogéniques, la cellule inhibe la dégradation de p53 évitant la mise en place d'un programme oncogénique [35]. Cette stabilisation de p53 nécessite l'association de *Srsf1* avec la protéine ribosomique uL18 [35] démontrant que *Srsf1* est également un facteur qui relie p53 et la synthèse des ribosomes (Figure 2).

À l'inverse, la protéine PRAS40 (*proline-rich Akt substrate of 40 kDa*) est un inhibiteur de la voie mTOR qui, à la différence des autres inhibiteurs de cette voie, participe à la prolifération cellulaire et la tumorigenèse. Il a récemment été démontré qu'une fois phosphorylée par mTOR et Akt, la protéine PRAS40 interagit avec uL5 dans le noyau, ce qui a pour effet

d'inhiber son interaction avec Mdm2 et de promouvoir ainsi la dégradation de p53 [36].

### Le cas particulier des ribosomopathies

Les ribosomopathies regroupent différentes pathologies associées à des défauts d'assemblage des ribosomes [37]. Ces pathologies, bien que présentant toutes des défauts de synthèse des ribosomes, varient dans leurs symptômes [38]. L'une de leurs particularités est le rôle joué par p53. Dans les différents modèles cellulaires et animaux de ces maladies, p53 s'accumule dans les cellules en réponse aux défauts de synthèse des ribosomes. Réciproquement, l'inactivation de p53 peut compenser certains symptômes. Ainsi, dans les modèles de cellules de moelle osseuse CD34<sup>+</sup> mimant l'anémie de Diamond-Blackfan<sup>2</sup> (DBA), l'inactivation de p53 compense les défauts d'érythropoïèse induits par la délétion de la protéine ribosomale eS19 [39]. De même, on observe une absence d'anomalies cranio-faciales associées au syndrome de Treacher-Collins<sup>3</sup> (TCS, une autre ribosomopathie) dans des modèles murins dans lesquels p53 est inactivée [40].

Bien qu'associées à une stabilisation de p53, ces pathologies prédisposent les patients au développement de cancers. Il est possible que l'accumulation de p53 en réponse à ces défauts de synthèse des ribosomes exerce une pression sélective sur les cellules de ces patients. Les clones dans lesquels la régulation, l'activité ou les effecteurs de p53 sont altérés seraient ainsi favorisés.

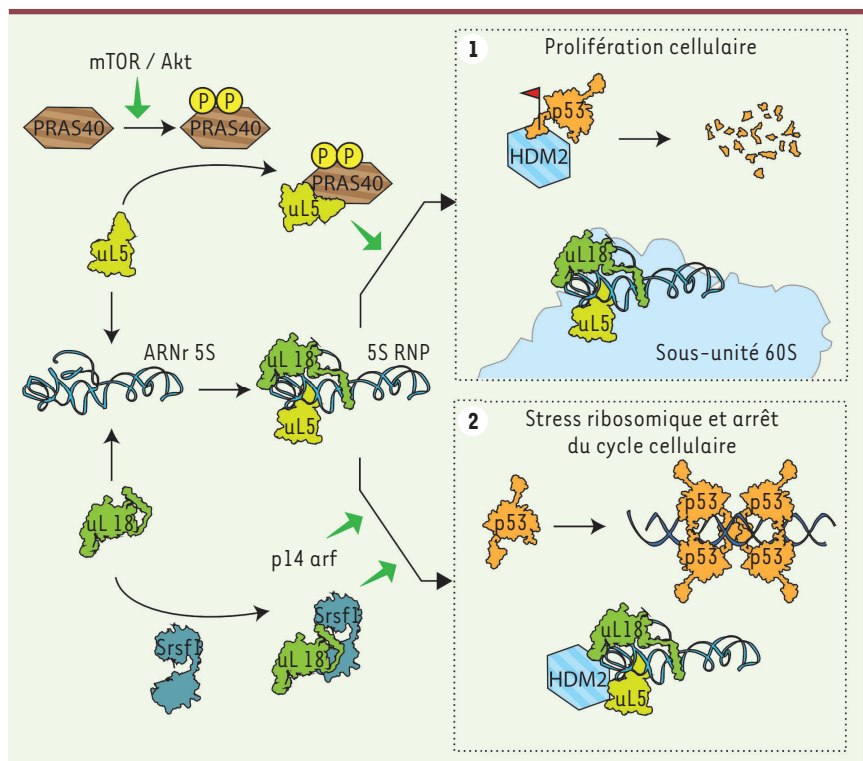
### Liens entre prolifération cellulaire et synthèse des ribosomes p53 indépendants

Le processus impliquant Mdm2, les protéines ribosomiques et p53 est fondamental pour les liens existant entre prolifération cellulaire et synthèse des ribosomes. Cependant, de tels liens ont pu être observés au sein d'organismes n'ayant pas d'équivalent de p53, ou au sein de modèles cellulaires dans lesquelles l'expression ou la fonction de p53 sont altérées.

Chez l'homme, la déplétion de Pescadillo (PES), une protéine impliquée dans les premières étapes de maturation des ribosomes, conduit à une perte de ribosomes et perturbe le cycle cellulaire [41]. Cet effet est néanmoins maintenu dans des cellules

<sup>2</sup> L'anémie de Diamond-Blackfan est une érythroblastopénie congénitale qui se présente comme une anémie arégénérative le plus souvent macrocytaire.

<sup>3</sup> Le syndrome de Treacher-Collins est une anomalie congénitale du développement crânio-facial, caractérisée par une dysplasie oto-mandibulaire bilatérale et symétrique sans anomalies des extrémités. Il est dû en particulier à des mutations du gène codant des sous-unités des ARN polymérases I et III.



**Figure 2. La particule 5S régule la prolifération cellulaire.** Dans le nucléoplasme, l'ARNr 5S s'associe avec les deux protéines ribosomiques uL18 et uL5 pour former la particule 5S, composant essentiel de la grande sous-unité ribosomique. (1) La phase de prolifération cellulaire est caractérisée par un très grand nombre de ribosomes, nécessaires à la production des protéines. Dans ce contexte, le taux de synthèse des ribosomes est élevé et la particule 5S s'intègre aux nombreuses particules pré-ribosomiques produites. D'autre part, HDM2 (homologue chez l'homme de mdm2 [*murine double minute 2*]) catalyse l'ubiquitination de p53, conduisant à sa dégradation, et assure ainsi le maintien de la phase de prolifération cellulaire. (2) En cas de stress de la biogenèse des ribosomes, la particule 5S s'accumule sous forme libre, en dehors du ribosome. Cette particule 5S peut s'associer avec HDM2, et inhiber son activité ubiquitine ligase. p53 est alors stabilisée, et

peut s'associer sous forme de tétramères pour remplir son rôle de facteur de transcription promouvant l'expression de différents gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. (3) L'équilibre entre ces deux voies est assuré par des protéines anti-apoptotiques comme la protéine PRAS40 (*proline-rich Akt substrate of 40 kDa*), qui, sous le contrôle de la voie mTOR (*mammalian target of rapamycin*)/Akt (protéine kinase B), peut interagir avec uL5 et ainsi inhiber son association avec HDM2. Par ailleurs, certaines protéines pro-apoptotiques, comme le facteur d'épissage Srsf1 en s'associant avec uL18, ou la protéine p14<sup>ARF</sup>, favorisent la stabilisation de p53. Les protéines dont les structures ne sont pas entièrement connues sont représentées en hachuré.

exprimant une protéine p53 mutée. Il semble donc que l'action de Pescadillo sur la croissance cellulaire ne repose pas exclusivement sur p53 [42]. En fait, l'effet de Pescadillo dépendrait de la protéine du rétinoblastome, pRB [42]. pRB est un suppresseur de tumeur dont l'expression est affectée dans plusieurs cancers. Il agit en séquestrant le facteur de transcription E2F-1 (*E2 factor transcription factor 1*), bloquant ainsi le cycle cellulaire [43]. Phosphorylée, pRB ne peut plus interagir avec E2F-1, ce qui permet la progression dans le cycle cellulaire. PPAN (*Peter Pan homolog*), une protéine partenaire de la protéine Pescadillo, est impliquée dans l'assemblage des ribosomes. Lors de perturbations de la synthèse des ribosomes, PPAN se relocalise dans la mitochondrie et induit une apoptose de la cellule indépendamment de p53 [44].

L'une des premières observations pointant un mécanisme reliant défauts de synthèse des ribosomes et prolifération cellulaire, indépendant de p53, a été obtenue chez la levure *S. cerevisiae*. Dans cet organisme modèle, il n'existe pas d'homologue identifié de la protéine p53. Des défauts de synthèse des ribosomes affectent pourtant la prolifération cellulaire avant même que le niveau de traduction des protéines ne soit affecté [45]. Whi5, l'équivalent fonctionnel du suppresseur de tumeur pRB chez la levure est impliqué dans cette régulation [45].

Certaines protéines ribosomiques peuvent également directement influencer le cycle cellulaire, indépendamment de la voie Mdm2-RP-P53. Ainsi, l'interaction de uL5 avec Mdm2 inhibe la protection du facteur E2F-1 par Mdm2, E2F-1 étant lui-même contrôlé par pRB [46]. uL5 est capable aussi d'interagir avec le régulateur c-Myc. Il inhibe son activité et peut se lier à son ARN messager, ce qui conduit à sa dégradation, ceci même en l'absence de p53 [47]. L'importance des protéines ribosomiques uL3 et eL27 dans la régulation du cycle cellulaire en absence de p53 a également été montrée [48, 49].

Les liens entre la synthèse des ribosomes et la prolifération cellulaire indépendants de p53, ont été étudiés par une équipe qui a examiné l'effet de la déplétion des protéines uL5 et uL18 sur la progression du cycle cellulaire. Dans ces modèles, p53 ne s'accumule pas dans les cellules en réponse aux défauts de synthèse des ribosomes. La déplétion de uL5 et de uL18 conduit dans ce cas à une baisse du taux de traduction ne provoquant pas d'arrêt du cycle mais une progression plus lente vers celui-ci, limitant ainsi la prolifération cellulaire [50].



other cell cycle controls such as p14<sup>ARF</sup>, SRSF1 or PRAS40 pathways. These data place ribosome synthesis at the heart of cell proliferation and offer new therapeutic strategies against cancer. ♦

## LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

## RÉFÉRENCES

- Warner JR. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* 1999 ; 24 : 437-40.
- Henras AK, Soudet J, Gérard M, et al. The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2008 ; 65 : 2334-59.
- Henras AK, Plisson-Chastang C, O'Donohue M-F, et al. An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2015 ; 6 : 225-42.
- Lebaron S, Schneider C, Nues RW van, et al. Proofreading of pre-40S ribosome maturation by a translation initiation factor and 60S subunits. *Nat Struct Mol Biol* 2012 ; 19 : 744-53.
- Strunk BS, Novak MN, Young CL, et al. A translation-like cycle is a quality control checkpoint for maturing 40S ribosome subunits. *Cell* 2012 ; 150 : 111-21.
- Wade C, Shea KA, Jensen RV, et al. EBP2 is a member of the yeast RRB regulon, a transcriptionally coregulated set of genes that are required for ribosome and rRNA biosynthesis. *Mol Cell Biol* 2001 ; 21 : 8638-50.
- Wade CH, Umbarger MA, McAlear MA. The budding yeast rRNA and ribosome biosynthesis (RRB) regulon contains over 200 genes. *Yeast Chichester Engl* 2006 ; 23 : 293-306.
- Jorgensen P, Rupes I, Sharom JR, et al. A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes Dev* 2004 ; 18 : 2491-505.
- Cai X, Gao L, Teng L, et al. Runx1 Deficiency Decreases Ribosome Biogenesis and Confers Stress Resistance to Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cell Stem Cell* 2015 ; 17 : 165-77.
- Iadevaia V, Liu R, Proud CG. mTORC1 signaling controls multiple steps in ribosome biogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2014 ; 36 : 113-20.
- Riggelen J van, Yetil A, Felsner DW. MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nat Rev Cancer* 2010 ; 10 : 301-9.
- Montanaro L, Treré D, Derenzini M. Nucleolus, Ribosomes, and Cancer. *Am J Pathol* 2008 ; 173 : 301-10.
- Lin M-L, Fukukawa C, Park J-H, et al. Involvement of G-patch domain containing 2 overexpression in breast carcinogenesis. *Cancer Sci* 2009 ; 100 : 1443-50.
- Bai D, Zhang J, Li T, et al. The ATPase hCINAP regulates 18S rRNA processing and is essential for embryogenesis and tumour growth. *Nat Commun* 2016 ; 7 : 12310.
- Liu K, Chen H-L, Wang S, et al. High Expression of R10K2 and NOB1 Predict Human Non-small Cell Lung Cancer Outcomes. *Sci Rep* 2016 ; 6 : 28666.
- Ruggero D, Grisendi S, Piazza F, et al. Dyskeratosis congenita and cancer in mice deficient in ribosomal RNA modification. *Science* 2003 ; 299 : 259-62.
- Pestov DG, Strezoska Z, Lau LF. Evidence of p53-dependent cross-talk between ribosome biogenesis and the cell cycle: effects of nucleolar protein Bop1 on G(1)/S transition. *Mol Cell Biol* 2001 ; 21 : 4246-55.
- Amsterdam A, Sadler KC, Lai K, et al. Many ribosomal protein genes are cancer genes in zebrafish. *PLoS Biol* 2004 ; 2 : E139.
- Zhou X, Liao WJ, Liao JM, et al. Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome. *J Mol Cell Biol* 2015 ; 7 : 92-104.
- Yadavilli S, Mayo LD, Higgins M, et al. Ribosomal protein S5: A multi-functional protein that interacts with both p53 and MDM2 through its KH domain. *DNA Repair* 2009 ; 8 : 1215-24.
- Zhang X, Wang W, Wang H, et al. Identification of ribosomal protein S25 (RPS25)-MDM2-p53 regulatory feedback loop. *Oncogene* 2013 ; 32 : 2782-91.
- Marechal V, Elenbaas B, Piette J, et al. The ribosomal L5 protein is associated with mdm-2 and mdm-2-p53 complexes. *Mol Cell Biol* 1994 ; 14 : 7414-20.
- Zheng J, Lang Y, Zhang Q, et al. Structure of human MDM2 complexed with RPL11 reveals the molecular basis of p53 activation. *Genes Dev* 2015 ; 29 : 1524-34.
- Fumagalli S, Ivanenkov VV, Teng T, et al. Supra-induction of p53 by disruption of 40S and 60S ribosome biogenesis leads to the activation of a novel G2/M checkpoint. *Genes Dev* 2012 ; 26 : 1028-40.
- Lindström MS, Jin A, Deisenroth C, et al. Cancer-associated mutations in the MDM2 zinc finger domain disrupt ribosomal protein interaction and attenuate MDM2-induced p53 degradation. *Mol Cell Biol* 2007 ; 27 : 1056-68.
- Nicolas E, Parisot P, Pinto-Monteiro C, et al. Involvement of human ribosomal proteins in nucleolar structure and p53-dependent nucleolar stress. *Nat Commun* 2016 ; 7 : 11390.
- Zhang J, Harnpicharnchai P, Jakovljevic J, et al. Assembly factors Rpf2 and Rrs1 recruit 5S rRNA and ribosomal proteins rpl5 and rpl11 into nascent ribosomes. *Genes Dev* 2007 ; 21 : 2580-92.
- Sloan KE, Bohnsack MT, Watkins NJ. The 5S RNP couples p53 homeostasis to ribosome biogenesis and nucleolar stress. *Cell Rep* 2013 ; 5 : 237-47.
- Donati G, Peddigari S, Mercer CA, et al. 5S ribosomal RNA is an essential component of a nascent ribosomal precursor complex that regulates the Hdm2-p53 checkpoint. *Cell Rep* 2013 ; 4 : 87-98.
- Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 ; 2 : 731-37.
- Weber JD, Kuo ML, Bothner B, et al. Cooperative signals governing ARF-mdm2 interaction and nucleolar localization of the complex. *Mol Cell Biol* 2000 ; 20 : 2517-28.
- Sugimoto M, Kuo M-L, Roussel MF, et al. Nucleolar Arf tumor suppressor inhibits ribosomal RNA processing. *Mol Cell* 2003 ; 11 : 415-24.
- Ayrault O, Andrique L, Larsen CJ, et al. La régulation négative de la biogenèse des ribosomes. *Med Sci (Paris)* 2006 ; 22 : 519-24.
- Dai MS, Challagundla KB, Sun XX, et al. Physical and functional interaction between ribosomal protein L11 and the tumor suppressor ARF. *J Biol Chem* 2012 ; 287 : 17120-9.
- Fregoso OI, Das S, Akerman M, et al. Splicing-factor oncoprotein SRSF1 stabilizes p53 via RPL5 and induces cellular senescence. *Mol Cell* 2013 ; 50 : 56-66.
- Havel JJ, Li Z, Cheng D, et al. Nuclear PRAS40 couples the Akt/mTORC1 signaling axis to the RPL11-HDM2-p53 nucleolar stress response pathway. *Oncogene* 2015 ; 34 : 1487-98.
- Narla A, Ebert BL. Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood* 2010 ; 115 : 3196-205.
- Daniilova N, Gazda HT. Ribosomopathies: how a common root can cause a tree of pathologies. *Dis Model Mech* 2015 ; 8 : 1013-26.
- Dutt S, Narla A, Lin K, et al. Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood* 2011 ; 117 : 2567-76.
- Jones NC, Lynn ML, Gaudenz K, et al. Prevention of the neurocristopathy Treacher Collins syndrome through inhibition of p53 function. *Nat Med* 2008 ; 14 : 125-33.
- Wu CL, Zukerberg LR, Ngwu C, et al. In vivo association of E2F and DP family proteins. *Mol Cell Biol* 1995 ; 15 : 2536-46.
- Grimm T, Hölzel M, Rohrmoser M, et al. Dominant-negative Pes1 mutants inhibit ribosomal RNA processing and cell proliferation via incorporation into the PeBoW-complex. *Nucleic Acids Res* 2006 ; 34 : 3030-43.
- Li J, Yu L, Zhang H, et al. Down-regulation of pescadillo inhibits proliferation and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cancer Sci* 2009 ; 100 : 2255-60.
- Pfister AS, Keil M, Köhl M. The Wnt target protein Peter Pan defines a novel p53-independent nucleolar stress-response pathway. *J Biol Chem* 2015 ; 290 : 10905-18.
- Bernstein KA, Bleichert F, Bean JM, et al. Ribosome biogenesis is sensed at the Start cell cycle checkpoint. *Mol. Biol. Cell* 2007 ; 18 : 953-64.
- Donati G, Brighenti E, Vici M, et al. Selective inhibition of rRNA transcription downregulates E2F-1: a new p53-independent mechanism linking cell growth to cell proliferation. *J Cell Sci* 2011 ; 124 : 3017-28.
- Dai M-S, Arnold H, Sun X-X, et al. Inhibition of c-Myc activity by ribosomal protein L11. *EMBO J* 2007 ; 26 : 3332-45.
- Pagliara V, Saide A, Mitidieri E, et al. 5-FU targets rpl3 to induce mitochondrial apoptosis via cystathionine-β-synthase in colon cancer cells lacking p53. *Oncotarget* Aug 2 ; 7(31):50333-50348.
- Alkhatibi HA, McLornan DP, Kulasekararaj AG, et al. RPL27A is a target of miR-595 and may contribute to the myelodysplastic phenotype through ribosomal dysgenesis. *Oncotarget* 2016 ; 7 : 47875-90.
- Teng T, Mercer CA, Hexley P, et al. Loss of tumor suppressor RPL5/RPL11 does not induce cell cycle arrest but impedes proliferation due to reduced ribosome content and translation capacity. *Mol Cell Biol* 2013 ; 33 : 4660-71.
- Devlin JR, Hannan KM, Hein N, et al. Combination therapy targeting ribosome biogenesis and mRNA translation synergistically extends survival in MYC-driven lymphoma. *Cancer Discov* 2016 ; 6 : 59-70.
- Poortinga G, Quinn LM, Hannan RD. Targeting RNA polymerase I to treat MYC-driven cancer. *Oncogene* 2015 ; 34 : 403-12.
- Leidig C, Thoms M, Holdermann I, et al. 60S ribosome biogenesis requires rotation of the 5S ribonucleoprotein particle. *Nat Commun* 2014 ; 5 : 3491.
- Kornprobst M, Turk M, Kellner N, et al. Architecture of the 90S pre-ribosome: A structural view on the birth of the eukaryotic ribosome. *Cell* 2016 ; 166 : 380-93.
- Loc'h J, Blaud M, Réty S, et al. RNA Mimicry by the Fap7 adenylate kinase in ribosome biogenesis. *PLoS Biol* 2014 ; 12 : e1001860.
- Madru C, Lebaron S, Blaud M, et al. Chaperoning 5S RNA assembly. *Genes Dev* 2015 ; 29 : 1432-46.
- Albagli O. Protéger et sévir : p53, métabolisme et suppression tumorale. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 869-80.

TIRÉS À PART

S. Lebaron





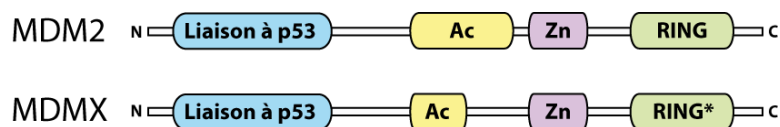
### 3. Rôle de la particule 5S dans la régulation de p53

#### a. Le couple p53-MDM2

p53 est un médiateur essentiel des mécanismes de réponse aux différents stress cellulaires. Ces derniers peuvent être de natures très différentes : hypoxie, stress oxydant ou encore dommage à l'ADN. L'activation de p53 conditionne le destin cellulaire et peut conduire schématiquement à deux réponses différentes : l'arrêt transitoire du cycle cellulaire et à la réparation des dommages, ou bien, lorsque les dégâts sont trop importants, l'arrêt irréversible de la division cellulaire pouvant mener à l'apoptose. Ce facteur de transcription régule l'expression de plusieurs centaines de gènes. Il est par exemple capable d'activer, mais également de réprimer, la transcription de nombreux gènes clés du métabolisme, modulant la glycolyse, la voie des pentoses phosphates, le métabolisme des lipides, ou même la synthèse de certains acides aminés.

Chez les métazoaires, p53 est maintenu à un niveau basal par son principal régulateur MDM2 (HDM2 chez l'Homme). MDM2 est une E3 ubiquitine ligase, responsable de l'ubiquitination de p53 qui constitue un signal d'adressage au protéasome (Honda et Yasuda, 1999). La voie p53-MDM2 est régulée par de nombreuses modifications post-traductionnelles. La phosphorylation du domaine de transactivation de p53 (résidus 1-63 chez l'Homme) conduit par exemple à une inhibition de l'interaction p53/HDM2 (Appella et al. 2001). La phosphorylation de MDM2 par des protéines de la voie ATM, activée en cas de stress génotoxique, conduit à son inactivation (De toledo et al. 2000). A l'inverse, sa phosphorylation par des protéines de la voie Akt favorise sa translocation du cytoplasme au nucléoplasme, où MDM2 peut lier p53 (Ogawara et al. 2002). Par ailleurs, p53 stimule sa propre dégradation en activant la transcription du gène codant pour MDM2 (Barak et al. 1993, Wu et al. 1993).

MDM2 est composée d'un domaine de liaison à p53 en N-terminal, de deux domaines acides et doigt de zinc centraux, et d'un domaine RING en C-terminal, nécessaire à l'activité ubiquitine-ligase (Figure 8). Une autre protéine possédant une topologie similaire est également



**Figure 8 : Organisation structurale des protéines MDM2 et MDMX**

Les protéines MDM2 et MDMX sont composées de 4 domaines différents : un domaine de liaison à p53, un domaine acide (Ac), un domaine à doigt de zinc (Zn) et un domaine RING.

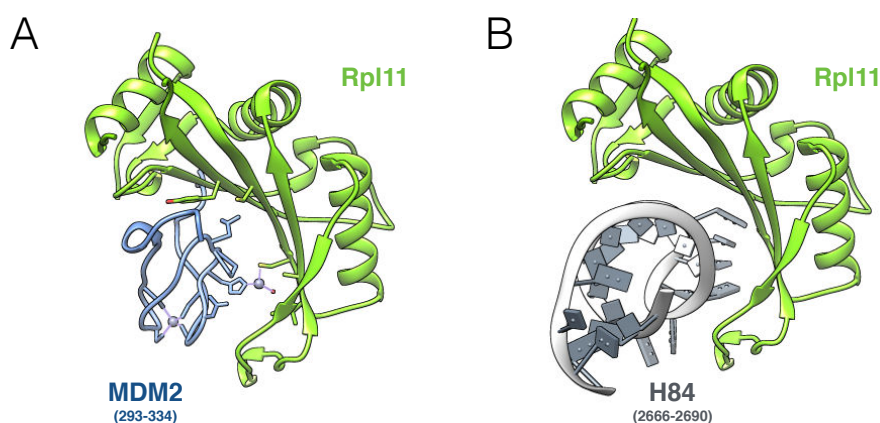
requis dans l'homéostasie de p53. Il s'agit de MDMX (HDMX chez l'Homme). Cette protéine homologue à MDM2 est également impliquée dans l'inhibition de l'activité de p53. Elle est composée d'un domaine RING inactif qui est incapable de cibler p53. MDMX peut cependant interagir avec p53 pour inhiber son activité, mais ne peut pas promouvoir sa dégradation (Jackson and Berberich, 2000).

### b. Rôle de Rpl5 et de Rpl11 dans la régulation de p53

De nombreuses études ont montré que des protéines ribosomiques pouvaient intervenir dans l'homéostasie de p53 en cas d'inhibition de la biogenèse des ribosomes. En effet, ces protéines de la grande (comme Rpl5, Rpl11, Rpl23) et de la petite sous-unité (Rps3, Rps7, Rps14, Rps25) sont capables d'interagir avec MDM2.

Parmi ces protéines ribosomiques, seules Rpl5 et Rpl11 semblent essentielles à la mise en place d'un programme pro-apoptotique en cas de trouble de la biogenèse des ribosomes. En effet, la déplétion des protéines Rpl5 et Rpl11 peut empêcher la stabilisation de p53 due à un stress nucléolaire induit dans ces cellules humaines (Bursac et al. 2012, Fumagalli et al. 2012). Ce phénomène n'est pas observé quand d'autres protéines ribosomiques sont inactivées. Par ailleurs, la sur-expression de Rpl5 et Rpl11 dans des cellules U20S humaines mène à une stabilisation de p53 (Horn et Vousden, 2008).

Les protéines Rpl5 et Rpl11 peuvent fixer MDM2 au niveau de ses domaines acide et doigt de zinc. Ces interactions conduisent à l'inhibition de l'activité ubiquitine ligase de MDM2 (Dai et Lu, 2004 ; Lohrum et al. 2003). Récemment, la structure cristallographique d'une partie du complexe MDM2/Rpl11 a été résolue (Figure 9). Les domaines acides et doigt de zinc de



**Figure 9 : Structure du complexe Rpl11/MDM2**

(A) représentation de la structure cristallographique de Rpl11 associée aux domaines acide et doigt de zinc de MDM2 (293-334) chez l'Homme (code PDB : AXXB). (B) MDM2 occupe le même site de liaison que l'hélice 84 de l'ARNr 25S dans la structure du ribosome (code PDB : 4V7R).

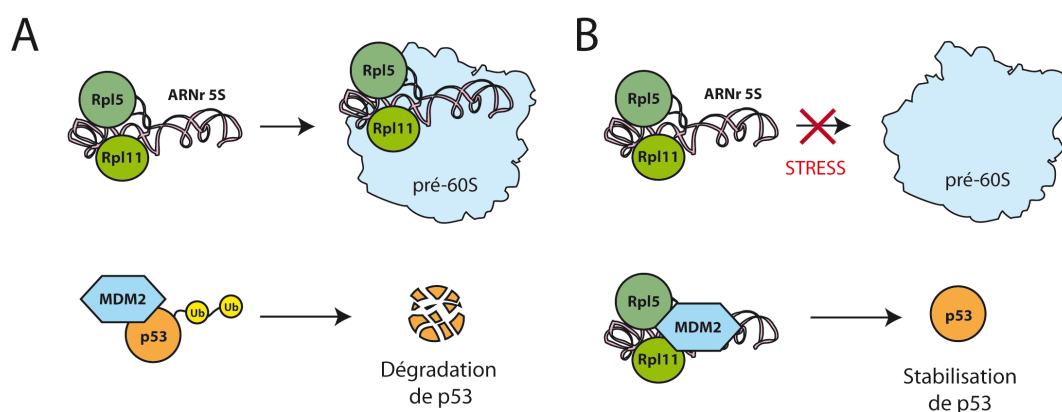
MDM2 interagissent avec Rpl11 au niveau de son site de liaison à l'ARNr 25S (Zheng et al. 2015). MDM2 ne pourrait donc pas interagir avec cette protéine ribosomique une fois associée à la grande sous-unité.

### c. Rôle de l'ARNr 5S dans la régulation de p53

En plus d'établir des interactions directes avec les protéines Rpl5 et Rpl11, MDM2 est également capable d'interagir avec l'ARNr 5S chez la souris (Marechal et al. 1994). Chaque composant de la particule 5S semble donc impliqué dans la régulation de p53. En 2013, deux études distinctes ont montré l'importance de l'ensemble de la particule 5S dans la régulation de p53 (Sloan et al. 2013 ; Donati et al. 2013) : en cas d'inhibition de la biogenèse du ribosome par l'actinomycine D, un inhibiteur de l'ARN polymérase I, la particule 5S s'accumule en dehors du ribosome, dans le nucléoplasme, pour lier MDM2 et stabiliser p53 (Figure 10).

Le rôle de MDMX dans cette voie de régulation a également été étudié. L'ARNr 5S peut directement lier le domaine RING de MDMX et inhiber sa dégradation par MDM2 (Li et Gu 2011). Néanmoins, aucune interaction entre MDMX, Rpl5 et Rpl11 n'a été montrée à ce jour. L'ARNr 5S sous forme libre jouerait un rôle dans l'inhibition de p53 dans des conditions normales de croissance en protégeant MDMX de la dégradation. En cas de stress nucléolaire, l'interaction entre la particule 5S et MDM2 conduirait à l'ubiquitination de MDMX par MDM2.

Chaque composant de la particule 5S est donc fortement impliqué dans l'homéostasie de p53. Ces données font de la particule 5S un sous-complexe indépendant du ribosome, qui influence directement les capacités de prolifération cellulaire.



**Figure 10 : La voie p53/MDM2/Particule 5S**

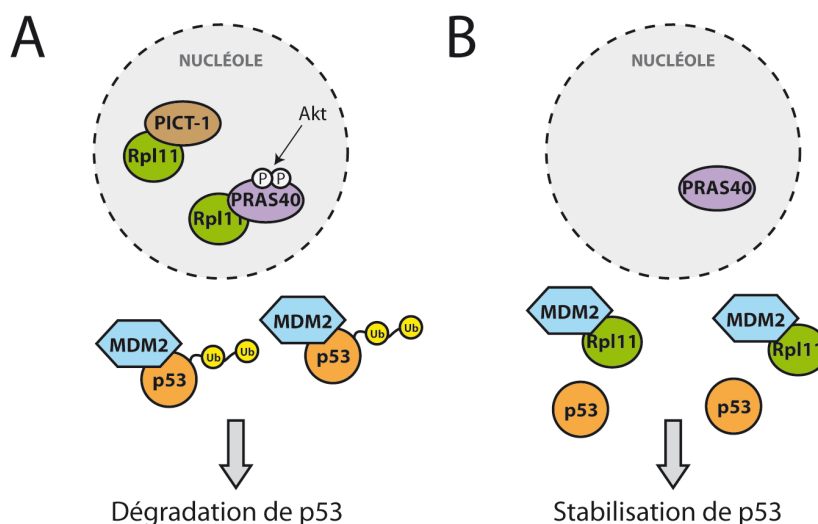
(A) En conditions normales de croissance cellulaire, la particule 5S s'associe aux particules pré-60S. L'expression de p53 est maintenue à un niveau basal, grâce à MDM2 qui catalyse son ubiquitination. (B) En cas de trouble de la biogenèse du ribosome, la particule 5S s'accumule en dehors du ribosome, et lie MDM2 pour inhiber son activité ubiquitine-ligase. p53 est alors stabilisée.

#### d. Régulation de la voie MDM2/p53/5S

Certaines protéines peuvent interagir directement avec Rpl11 et Rpl5 pour moduler la régulation de p53. PICT-1 et PRAS40 interagissent avec Rpl11 pour empêcher la stabilisation de p53, alors que SRSF1 contacte Rpl5 pour la promouvoir.

PICT-1 (Nop53 chez la Levure) est un facteur d'assemblage impliqué dans la maturation de la grande sous-unité (Thomson et Tollervey, 2005). Deux études ont montré que l'absence de PICT-1 menaient à une forte diminution de l'intégration de la particule 5S dans la grande sous-unité (Sloan et al. 2013 ; Donati et al. 2013). Cela peut être expliqué par le rôle de PICT-1, qui est responsable de la localisation nucléolaire de Rpl11. En cas de stress ribosomique, ces deux protéines quittent le nucléole pour le nucléoplasme (Sasaki et al. 2011). La déplétion de PICT-1 dans des cellules ES humaines mène à la stabilisation de p53 (Sasaki et al. 2011). Ce facteur peut interagir avec Rpl5 et Rpl11, mais seule la déplétion de Rpl11 peut empêcher l'accumulation de p53 due à l'absence de PICT-1. Ces données suggèrent donc que PICT-1, en séquestrant Rpl11 dans le nucléole, empêche son interaction avec MDM2 dans le nucléoplasme. Ce mécanisme assurerait donc le maintien d'une population de MDM2 active, capable de maintenir l'expression de p53 à un niveau basal (Figure 11).

La protéine PRAS40 semble jouer un rôle similaire à celui de PICT-1. PRAS40 est impliqué dans la régulation de la voie de réponse aux nutriments mTOR. Sa phosphorylation par les protéines Akt mène à l'activation de cette voie en présence de facteurs de croissance



**Figure 11 : Rôle de PICT-1 et de PRAS40 dans la régulation de p53**

(A) La localisation nucléolaire de Rpl11 est due aux protéines PICT-1 et PRAS40 (B) en absence de PICT-1 et de PRAS40, Rpl11 peut interagir avec MDM2 dans le nucléoplasme. p53 est alors stabilisé.

(Kovacina et al. 2003). Une fois phosphorylé, PRAS40 est capable d'interagir avec Rpl11 dans le nucléole. Sa déplétion dans des lignées cellulaires humaines U2OS mène à l'accumulation de p53 d'une manière dépendante de Rpl11 (Havel et al. 2015). Tout comme pour PICT-1, PRAS40 pourrait jouer un rôle dans l'inhibition de la voie p53/MDM2/5S en séquestrant Rpl11 dans le nucléole (**Figure 11**).

SRSF1 est un facteur d'épissage, également impliqué dans l'export cytoplasmique d'ARNm et dans le mécanisme de surveillance de transcrits possédant des mutations non sens (Long et Caceres 2009). Par ailleurs, SRSF1 est impliqué dans la régulation de l'initiation de la traduction coiffe-indépendante après l'activation de la voie m-TOR (Michlewski et al. 2008) et est également stabilisé par c-Myc (Das et al. 2012). Ce facteur se place donc au centre de plusieurs voies régulant la prolifération cellulaire, et est retrouvé sur-exprimé dans de nombreux cancers (Anczukow et al., 2012). D'autre part, la déplétion de SRSF1 peut contrer l'accumulation de p53 en cas d'inhibition de la biogenèse des ribosomes par l'actinomycine D. Des interactions entre Rpl5, MDM2 et SRSF1 ont d'ailleurs été montrées dans la même étude (Fregoso et al. 2013).

#### **IV. Synthèse de l'ARNr 5S et intégration dans le ribosome**

La biogenèse de l'ARNr 5S est très différente de celle des autres ARNr. l'ARNr 5S est le seul ARNr à être transcrit par l'ARN polymérase III, et peut s'associer en dehors du ribosome avec les protéines ribosomiques Rpl5 et Rpl11 pour former la particule 5S. Le principal objectif de ma thèse est de comprendre les mécanismes qui régissent l'intégration de la particule 5S au sein des sous-unités pré-60S.

Je commencerai ici par un bref historique sur la découverte de l'ARNr 5S. Dans la deuxième partie de ce chapitre je décrirai la fonction de l'ARNr 5S au sein du ribosome mature. Je détaillerai ensuite les étapes de transcription et de maturation qui mènent à la production de l'ARNr 5S mature. Enfin, je finirai par résumer l'état des connaissances actuelles sur l'assemblage et l'intégration de la particule 5S au sein des pré-ribosomes.

## 1. Historique

La découverte de l'ARNr 5S est directement liée à celle des ARN de transferts. C'est au début des années 60 que le rôle des ARNt dans la traduction fut découvert. Des études d'interaction entre ces ARN de petits poids moléculaire et le ribosome procaryote ont permis de mettre en évidence l'existence d'un ARN d'une centaine de nucléotides, fortement associé aux particules ribosomiques (Elson et al. 1961, Smith et al. 1962). À cause de son coefficient de sédimentation proche de celui des ARNt (5S contre 4S pour les ARNt) cet ARN a d'abord été appelé « transfert-like RNA » et a été identifié comme un précurseur des ARNt (Comb et al. 1965). L'observation de différences fondamentales entre cet ARN et les ARNt a rapidement remis en cause cette théorie : contrairement aux ARNt, il ne contient pas de bases modifiées, pas de triplet CCA terminal à l'extrémité 3', et ne peut être associé à des acides aminés (Rosset et Monier 1963). De plus, il ne peut être dissocié de la grande sous-unité du ribosome qu'en conditions fortement dénaturantes (Comb et Sarkar. 1967), et n'est pas ou peu retrouvé sous forme libre dans le cytoplasme d'*E. coli* (Cannon et Richards, 1967). Les derniers doutes sur la classification de l'ARN 5S ont disparu avec la détermination de sa séquence primaire à la fin des années 60 (Forget et Weissman, 1967). Cet ARN de petit poids moléculaire a alors été identifié comme un nouvel ARN ribosomique, l'ARNr 5S.

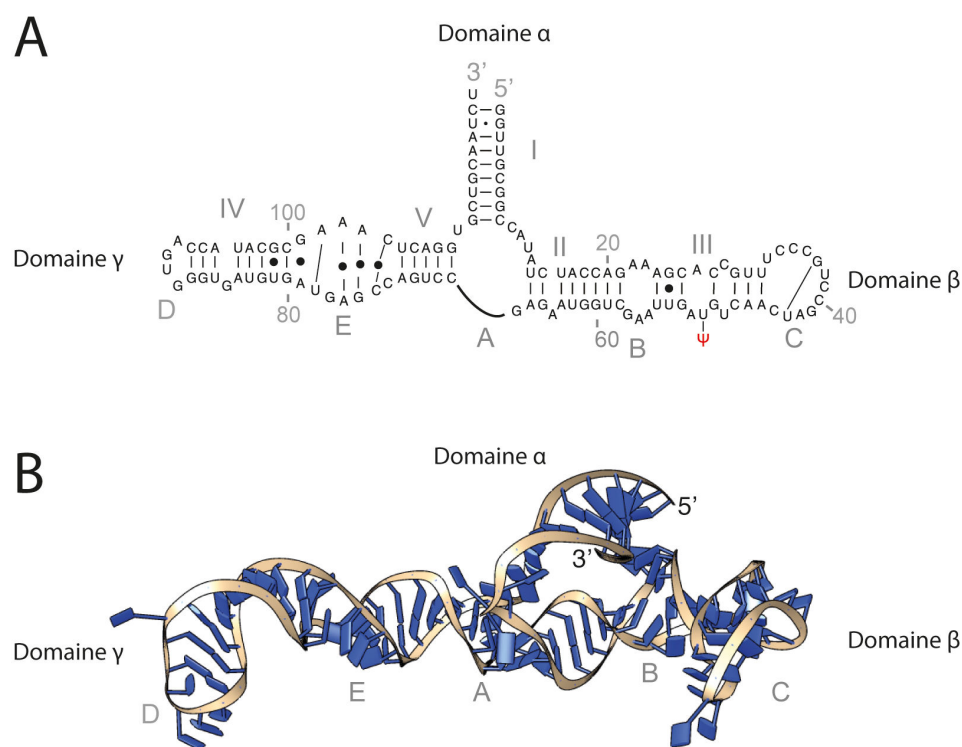
## 2. L'ARNr 5S dans le ribosome

L'ARNr 5S a une masse moléculaire d'environ 40kDa. C'est le plus petit des ARN ribosomique (120 nucléotides chez l'Homme et 121 chez *S. cerevisiae*). Il est retrouvé dans les ribosomes de tous les organismes vivants, hormis dans les ribosomes mitochondriaux d'animaux et de champignons. L'analyse comparative de l'ARNr 5S issu de différents organismes, comprenant des études de marquages chimiques et enzymatiques (Chow et al. 1992), des analyses de dénaturation par microcalorimétrie (Pieler et al. 1985, Sneath et al. 1986), des modifications chimiques de bases (Pieler et al. 1983), ou des prédictions de structures secondaires à partir de la séquence primaire (Luehrsen et al. 1981) ont permis de montrer que la structure secondaire du 5S était extrêmement bien conservée au cours de l'évolution.

Plusieurs structures cristallographiques de la forme libre (Lorenz et al. 2000, Funari et al. 2000), de domaines isolés (Xiong et al. 2000 ; Huber et al. 2001 ; Betzel et al. 1994) ou encore de formes associées au ribosomes (Ban et al. 2000 ; Ben-Shem et al. 2010) de l'ARNr 5S ont été résolues. Il adopte une structure en Y, et est composé de cinq hélices (I à V), de cinq boucles (A à E). La boucle centrale A sépare l'ARNr 5S en trois domaines distincts : le domaine  $\alpha$

contient l'hélice I, le domaine  $\beta$  contient les hélices II et III ainsi que les boucles B et C, et le domaine  $\gamma$  contient les hélices IV et V, ainsi que les boucles D et E (**Figure 12**).

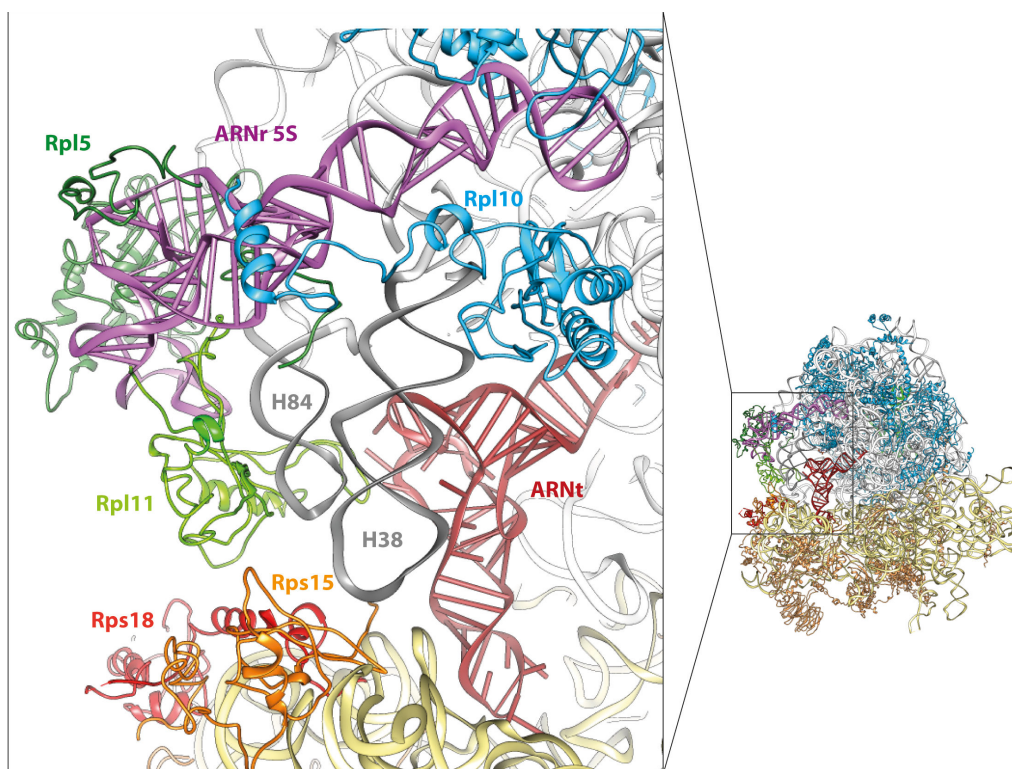
Dans le ribosome mature, l'ARNr 5S est localisé au sein de la protubérance centrale, à l'interface de la grande et de la petite sous-unité, proche du canal de sortie des peptides neosynthétisés. Chez les Procaryotes, l'ARNr 5S est nécessaire à la fixation des ARNt au niveau du site de liaison des aminoacyl-ARNt du ribosome (Dohme et al. 1976). Chez *E. coli*, il est possible de reconstituer des ribosomes fonctionnels en absence d'ADNr 5S ou même de protéines connues pour lier l'ARNr 5S (Ammons et al. 1999 ; Korepanov et al. 2007). Mais la croissance de ces cellules est considérablement ralentie et leur habilité à synthétiser des protéines nettement diminuée. En revanche, chez *S. cerevisiae*, la délétion complète des ADNr 5S mène à un phénotype non viable (Wai et al. 2000). D'ailleurs, le rôle précis de l'ARNr 5S dans la synthèse protéiques des Eucaryotes reste mal caractérisé. En effet, il n'établit aucun contact direct avec les sites A, P, E, le PTC, le PET ou même avec des facteurs d'initiation ou d'élongation de la traduction.



**Figure 12 : Structures secondaires et tertiaires de l'ARNr 5S**

(A) représentation de la structure secondaire de l'ARNr 5S de *S. cerevisiae*. Les tiges sont indiquées par des chiffres romains (de I à V) et les boucles par des lettres en majuscules (de A à E). (B) Représentation de la structure cristallographique de l'ARNr 5S au sein du ribosome de levure (code PDB : 4V7R)

La partie haute de la protubérance centrale du ribosome contient les domaines  $\alpha$  et  $\beta$  de l'ARNr 5S, pris en sandwich entre les protéines ribosomiques Rpl5 et Rpl11 (**Figure 13**). Cette région de la protubérance centrale est extrêmement dynamique : en dehors de l'acte de traduction, Rpl11 contacte la protéine de la petite sous-unité Rps18. La liaison du facteur d'élongation eEF-2 provoque un réarrangement local et l'association de Rpl11 avec Rps15 (Spahn et al. 2004). En plus de ses interactions avec la petite sous-unité, Rpl11 est en contact avec l'hélice 84 de l'ARNr 25S qui participe à la formation du site P de la grande sous-unité. Au coeur de la protubérance centrale, la boucle E de l'ARNr 5S interagit avec la base de l'hélice 38 de l'ARNr 25S qui contribue à la formation du site A (*Site-A finger*) et contacte le centre de décodage de la petite sous-unité. D'autre part, le domaine  $\gamma$  de l'ARNr 5S lie également les hélices 42 et 89 de l'ARNr 25S, impliquées dans le recrutement de certains facteurs d'élongation de la traduction. De part sa localisation dans la structure du ribosome et des contacts qu'il établit avec certaines protéines ribosomiques et l'ARNr 25S, l'ARNr 5S apparaît comme une plateforme de communication entre les différents centres fonctionnels du complexe ribonucléoprotéique, permettant de coordonner les multiples événements catalysés par le ribosome.



**Figure 13 : L'ARNr 5S dans le ribosome**

Structure cristallographique du ribosome de *S. cerevisiae* (code PDB : AV7R). Les bases de l'ARNr 25S (en blanc) et de l'ARNr 18S (en jaune) ont été masquées pour simplifier la représentation. Les hélices 38 et 84 de l'ARNr 25S sont représentées en gris. Un ARNt (en rouge) a été placé dans le site P (code PDB : 5GAK).

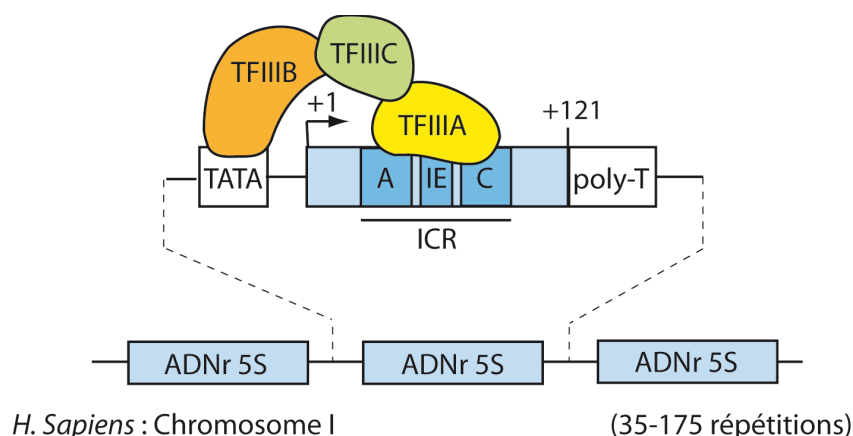


### 3. Biogenèse de l'ARNr 5S

#### a. Transcription par l'ARN polymérase III

Contrairement aux ARNr 5.8S, 18S et 25S qui sont transcrits sous la forme d'un long précurseur par l'ARN polymérase I, l'ARNr 5S est transcrit séparément par l'ARN polymérase III. Dans la plupart des génomes déjà séquencés, les gènes codant pour l'ARNr 5S sont isolés des autres ADNr, et sont situés sur des locus différents. Chez l'Homme, on compte entre 35 et 175 copies répétées sur le chromosome I (Stults et al. 2008). Chaque unité de transcription contient un promoteur interne, situé au milieu de la séquence codante, appelé ICR (pour *Internal control region*). Ce promoteur contient 3 boîtes de séquences consensus : les boîtes A (+50 +64) et C (+80 +97), séparées par un IE pour « *internal element* » (+67 +72) (Pieler et al. 1987). Autour de la séquence codante, on retrouve une boîte TATA en amont, et une boîte T-rich en aval nécessaire à la terminaison de la transcription. Cependant, l'organisation des ADNr 5S chez la levure semble être une exception dans le monde du vivant. D'une part, les gènes codants pour l'ARNr 5S sont situés sur le même locus que les autres ADNr, insérés entre chaque répétitions. D'autre part, les ADNr 5S contiennent un promoteur beaucoup plus court, qui correspondrait à la boîte C (+81 +94) chez les autres organismes (Challice et Segall 1989) (Figure 14).

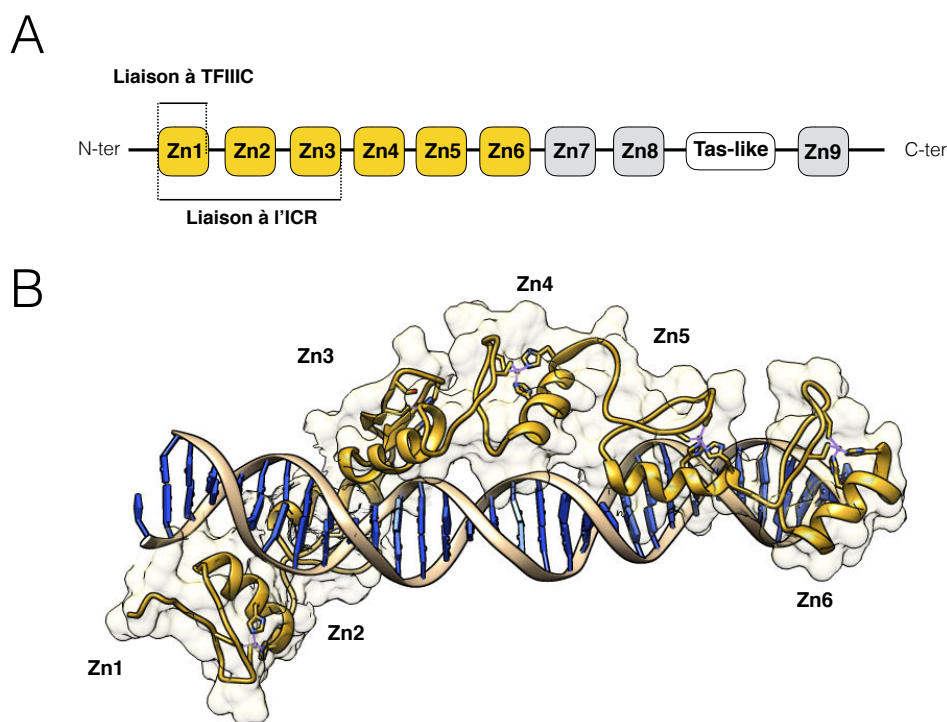
La synthèse de l'ARNr 5S requiert un facteur de transcription spécialisé, appelé TFIIIA. Cette protéine n'est pas impliquée dans la synthèse des autres ARN transcrits par l'ARN polymérase III. TFIIIA possède deux fonctions distinctes : cette protéine peut à la fois fixer l'ADNr 5S et l'ARNr 5S. La fixation de TFIIIA sur le promoteur interne de l'ADNr 5S constitue le premier événement moléculaire de l'initiation de la transcription. Elle conduit au recrutement des facteurs



**Figure 14 : Organisation des ARNr 5S chez l'Homme**

Chez l'Homme les ADNr 5S sont répétés entre 35 et 175 fois sur le chromosome I. Les séquences promotrices A, E et IE sont représentées par des boîtes bleues.

TFIIIB et TFIIIC pour former un complexe ternaire qui recrute l'ARN polymérase III. TFIIIA est une protéine à doigts de zinc conservée chez tous les Eucaryotes. Chez *S. cerevisiae*, TFIIIA contient 9 doigts de zinc et un domaine TAS-like situé entre les huitième et neuvième doigts de zincs C-terminaux. La fixation de TFIIIA sur le promoteur interne implique l'ensemble des domaines doigts de zincs. La structure du complexe ADNr/TFIIIA (Nolte et al. 1998) montre que le facteur de transcription s'enroule autour l'ADNr en recouvrant environ 55 pb (Engelke et al. 1990) (Figure 15). Mais tous les doigts de zinc ne participent pas de manière équivalente à la liaison à l'ADN. En effet, certaines études attribuent 95% de l'énergie de liaison à l'ADNr 5S aux trois doigts de zinc N-terminaux (Del Rio et al 1993, Clemens et al. 1992). Le domaine TAS-like n'est pas impliqué dans la liaison au promoteur mais recrute le complexe d'initiation de la transcription (Hayes et al. 1989).



**Figure 15 : Structure cristallographique de TFIIIA en complexe avec l'ADNr 5S**

(A) Organisation du facteur de transcription TFIIIA. (B) Structure cristallographique des 6 doigts de zinc N-terminaux de TFIIIA en complexe avec l'ADNr 5S de *Xenopus Laevis* (code PDB : 1TF6).

### **b. Maturation et contrôle qualité de l'ARNr 5S**

Contrairement aux autres ARNr, La maturation post-transcriptionnelle du 5S est rapide et n'implique pas de clivage endonucléolytique. Cependant, le 5S néo-transcrit contient une extension d'une dizaine de nucléotides en 3' (de 7 à 13 en fonction des organismes). Chez la levure, l'élimination de cette séquence additionnelle fait intervenir l'exonucléase Rex1, conservée chez l'Homme ([Van Hoof et al. 2000](#)). En effet, la déplétion de Rex1 chez *S. cerevisiae* conduit à une accumulation d'ARNr 5S immature. L'absence de Rex1 pourrait cependant être partiellement compensée par deux autres exonucléases impliquées dans la maturation en 3' des transcrits de l'ARN polymérase III, Rex2 et Rex3. D'autre part, chez l'Homme, l'ARNr 5S se distingue des autres ARNr par l'absence de nucléotides modifiés. La présence d'une pseudouridine en position 50 a cependant été rapportée chez *S. cerevisiae* ([Miyazaki et al. 1974](#)).

La biogenèse de l'ARNr 5S a été particulièrement étudiée chez le xenope. Dans cet organisme modèle, le 5S est retrouvé associé aux protéines Ro et La. Ces protéines nucléolaires contiennent des motifs RRM de liaison aux acides nucléiques et possèdent des spécificités de liaisons aux ARN transcrits par l'ARN polymérase III. Malgré la diversité de leur séquences primaires, ces transcrits partagent une caractéristique structurale commune : la présence d'une longue tige formée par l'appariement des extrémités 3' et 5' ([Chen and Wolin, 2004](#)). Chez le Xenope, Ro est retrouvée spécifiquement liée aux ARNr 5S immatures, dont l'extension nucléotidique en 3' est toujours présente. De plus, cette protéine est également retrouvée, avec la protéine La, associée *in vivo* à des mutants de 5S ([O'Brien et Wolin, 1994](#)).

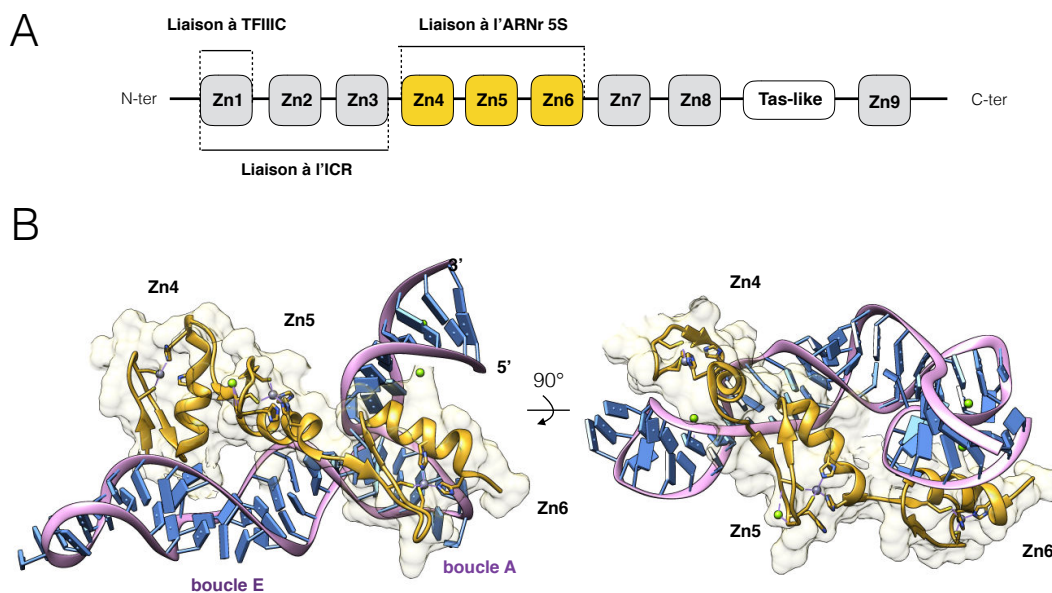
Enfin, une étude dans les cellules HeLa a montré qu'environ 1 à 2% des ARNr 5S libres (en dehors du ribosome) sont retrouvés associés à la protéine La ([Steitz et al. 1988](#)). La reconnaît les uridines de l'extrémité 3' des ARN de la classe Y ([Stefano et al. 1984](#)), et chaperonne leur maturation et leur repliement en facilitant la fixation d'autres partenaires protéiques ([Maraia et Intine, 2001](#)). L'ensemble de ces données suggère que ces deux protéines essentielles chez les métazoaires sont impliquées dans la surveillance et le contrôle qualité de l'ARNr 5S.

### **c. Stockage cytoplasmique de l'ARNr 5S chez le xenope**

Outre son rôle dans la transcription de l'ADNr 5S, le facteur TFIIIA est également capable d'interagir directement avec l'ARNr 5S. Le complexe TFIIIA/5S a été mis en évidence dans le cytoplasme d'ovocytes de xenope ([Pelham et al. 1980](#)) et de poisson-chat ([Ogilvie et Hanas, 1997](#)) et aucune interaction entre TFIIIA et d'autres ARN n'a été montrée à ce jour. Ce facteur de transcription ne possède aucune activité enzymatique, et sa fonction dans sa liaison à l'ARNr 5S reste mal comprise.

Dans le cytoplasme des ovocytes de xénope, TFIIIA est retrouvé associé avec environ 50% de la fraction libre d'ARNr 5S, formant la particule 7S (Pelham et al. 1980). Durant l'ovogenèse, l'ovocyte de xénope accumule d'énormes quantités de ribosomes pour préparer les étapes de croissance et de développement de l'embryon. TFIIIA est particulièrement abondant dans ces cellules et y assure le maintien d'une population d'ARNr 5S déjà transcrits, prête à rejoindre les ribosomes en cours d'assemblage. Le rôle de TFIIIA dans le stockage de l'ARNr 5S semble cependant être spécifique à certaines lignées germinales. TFIIIA est en effet beaucoup moins présent dans les cellules somatiques : on compte environ  $10^{11}$  exemplaires de TFIIIA par ovocyte de xénope pour 400 exemplaires par cellule HeLa (Honda et al. 1980).

La structure de trois doigts de zinc de TFIIIA associés à une forme tronquée d'ARNr 5S de xénope (correspondant aux domaines  $\alpha$  et  $\gamma$ ) a été résolue par l'équipe d'Aaron Klug en 2003 (Lu et al. 2003). Ces trois doigts de zinc ont des modes d'interaction très différents avec l'ARNr. Le cinquième doigt de zinc interagit avec la région double brin de l'hélice V, alors que les doigts de zinc 4 et 6 interagissent avec des nucléotides exposés dans les boucles E et A (**Figure 16**). L'interaction avec l'ARNr 5S dissimule le signal NLS (*Nuclear Localization Signal*) de TFIIIA, expliquant comment ce complexe peut s'accumuler dans le cytoplasme.



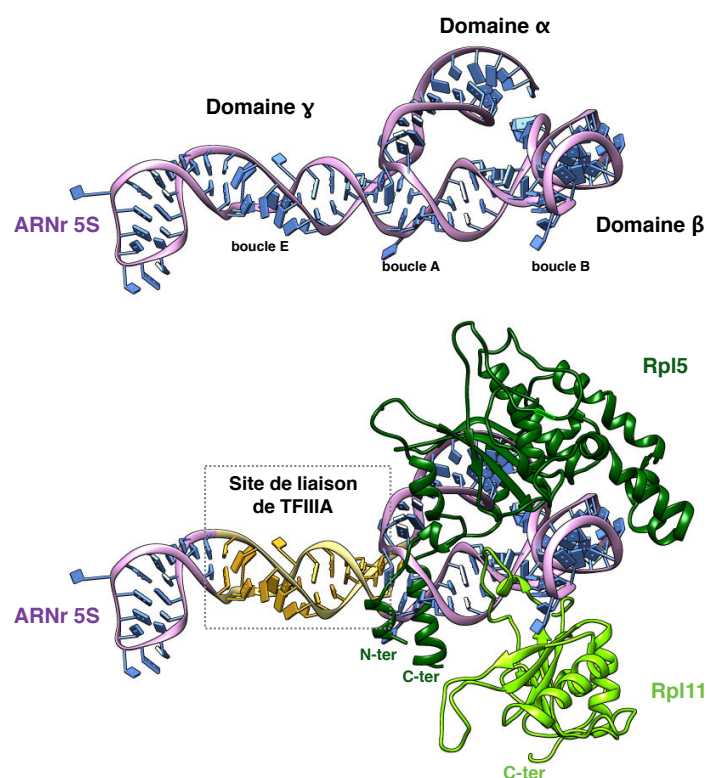
**Figure 16 : Structure de TFIIIA en complexe avec l'ARNr 5S**

(A) Organisation du facteur de transcription TFIIIA. (B) Structure cristallographique des doigts de zinc 4, 5 et 6 de TFIIIA en complexe avec une forme tronquée d'ARNr 5S de *Xenopus Laevis* (code PDB : 1UN6). La forme tronquée correspond aux domaines  $\alpha$  et  $\gamma$  de l'ARNr 5S.

Chez *S. cerevisiae*, TFIIIA est également capable de lier l'ARNr 5S. Cependant, il n'existe pas de stockage cytoplasmique de particule 7S. De plus, TFIIIA ne contient pas de signal NES (*Nuclear Export Signal*) identifié chez la levure : cette interaction serait alors strictement nucléaire.

#### 4. Association des protéines Rpl5 et Rpl11 avec l'ARNr 5S

Les protéines Rpl5 et Rpl11 peuvent s'associer avec l'ARNr 5S en dehors du ribosome pour former le sous-complexe appelé particule 5S (Steitz et al. 1988, Zhang et al. 2007, Sloan et al. 2013). Dans la structure du ribosome mature, Rpl5 interagit avec les domaines  $\alpha$  et  $\beta$  de l'ARNr 5S au niveau d'une large surface d'interaction. L'extrémité C-terminale de Rpl5 contient une région basique indispensable à cette liaison et à son intégration dans le ribosome (Moradi et al. 2008). En revanche, Rpl5 ne contacte pas Rpl11 qui possède une zone d'interaction plus restreinte avec l'ARNr 5S et contacte directement la boucle B. Les sites de liaison de Rpl5 et de Rpl11 sur l'ARNr 5S sont donc distincts de celui de TFIIIA, qui fixe l'ARNr au niveau du domaine  $\gamma$  (Figure 17).



**Figure 17 : Structure cristallographique de l'ARNr 5S lié à Rpl5 et Rpl11**  
Structure du complexe Rpl5/Rpl11/5S au sein du ribosome de *S. cerevisiae* (code PDB : AV7R). L'ARNr 5S a également été représenté seul, dans la même orientation. Le site de liaison du facteur de transcription TFIIIA sur l'ARNr 5S est représenté en jaune.

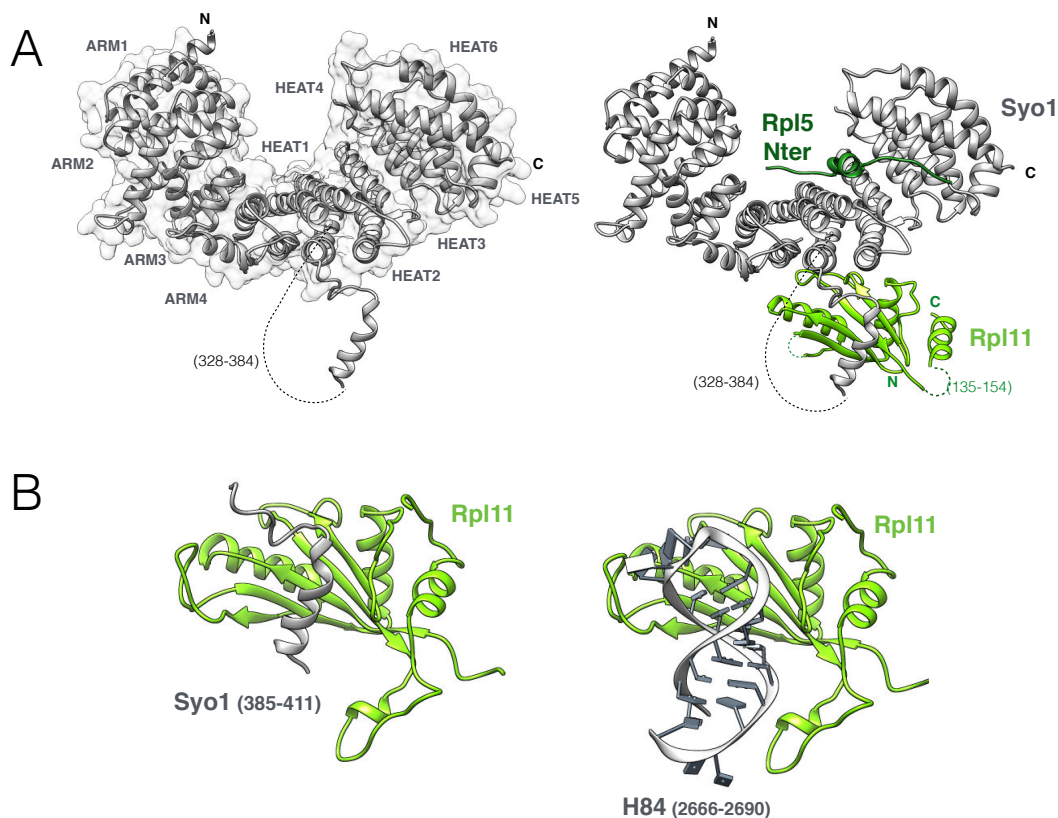
Les mécanismes qui mènent à la dissociation de TFIIIA et à l'association de Rpl5 et de Rpl11 sur l'ARNr 5S sont mal caractérisés. De manière intéressante, la sur-expression de Rpl5 dans des embryons de xénope mène à l'activation ectopique de gènes codant pour l'ARNr 5S (Pittman et al. 1999). Il est possible que l'interaction entre Rpl5 et l'ARNr 5S favorise la forme libre de TFIIIA, capable d'initier la transcription. La fixation de Rpl5 sur l'ARNr 5S provoquerait alors la dissociation de TFIIIA.

## 5. Import nucléaire de Rpl5 et de Rpl11 par une importine spécialisée

Avant leur association avec l'ARNr 5S, les protéines ribosomiques Rpl11 et Rpl5 sont traduites dans le cytoplasme et doivent être importées dans le nucléoplasme. Les protéines ribosomiques sont généralement importées dans le noyau par des récepteurs de la famille des importines  $\beta$  / karyopherines  $\beta$  (Rout et al. 1997). Ces récepteurs solubles reconnaissent les séquences NLS de protéines cargo dans le nucléoplasme (soit directement, soit via un adaptateur protéique de la famille des importines  $\alpha$ ) et facilitent leurs passages au travers du pore nucléaire. La dissociation des protéines cargo dans le nucléoplasme est ensuite médiée par la protéine RanGTP.

L'import de Rpl5 dans le noyau de cellules HeLa est plus lent que celui d'autres protéines ribosomiques, suggérant un mécanisme différent (Lam et al. 2007). En effet, les protéines Rpl5 et Rpl11 sont co-importées dans le noyau par une importine spécialisée appelée Syo1 (Kressler et al. 2012). Syo1 est conservée chez tous les Eucaryotes. Cette protéine adopte une structure hybride, comportant quatre domaines ARM en N-terminal, et six domaines HEAT coté C-terminal (**Figure 18A**). Ces motifs répétitifs sont habituellement retrouvés chez les importines  $\alpha$  et  $\beta$  respectivement. Cette topologie unique forme une super-hélice, appelée solénoïde, que l'on retrouve chez les importines de la classe  $\alpha$ . La surface concave des répétitions HEAT contacte la séquence NLS située dans l'extrémité N-terminale de Rpl5. De l'autre côté, la surface convexe des domaines HEAT interagit avec Rpl11 (Calvino et al. 2015) (**Figure 18A**). De façon intéressante, Syo1 occupe le même site de liaison sur Rpl11 que l'hélice 84 de l'ARNr 25S dans la structure du ribosome (**figure 18C**).

Pour agir comme un transporteur, Syo1 doit pouvoir passer au travers du maillage hydrophobe formé par les FG-repeat du pore nucléaire. Syo1 est capable de lier *in vitro* les protéines Nup qui portent ces FG-repeat, et peut traverser le pore nucléaire de cellules HeLa perméabilisées en absence d'autres protéines (Kressler et al. 2012). En revanche, le complexe Syo1/Rpl5/Rpl11 en est incapable, suggérant l'intervention d'une autre importine. En effet, le passage au travers de ce pore nucléaire nécessite un quatrième partenaire, la protéine Kap104 de la famille des importines  $\beta$  (Kariophérine  $\beta$  chez l'Homme), qui interagit avec le signal NLS

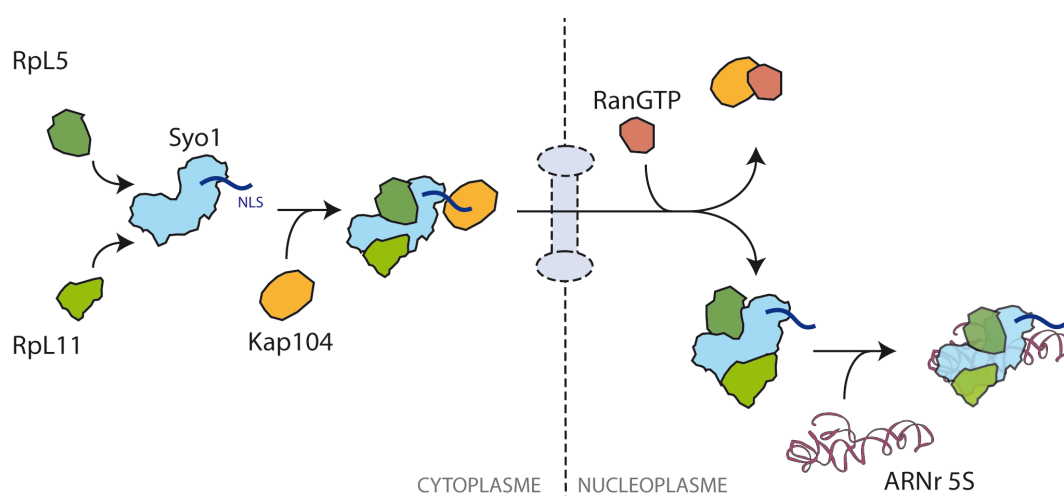


**Figure 18 : Structure du complexe Syo1/Rpl5/Rpl11**

(A) Structure cristallographique du complexe Syo1/Rpl5/Rpl11 (code PDB : 5AFF). (B) Visualisation de l'interaction de Rpl11 avec l'hélice 84 de l'ARNr 25S (code PDB 4V7R). Cette représentation est comparée à celle de l'interaction entre Rpl11 et Syo1.

situé en N-terminal de Syo1. Une fois dans le nucléoplasme, Kap104 est dissocié du complexe Syo1/Rpl5/Rpl11 par la protéine RanGTP (**Figure 19**).

Chez la levure, des défauts de croissance cellulaire induits par des mutations du domaine globulaire de Rpl5 peuvent être compensées par une sur-expression de Syo1 (Kressler et al. 2012). Syo1 agirait alors comme une chaperonne, pour prévenir l'agrégation de Rpl5 en l'escortant du cytoplasme au nucléoplasme. De plus l'import coordonnée et stoechiométrique de Rpl5 et de Rpl11 pourrait faciliter l'assemblage de la particule 5S. Le complexe Syo1/Rpl5/Rpl11 est d'ailleurs capable d'interagir *in vitro* avec l'ARNr 5S (Calvino et al. 2015), suggérant un rôle de Syo1 dans la formation de la particule 5S. Par ailleurs, Syo1 occupe le même site de liaison sur Rpl11 que l'hélice 84 de l'ARNr 25S, et pourrait ainsi prévenir l'association précoce de Rpl11 avec les pré-ribosomes.



**Figure 19 : Import nucléaire des protéines Rpl11 et Rpl5**

## 6. Rôle des facteurs Rpf2 et Rrs1

Rrs1 et Rpf2 (Bxdc1 chez l'Homme) sont présents chez tous les Eucaryotes, et leur déplétion chez la levure mène à une diminution de l'intégration de la particule 5S dans les pré-ribosomes (Zhang et al. 2007). Le rôle des protéines Rrs1 et Rpf2 dans l'intégration de la particule 5S a été décrit par le laboratoire de John Woolford en 2007. Dans cette étude, des expériences de TAP-tag réalisées sur Rpf2 ont permis d'identifier des interactions avec Rrs1, Rpl5, Rpl11 et l'ARNr 5S. La même expérience réalisée en présence d'un cocktail de phosphatases qui déstabilisent les particules ribonucléoprotéiques montre une forte interaction entre Rpf2 et Rrs1, suggérant que ces deux protéines forment un dimère très stable. Des tests d'interactions par capture d'affinité *in vitro* (pull-down) ont montré des interactions directes entre Rpf2, Rrs1, Rpl5 et Rpl11 (Zhang et al. 2007).

Afin de déterminer à quelle étape de la biogenèse du ribosome sont intégrés Rpf2 et Rrs1, des expériences de TAP-tag couplées à des méthodes de détection d'ARNr par extension d'amorces ont été réalisées dans la même étude. Chez la levure, Rpf2 et Rrs1 sont retrouvés associés aux pré-ARNr 35S, 27SA<sub>2</sub> et 27SB, suggérant une intégration très précoce dans les particules pré-90S. De plus, 45 facteurs d'assemblages sont co-purifiés avec Rpf2-TAP et Rrs1-TAP. Hormis sept, ils sont tous retrouvés dans les deux types de particules, suggérant que l'intégration de Rpf2 et de Rrs1 dans les pré-ribosomes est simultanée. Il est également à noter que Rpl5 et Rpl11 s'associent très tôt aux pré-ribosomes. En effet, ces protéines ont été identifiées dans des particules ribosomiques pré-90S purifiées en utilisant Rrp5 comme appât.



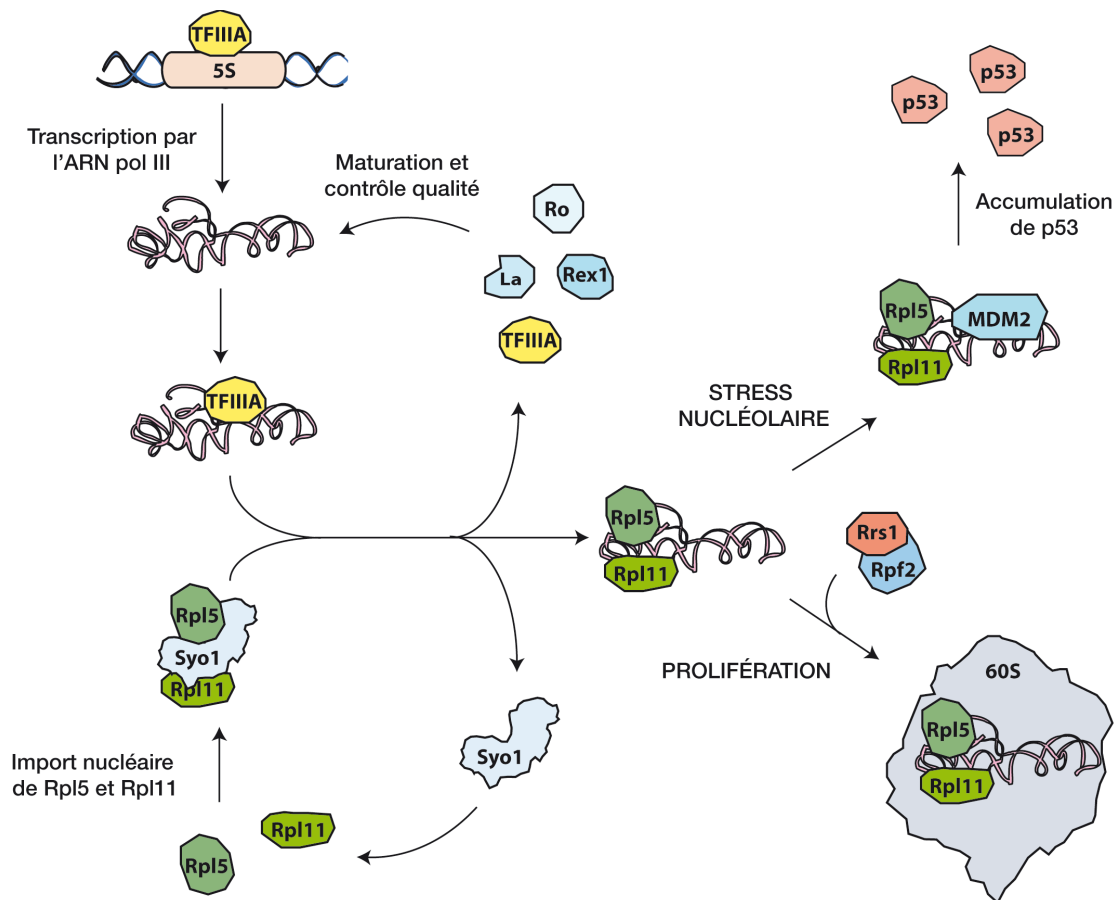
L'ensemble de ces résultats indique donc que Rpf2, Rrs1, Rpl5 et Rpl11 sont associés aux ribosomes durant des étapes similaires de l'assemblage précoce de la grande sous-unité.

Rpf2 et Rrs1 appartiennent à la famille des facteurs B, dont l'association avec les pré-ribosomes est nécessaire au clivage en C<sub>2</sub>. L'association de ces facteurs B aboutit normalement à la fixation de la GTPase Nog2 (Talkish et al. 2012). En accord avec cette hypothèse, la déplétion chez la levure de Rpf2 ou de Rrs1 mène à l'absence de Nog2 des particules 66S, associée à une inhibition du clivage en C<sub>2</sub>, et à un blocage de l'export de la grande sous-unité dans le cytoplasme. D'autre part, la déplétion de Rpf2 mène également à un défaut d'association de la protéine ribosomique Rpl10. Dans la structure du ribosome eucaryote mature, Rpl10 établit des contacts directs avec Rpl11 et le domaine  $\gamma$  de l'ARNr 5S. Cette protéine est également nécessaire à l'export de la grande sous-unité dans le cytoplasme (Gadal et al. 2001), expliquant probablement la séquestration nucléaire des particules Rpf2 $\Delta$ . L'ensemble de ces données suggère donc que Rpf2 et Rrs1 sont nécessaires à la maturation de la grande sous-unité, et jouent un rôle crucial dans l'organisation structurale de la protubérance centrale.

## V. Objectifs

L'ARNr 5S suit une voie de synthèse et de maturation complètement différente de celle des autres ARNr. Il est le seul ARNr transcrit par l'ARN polymérase III et peut s'associer avec des protéines ribosomiques en dehors du ribosome. L'ARNr 5S est également impliqué dans la mise en place d'une réponse pro-apoptotique en cas de trouble de la biogenèse du ribosome chez l'Homme. Il agirait alors comme un senseur de l'état de biogenèse du ribosome, dont l'équilibre entre la forme libre et la forme liée au ribosome conditionne directement les capacités de prolifération cellulaire. Les protéines Rpf2 et Rrs1 régulent directement cet équilibre, en favorisant le recrutement de l'ARNr 5S au sein des pré-ribosomes (**Figure 20**).

Durant ma thèse, j'ai étudié les mécanismes d'intégration de l'ARNr 5S au sein de la grande sous-unité du ribosome en utilisant l'organisme modèle *S. cerevisiae*. Rpf2 et Rrs1 sont essentiels à l'intégration de l'ARNr 5S, mais leur mode d'action reste mal caractérisé. Leurs structures tridimensionnelles étaient d'ailleurs inconnues au début de ma thèse. Ce travail vise à comprendre les mécanismes structuraux et fonctionnels par lesquels le dimère Rpf2/Rrs1 chaperonnent l'assemblage de l'ARNr 5S au sein des ribosomes. Rpf2 contient un domaine BRIX, retrouvé chez quatre autres facteurs d'assemblage de la biogenèse du ribosome : Rpf1, Imp4, Brix1, et Ssf1. Des tests d'interaction *in vitro* ont montré que le domaine BRIX de Rpf2 pouvait interagir avec des ARN poly(A), poly(U) et poly(G) de synthèse (Wehner and Baserga 2002). Cependant, les interactions qu'établit Rpf2 avec les ARNr *in vivo* ne sont pas connues.



**Figure 20 : Synthèse, maturation et intégration de l'ARNr 5S au sein des ribosomes**

Afin de mieux comprendre le rôle du dimère Rpf2/Rrs1 dans l'intégration de l'ARNr 5S et la maturation de la grande sous-unité, j'ai entrepris une étude structurale du complexe Rpf2/Rrs1. Ce travail est décrit dans la première partie des résultats. Cette étude, couplée à des méthodes de caractérisations fonctionnelles, comme par exemple des tests d'interaction protéine-protéine ou protéine-ARN *in vivo* et *in vitro* nous a permis de proposer un modèle pour l'intégration de la particule 5S au sein des pré-ribosomes.

J'ai ensuite concentré mes efforts sur l'étude de l'interaction entre le complexe Rpf2/Rrs1 et l'ARNr 5S. La caractérisation des déterminants moléculaires de cette interaction est cruciale, puisque cette interaction semble guider la particule vers son intégration dans le ribosome. De plus, inhiber cette interaction favoriserait l'accumulation de particule 5S libre dans le nucléoplasme, susceptible d'interagir avec MDM2 pour stabiliser p53. Ces recherches s'inscrivent alors dans un cadre plus large, qui est de participer au développement de nouvelles drogues anti-tumorales. Afin de caractériser les détails moléculaires de l'interaction entre le complexe Rpf2/Rrs1 et l'ARNr 5S, j'ai entrepris une étude structurale par cristallographie aux rayons X, qui est décrite dans la deuxième partie des résultats.

Plus récemment, j'ai étudié le rôle du complexe Rpf2/Rrs1 dans la régulation de la transcription par l'ARN polymérase I. Ce travail est effectué en collaboration avec l'équipe d'Antony Henras au LBME de Toulouse. Leurs travaux montrent que la déplétion de Rpf2 et de Rrs1 affecte la synthèse des ARNr. Ce complexe d'assemblage aurait alors un rôle direct dans la stimulation de la transcription, en contactant directement l'ARN polymérase I. Afin de caractériser ce mécanisme, j'ai mis en place au laboratoire différents tests d'association entre le dimère Rpf2/Rrs1 et la polymérase. Ce travail est décrit dans la troisième partie des résultats.

# RÉSULTATS

---



# Chapitre I : Étude structurale et fonctionnelle du dimère Rpf2/Rrs1

---

Les protéines Rpf2 et Rrs1 sont requises pour la maturation de la sous-unité pré-60S, en permettant le recrutement de la particule 5S. La structure du complexe Rpf2/Rrs1 et son rôle précis dans la biogenèse du ribosome n'étaient pas connus au début de ma thèse. Afin de mieux appréhender la fonction du dimère Rpf2/Rrs1 dans la maturation des pré-ribosomes, nous avons entrepris une étude structurale par cristallographie aux rayons X de ce complexe.

Je présenterai dans la première partie de ce chapitre les étapes de production, de purification et de cristallisation du complexe Rpf2/Rrs1. Je détaillerai ensuite les différentes étapes de traitement des données de cristallographie qui m'ont permis de résoudre la structure de ces deux protéines.

Dans la seconde partie de ce chapitre, Je présenterai les résultats qui nous ont permis de mieux appréhender le rôle du dimère Rpf2/Rrs1 dans l'assemblage de l'ARNr 5S au sein de la grande sous-unité. Ce travail a été publié en 2015 dans l'article « Chaperoning 5S RNA assembly » présent à la fin de ce chapitre.

## I. Production, purification et cristallisation du complexe Rpf2/Rrs1

### 1. Production et purification du complexe Rpf2/Rrs1

Afin de réaliser une étude structurale à haute résolution du complexe Rpf2/Rrs1 par cristallographie aux rayons X, il est important de disposer d'une solution de protéines concentrée (typiquement de l'ordre de 10 mg/mL) et à haut degré de pureté. Pour ce faire, les ADN codants Rpf2 et Rrs1 de *S. cerevisiae* ont été clonés dans un plasmide d'expression bactérien polycistronique où seul Rpf2 est étiqueté par une étiquette poly-Histidine. Ces protéines ont été exprimées dans une souche Rosetta 2 DE3 d'*E.coli*, et purifiées par une chromatographie d'affinité suivie d'une chromatographie d'exclusion stérique (**Figure 21**).

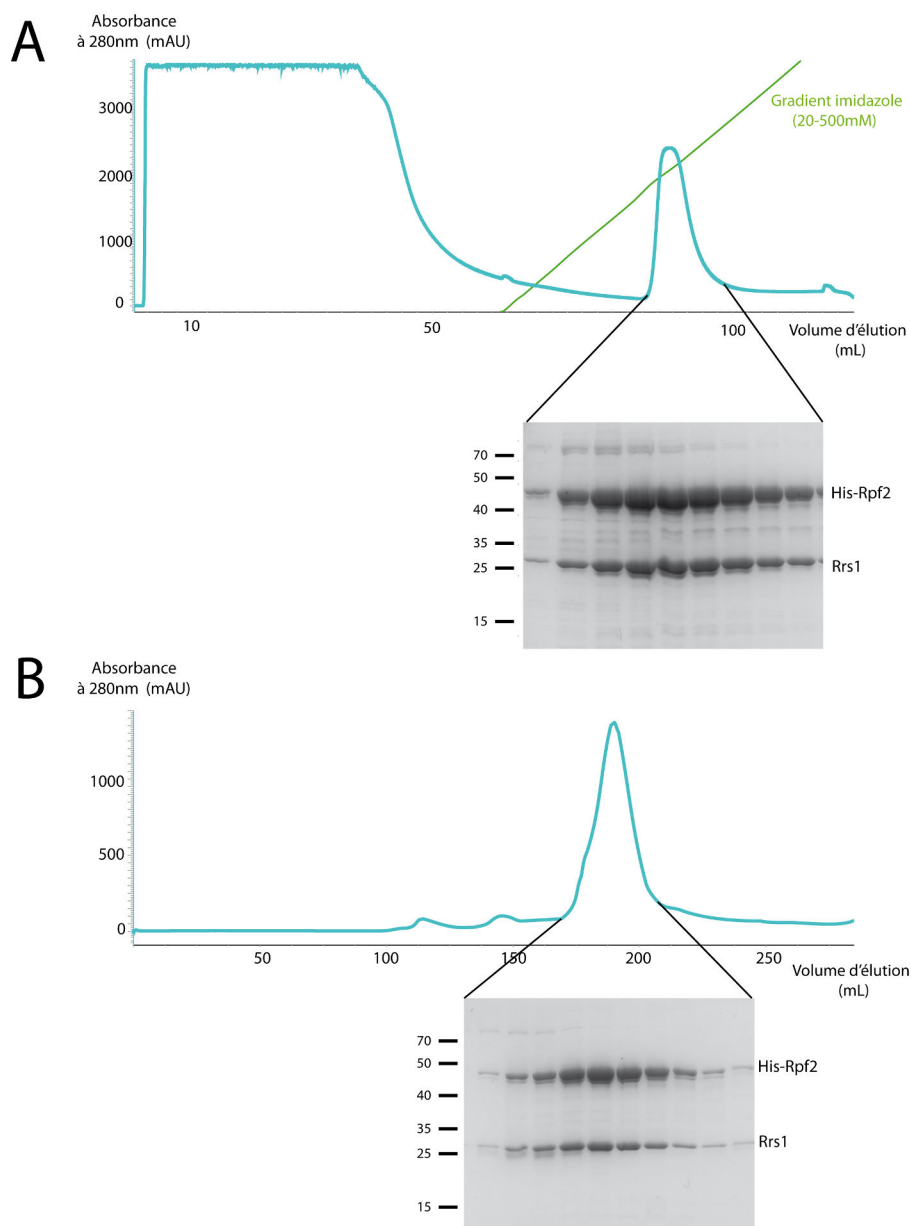
La chromatographie d'affinité de type His-Trap est réalisée sur système HPLC AktaPure (voir Matériels et Méthodes). L'analyse conjointe des fractions déposées sur SDS-PAGE et du profil d'élution montre que les protéines Rpf2 et Rrs1 sont toutes deux retenues sur la résine Ni-NTA et éluées ensemble lors du gradient d'imidazole. Ces résultats confirment les données de la littérature, indiquant que les protéines Rpf2 et Rrs1 sont capables de s'associer *in vitro*. La quantification de l'intensité des bandes de l'analyse SDS-PAGE semble indiquer que la stoechiométrie du complexe est équimolaire. Une chromatographie d'exclusion est ensuite réalisée sur une colonne Superdex200 26/60 préalablement calibrée afin de pouvoir déterminer le poids moléculaire à partir du volume d'élution. Le chromatogramme (DO à 280nm fonction du volume d'élution) ne montre qu'un seul pic, qui correspond au complexe Rpf2/Rrs1. Étonnamment, ce volume d'élution correspond à un poids moléculaire apparent de 170 kDa, soit 2,6 fois le poids du complexe Rpf2/Rrs1 (63 kDa), ce qui pourrait correspondre à un dimère ou un trimère du complexe. Le dosage par spectrométrie UV permet de calculer que, pour un litre de culture bactérienne, environ 8mg de complexes ont été purifiés.

Durant ma thèse j'ai également tenté de purifier ces deux protéines séparément (données non présentées). Les protéines purifiées sont instables et sujettes à la dégradation dans ces conditions de tampon, quelle que soit l'étiquette utilisée. L'association entre ses deux protéines semble donc être indispensable à leur stabilité *in vitro*.

### 2. Essais de cristallisation sur le complexe de protéines natives

Dans un premier temps, des essais de cristallisation du complexe Rpf2/Rrs1 ont été réalisés sur un robot de cristallisation Mosquito avec un volume de goutte de 0,2 $\mu$ L. Pour cela, cinq kits de cristallisation commerciaux permettant de tester de nombreuses conditions de cristallogénèse (96 conditions par boîte) ont été utilisés. Des baguettes cristallines sont

apparues dans deux conditions (**Figures 22A et 22B**), mais aucune diffraction n'a pu être observée lors des enregistrements sur la ligne de lumière PX1 du synchrotron SOLEIL.

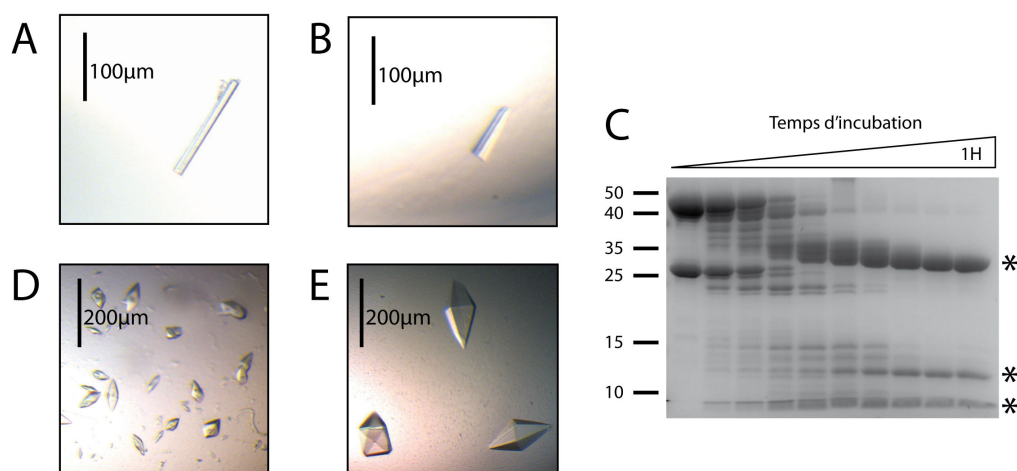


**Figure 21 : Purification du complexe Rpf2/Rrs1**

(A) Chromatogramme représentant le profil de purification du complexe Rpf2/Rrs1 par affinité (His-Trap) en fonction du gradient en imidazole (20-500mM). Les fractions collectées correspondant au pic d'absorbance sont déposées sur SDS-PAGE 12,5%.

(B) Chromatogramme représentant le profil de purification du complexe Rpf2/Rrs1 par exclusion de taille (Superdex 200). Les fractions collectées correspondant au pic d'absorbance sont déposées sur SDS-PAGE 12,5%.





**Figure 22 : Cristaux et protéolyse ménagée**

(A et B) Photographie des cristaux obtenus pour le complexe Rpf2/Rrs1 natif et (D et E) en présence de trypsine. (C) Profil de digestion du complexe Rpf2/Rrs1 en présence de Trypsine. Les bandes marquées d'une astérisque ont été identifiées en spectrométrie de masse. Les fragments de 30kDa et de 12kDa appartiennent à Rpf2, La fragment de 5 kDa appartiennent à Rrs1.

### 3. Protéolyse ménagée du complexe

Dans le but de cristalliser le complexe Rpf2/Rrs1, j'ai réalisé une expérience de protéolyse ménagée, dont le principe est de digérer avec une protéase les régions les plus flexibles du complexe, tout en préservant les régions structurées. Ce sont ces régions flexibles, généralement des boucles ou les extrémités N et C terminales qui gênent le plus la cristallisation. Après une heure d'incubation en présence de trypsine (rapport 1 : 1000 en masse), trois fragments protéiques de 30, 12 et 5 kDa sont observés sur l'analyse SDS-PAGE. Ces fragments ont été identifiés en spectrométrie de masse, et appartiennent aux deux protéines (**Figure 22C**). Ils subsistent même dans les deux jours suivant la digestion, suggérant l'existence d'un coeur structural très stable. À la vue de ce profil de protéolyse, j'ai décidé de réaliser des essais de cristallisation du complexe digéré à la trypsine. La solution de protéines a été incubée une heure en présence de trypsine (rapport 1 : 1000 en masse), puis utilisée sans étapes supplémentaires de purification pour les essais de cristallisation.

Ces essais ont débutés par un criblage robotisé de plusieurs kits de cristallisation commerciaux. Des cristaux en forme de losange ont été obtenus dans une condition (**Figure 22D**). À partir de cette condition, une dizaine de boites d'optimisation ont été réalisées en variant le pH, la concentration en précipitant et en protéine, jusqu'à obtenir de façon

reproductible de plus grands cristaux bi-pyramidaux (200 $\mu$ M) (**Figure 22E**). Les cristaux les plus grands et réguliers ont été montés sur des boucles, trempés quelques secondes dans des solutions cryoprotectrices (trois trempages successifs dans des solutions de cristallisation contenant 10, 20 et 30% d'éthylène glycol), puis congelés, pour permettre l'enregistrement des données de diffraction sur les faisceaux de rayons X des lignes de lumière du Synchrotron SOLEIL.

#### 4. Enregistrement des données au synchrotron

27 cristaux différents ont été montés sur boucles et testés lors d'une première séance d'enregistrement au synchrotron sur la ligne de lumière PX-1. La diffraction des cristaux natifs a été mesurée sur 300 images avec une oscillation de 1° durant un temps d'exposition d'une seconde.

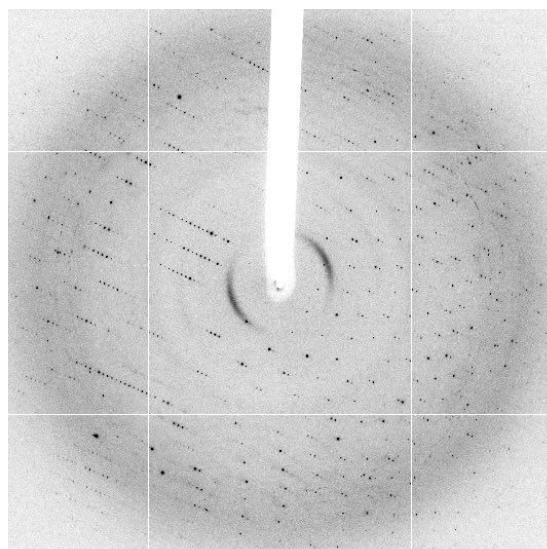
## II. Diffraction des rayons X et traitement des données

### 1. Organisation d'un cristal

Un cristal est un solide dans lequel les molécules sont ordonnées de façon périodique dans les trois dimensions de l'espace. L'unité de base du cristal est la maille élémentaire, dont la répétition par des éléments de translation forme le système cristallin. Cette maille est délimitée par un triplet de vecteurs {a, b, c}, qui définissent les paramètres de mailles : trois longueurs a, b, c, et trois angles  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . En fonction des valeurs que peuvent prendre ces six paramètres, on compte sept systèmes cristallins différents (triclinique, monoclinique, orthorhombique, tétragonal, trigonal, hexagonal, cubique). À l'intérieur de la maille, on trouve un motif (composé d'une ou plusieurs molécules), répété par des éléments de symétrie. Ces symétries s'organisent autour de points particuliers, appelés noeuds, généralement situés aux sommets de la maille. En fonction des positions possibles de ces noeuds, on compte quatre types de mailles élémentaires différentes (primitive, bases centrées, corps centré, faces centrées). En combinant les 7 systèmes cristallins, les quatre types de mailles élémentaires, et les différentes opérations de symétries retrouvées en cristallographie des protéines, on obtient 65 groupes d'espaces possibles. Les premières étapes du traitement des données de cristallographie aux rayons X visent à déterminer le système cristallin et le groupe d'espace du cristal.

## 2. Diffraction des rayons X par un cristal

Lorsque qu'un cristal de protéines est traversé par un faisceau de rayons X, le rayon incident est diffracté dans des directions particulières de l'espace. Ces rayons diffractés sont mesurés sur un détecteur, et on observe des taches de diffraction (**figure 23**).



**Figure 23 : Cliché de diffraction**

L'onde diffractée par le cristal dans une direction  $(h,k,l)$  donnée de l'espace est définie mathématiquement par le facteur de structure :

$$F_{hkl} = \iiint_{\text{maille}} \rho(x,y,z) e^{2\pi i (hx+ky+lz)} dx dy dz$$

où  $\rho(x,y,z)$  est la densité électronique du cristal. Ce facteur de structure est mathématiquement la transformée de Fourier de la densité électronique. Connaissant l'ensemble des facteurs de structures, c'est à dire l'onde diffractée dans toutes directions de l'espace, il est possible d'effectuer la transformée de Fourier inverse pour calculer la densité électronique  $\rho(x,y,z)$  de la molécule :

$$\rho(x,y,z) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} F_{hkl} e^{-2\pi i (hx+ky+lz)}$$

où  $V$  est le volume de la maille.

Le facteur de structure est un nombre complexe caractérisé par son amplitude et sa phase. Cependant, la mesure lors de l'expérience de diffraction nous donne accès uniquement à

l'intensité des taches sur le détecteur, qui est proportionnelle au carré de l'amplitude de ces facteurs de structure. L'information de phase est perdue. Pour retrouver cette information, il existe plusieurs méthodes dites de phasage, que l'on détaillera plus tard.

### 3. Traitement des données

La mesure de la position des tâches sur le détecteur permet de déterminer les paramètres de mailles et le système cristallin. La mesure de l'intensité des taches permet de caractériser le motif à l'intérieur du cristal ainsi que le groupe d'espace.

#### a. Détermination de la maille et du groupe d'espace

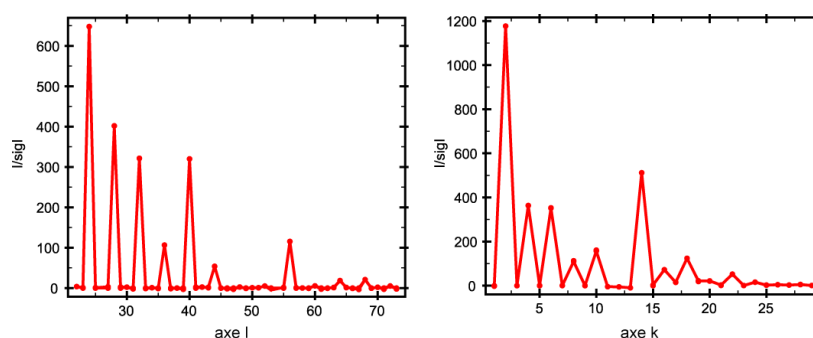
Cette étape appelée indexation a été réalisée à l'aide du programme MOSFLM (Battye et al 2011) et uniquement à partir de quelques clichés. Le programme MOSFLM détermine plusieurs possibilités de systèmes cristallins et de paramètres de maille compatibles avec la position des tâches de diffraction. Ces solutions sont classées en fonction d'une pénalité qui tient compte de la déformation que doit subir la maille prédite pour satisfaire les contraintes géométriques du système cristallin. Le plus souvent, la solution correcte doit conduire au système cristallin de plus haute symétrie. La liste des systèmes cristallins proposée par le programme MOSFLM, les paramètres de mailles, ainsi que les pénalités associées à chaque solution pour le jeu de données natif sont représentés dans le **tableau 1**.

Réseau	Pénalité	Paramètres de maille (Å)						Groupes d'espaces
		a	b	c	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	
Triclinique Primitif	0	72.1	72.2	175.4	90.1	90.0	90.1	P1
Monoclinique à bases centrées	1	102.0	102.0	175.4	90.0	90.0	90.0	C2
Orthorhombique à bases centrées	1	102.0	102.0	175.4	90.0	90.0	90.0	C222 C2221
Monoclinique Primitif	1	72.2	72.1	175.4	89.9	90.2	90.0	P2 P21
Orthorhombique à bases centrées	1	72.1	72.3	175.4	90.0	90.0	90.0	P222 P2221 P2122 P2212 P21212 P22121 P21221 P212121
Monoclinique Primitif	2	72.2	72.3	175.4	90.0	90.0	90.0	P2 ; P21
Monoclinique à bases centrées	3	102.1	102.0	175.4	90.0	90.0	90.0	C2
Tétragonal Primitif	3	72.2	72.2	175.7	90.0	90.0	90.0	P4 P41 P42 P43 P422 P4212 P4122 P41212 P4222 P42212 P4322 P43212
Monoclinique à bases centrées	111	357	72.1	72.1	90.1	90.0	90.0	C2

**Tableau 1: Indexation du jeu de données du complexe Rpf2/Rrs1**

Les résultats de l'indexation des tâches pour un des cristaux obtenus sont classés en fonction du score de pénalité. Le réseau choisi est représenté en bleu.

Ainsi, j'ai pu déterminer que les cristaux natifs du complexe Rpf2/Rrs1 sont constitués d'un réseau tétragonal primitif, avec des paramètres de maille  $a=b=72,28\text{\AA}$ ,  $c=175,71\text{\AA}$  et  $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ . Pour un seul système cristallin, il existe plusieurs groupes d'espace possibles. Le choix du groupe d'espace est ensuite guidé par la valeur d'un facteur appelé  $R_{\text{Sym}}$ , et la présence d'extinctions systématiques le long des axes de l'espace réciproque. Ces extinctions reflètent la présence d'axes hélicoïdaux dans la maille. Les extinctions systématiques présentes sur l'axe  $l$  (1 tache sur 4) prouvent l'existence d'un axe hélicoïdal d'ordre 4. De même, les extinctions systématiques (1 tache sur 2) le long de l'axe  $k$  sont caractéristiques d'un axe hélicoïdal d'ordre 2 (**figure 24**). La détermination du groupe d'espace est ainsi facilitée par ces données, mais il est impossible ici de trancher entre les deux groupes d'espace énantiomorphes  $P4_3 2_1 2$  et  $P4_1 2_1 2$ , qui contiennent tous les deux ce type d'axe.



**Figure 24: Extinctions systématiques sur les axes  $k$  et  $l$**

Ces graphiques représentent les valeurs de  $I/\Sigma$  en fonction des axes  $k$  et  $l$

### b. Intégration des données

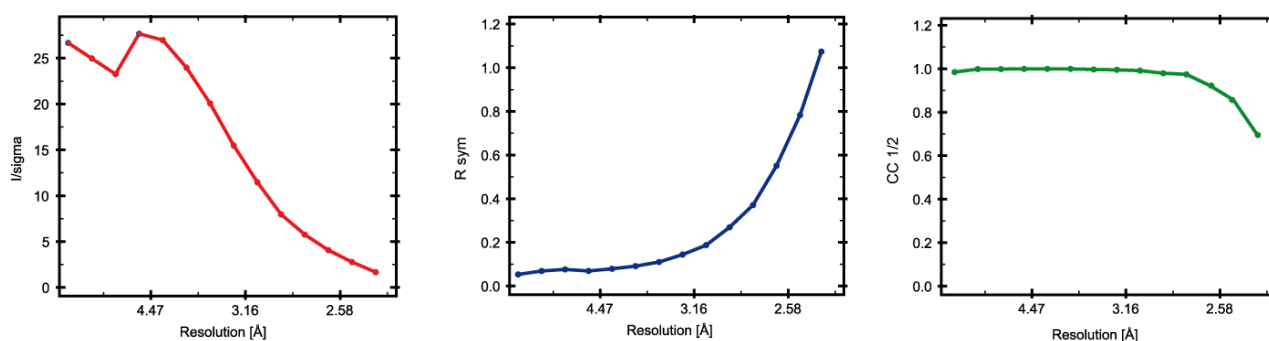
En fonction du groupe d'espace choisi précédemment, les positions des tâches de diffraction sont prédites, l'intensité des tâches est mesurée, et un triplet de coordonnées  $h$ ,  $k$  et  $l$  leur est attribué.

### c. Mise à l'échelle, moyennation et conversion des intensités

Ces étapes seront réalisées séquentiellement avec le programme Scala de la suite CCP4 (Winn et al, 2011). Au fur et à mesure de l'exposition aux rayons X, les dommages dus à l'irradiation causent une diminution du pouvoir diffractant du cristal. Ainsi, l'intensité des réflexions mesurées décroît au cours du temps. Il est donc important de remettre à l'échelle ces intensités pour obtenir un jeu de données complet. À cette étape, les intensités équivalentes par symétrie qui ont été mesurées plusieurs fois sont moyennées. Le facteur  $R_{\text{SYM}}$  permet d'évaluer la différence entre ces réflexions équivalentes (plus ce facteur est élevé, plus l'écart d'intensité entre les tâches équivalentes est grand).

Enfin, ces intensités moyennées vont être converties en amplitudes par le programme TRUNCATE (French et Wilson, 1978). C'est également durant cette étape que le jeu de données est « coupé » à une résolution donnée. Cela peut être fait en fonction de différents critères, comme la valeur du rapport  $I/\sigma$  (qui doit être supérieure à 2), ou celle du coefficient de corrélation CC1/2 (qui doit être supérieure à 0,6) (Karplus et al. 2012).

Dans le cas présent, nous avons enregistré le jeu de données natif avec une distance cristal-détecteur permettant la collecte à une résolution maximale de 2,4 Å. Dans cette dernière tranche de résolution, le rapport  $I/\sigma$  est de 1,9 et le CC1/2 vaut 0,68. Ces valeurs sont acceptables, j'ai donc choisi d'utiliser les données sur l'ensemble du détecteur. Les statistiques obtenues lors de la mise à l'échelle sont montrées dans la **figure 25**.



**Figure 25 : Statistiques de mise à l'échelle du jeu natif**

Ces graphiques représentent les valeurs de  $I/\text{Sigma}$  (en rouge), de  $R_{\text{SYM}}$  (en bleu) et de CC1/2 (en vert) en fonction de la résolution

#### d. Contenu de l'unité asymétrique

L'unité asymétrique est le plus petit volume à l'intérieur de la maille à partir duquel l'ensemble du cristal peut être reconstitué en appliquant les éléments de symétrie du groupe d'espace. Elle peut contenir plusieurs molécules, qui ne sont donc pas reliées par des opérations de symétrie cristallographique. Il est possible d'en estimer le nombre par le calcul du coefficient de Matthews  $V_M$  dont la formule est exprimée ci-dessous.

$$V_M = \frac{V}{MZ}$$

$V$  est le volume de la maille,  
 $M$  la masse moléculaire de la protéine, et  
 $Z$  le nombre d'unités asymétriques dans la maille

Ce coefficient doit être compris entre 1.6 et 4 Å<sup>3</sup>/Da, ce qui correspond à des fractions de solvant comprises entre 30 et 75% du volume de la maille. Dans le cas présent, les coefficients de Matthews ont été calculés en utilisant comme masse moléculaire la somme de

l'ensemble des masses moléculaires des trois fragments identifiés après la protéolyse ménagée (environ 47 kDa). Si l'on considère que l'unité asymétrique contient une seule molécule, le coefficient de Matthews prend la valeur de  $2.42 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ , ce qui correspond à une fraction de solvant de 49%. Pour le même calcul effectué avec deux molécules dans l'unité asymétrique, le coefficient de Matthews prends alors une valeur inférieure à  $1.6 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ . L'unité asymétrique contient donc une seule molécule.

### III. Phasage et construction du modèle

Le principal problème de la résolution d'une structure cristallographique vient de l'incapacité à mesurer expérimentalement la phase des ondes diffractées par le cristal. En effet, les détecteurs mesurent uniquement les intensités des faisceaux diffractés, et les phases sont perdues lors de la mesure. Or, pour recalculer la densité électronique diffractante, il est indispensable de connaître ces deux informations. Dans le but de résoudre la structure du complexe Rpf2/Rrs1, j'ai utilisé deux techniques de phasage différentes : une méthode mathématique, appelée remplacement moléculaire, qui utilise les phases d'un modèle homologue dont la structure est connue, et des méthodes de détermination expérimentales des phases.

#### 1. Remplacement moléculaire

Une estimation des phases peut être obtenue par la méthode du remplacement moléculaire qui consiste à utiliser des phases calculées à partir d'un modèle dont la structure tridimensionnelle est proche. Dans notre cas, la structure du complexe Rpf2/Rrs1 n'est connue chez aucun organisme. Cependant, la structure d'une autre protéine à domaine BRIX a été résolue en 2005 (Ng et al. 2005). Il s'agit de la protéine d'Archaea Mth680 (Imp4 chez la levure). Aucune solution n'a été trouvée en utilisant ce modèle en remplacement moléculaire. Nous avons plus tard compris que ce modèle n'était pas assez complet pour fournir une estimation correcte des phases (RMSD de  $3 \text{ \AA}$  sur 55% du modèle final).

#### 2. Phasage expérimental

Les techniques de phasage expérimentales utilisent les propriétés particulières de diffraction de certains atomes. Il existe deux grandes catégories de méthodes de phasage expérimentales : (i) le remplacement isomorphe qui exploite les propriétés de diffraction plus importantes de ces atomes et (ii) la diffusion anormale, qui tire partie de la diffusion des rayons X

par ces atomes. Dans mon cas, j'ai résolu la structure du complexe Rpf2/Rrs1 en utilisant une méthode de phasage hybride, qui combine le remplacement isomorphe et la diffusion anormale. J'expliquerai donc ici brièvement les différents principes de ces deux méthodes.

### a. Le remplacement isomorphe (SIR)

Les atomes lourds possèdent un nombre d'électron sensiblement plus grand que celui des atomes contenus dans les biomolécules. L'intensité des rayons diffractés par une protéine contenant des atomes lourds diffère donc de celle correspondant aux protéines natives. Ces différences dispersives entre cristaux natifs (sans atomes lourds) et dérivés (avec atomes lourds) sont utilisées dans la méthode SIR (*Single isomorphous Replacement*) pour déterminer les phases des ondes diffractées par le cristal.

Pour utiliser cette méthode, les cristaux natifs et dérivés doivent être isomorphes : c'est à dire que les paramètres de maille et l'orientation des molécules dans le cristal doivent être identiques. L'incorporation des atomes lourds ne doit donc pas modifier l'empilement cristallin. Cette condition d'isomorphisme se traduit par l'égalité vectorielle suivante pour chacun des facteurs de structure:

$$\mathbf{F}_{PH} = \mathbf{F}_P + \mathbf{F}_H$$

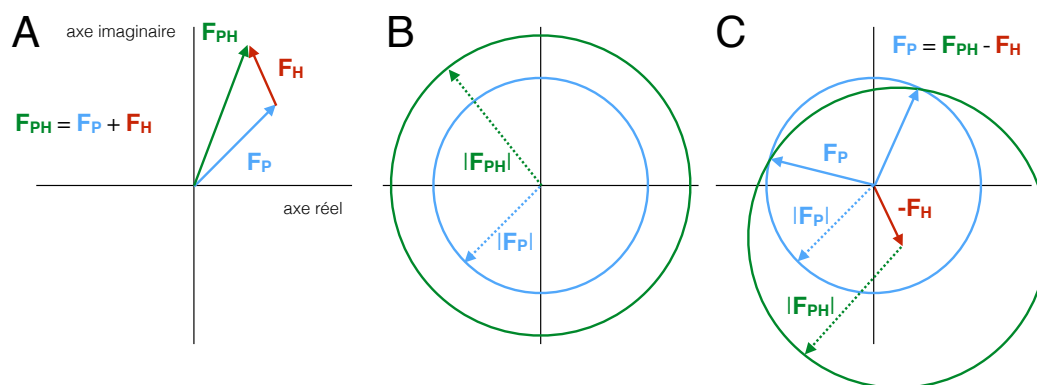
où  $\mathbf{F}_{PH}$ ,  $\mathbf{F}_P$  et  $\mathbf{F}_H$  représentent respectivement le facteur de structure du cristal dérivé, celui du cristal natif, et celui de l'atome lourd pour une même réflexion. Ces facteurs de structures peuvent être représentés par des vecteurs, caractérisés par des modules (amplitudes) et des phases (**Figure 26A**).

La mesure de l'intensité des taches de diffraction pour les cristaux natifs et dérivés permettent de calculer l'amplitude des facteurs de structure  $|\mathbf{F}_P|$  et  $|\mathbf{F}_{PH}|$ . À partir de ces deux modules, on peut calculer la position des atomes lourds dans la maille, et donc calculer le vecteur  $\mathbf{F}_H$ . En connaissant ces 3 éléments, il est alors possible de déterminer la phase de  $\mathbf{F}_P$  à l'aide d'une construction géométrique appelée construction de Harker (**Figures 26B et 26C**). En utilisant cette technique, il existe deux solutions possibles, et donc une erreur sur la phase déterminée.

### b. La diffusion anormale (SAD)

Lorsque la longueur d'onde des rayons X utilisée pendant la collecte est proche de celle du seuil d'absorption des atomes lourds présents dans le cristal, une partie des photons est absorbée. Les facteurs de diffusion atomique sont alors modifiés. La loi de Friedel, qui relie normalement les réflexions symétriques (paires de Bijvoet) n'est alors plus respectée :  $\mathbf{F}(\mathbf{h} \mathbf{k} \mathbf{l}) \neq \mathbf{F}(-\mathbf{h} -\mathbf{k} -\mathbf{l})$  (**figure 27A**). Ces paires de réflexions seront séparées lors de la mise à l'échelle et traitées comme des réflexions indépendantes.





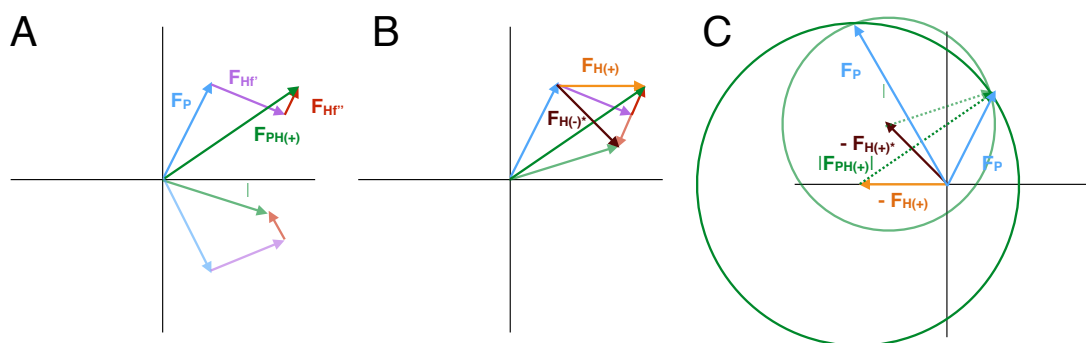
**Figure 26 : Construction de Harker pour le remplacement isomorphe**

(A) Représentation vectorielle de la condition d'isomorphisme. (B) La mesure de l'intensité des taches de diffraction permet de déterminer les modules des facteurs de structure  $|F_P|$  et  $|F_{PH}|$ . Cependant, la phase de ces facteurs de structure est inconnue. En d'autres termes, les directions vers lesquelles pointent les vecteurs  $F_P$  et  $F_{PH}$  ne sont pas connues. (C) Afin de déterminer la phase du vecteur  $F_P$ , deux cercles différents sont tracés : (1) un cercle centré en 0 de rayon égal au module de  $F_P$  et (2) un cercle centré à l'extrémité du vecteur  $-F_H$  (obtenu après la détermination de la sous-structure des atomes lourds) et de rayon égal au module de  $F_{PH}$ . Les deux cercles se coupent en deux points déterminant ainsi deux phases possibles pour le vecteur  $F_P$ .

D'une manière analogue à celle utilisée en SIR, on peut déterminer la sous-structure des atomes lourds en utilisant les différences entre les amplitudes des facteurs de structure  $|F(+)|$  et  $|F(-)|$  d'une paire de Bijvoet. Il est alors possible de déterminer la phase en utilisant la construction de Harker. (**figure 27B et 27C**). De la même façon qu'en SIR, il existe deux solutions : là encore, il y aura une erreur sur la phase déterminée. Cette méthode de phasage est appelée SAD (pour *Single wavelength Anomalous Dispersion*). Ici, le problème d'isomorphisme rencontré en SIR est évité, puisqu'un seul cristal est utilisé pour la collecte des données.

### c. Le SIRAS

Le SIRAS (Single Isomorphous Replacement with Anomalous Scattering) est une méthode de phasage qui combine le SIR et le SAD. Cette technique utilise deux sources orthogonales d'information pour le calcul des phases : la mesure des différences dispersives (SIR) et des différences anormales (SAD). En combinant ces deux informations, les erreurs sur la détermination de la phase sont réduites. C'est la méthode de phasage que j'ai utilisé pour déterminer la sous-structure des atomes de platine dans la maille des cristaux du complexe Rpf2/Rrs1.



**Figure 27 : Construction de Harker pour la diffusion anormale**

(A) Comme pour le remplacement isomorphe, les facteurs de structure du cristal natif  $F_P$ , et des atomes lourds  $F_H$  s'additionnent pour donner les facteurs de structure du cristal dérivé  $F_{PH}$ . La contribution de l'atome lourd à la diffraction peut être décomposée en 2 : une composante dispersive  $F_{Hf'}$  (similaire à celle du SIR) et une composante anormale  $F_{Hf''}$  perpendiculaire à  $F_{Hf'}$  et toujours positive. À cause de cette composante anormale, la loi de Friedel n'est plus respectée ( $F_{PH(+)} \neq F_{PH(-)}$ ). (B) On peut calculer la sous-structure des atomes lourds en utilisant les différences entre les amplitudes des facteurs de structure  $|F_{PH(+)}|$  et  $|F_{PH(-)}|$  d'une paire de Bijvoet et ainsi déterminer les vecteurs  $F_{H(+)}$  et  $F_{H(-)}$ . (C) De la même manière qu'en SIR, deux cercles différents sont tracés : (1) un cercle centré à l'extrémité du vecteur  $F_{H(+)}$  et de rayon  $|F_{PH(+)}|$ , et (2) un cercle centré à l'extrémité du vecteur  $F_{H(-)}$  et de rayon  $|F_{PH(-)}|$ . Les deux cercles se coupent en deux points déterminant ainsi deux phases possibles pour le vecteur  $F_P$ .

### 3. Phasage de la structure du complexe Rpf2/Rrs1

Afin de résoudre le problème des phases, plusieurs cristaux ont été trempés pendant 30 minutes dans des solutions de cristallisation contenant des sels de métaux lourds à une concentration de 1 mM. Ces cristaux ont ensuite été cryoprotégés de la même façon que les cristaux natifs. Pour cette étude, trois solutions de sels de métaux lourds ont été utilisées : le tetrachloroplatinate(II) de potassium ( $K_2PtCl_4$ ), l'héxachloroplatinate(II) de potassium ( $K_2PtCl_6$ ) et le tungstate de sodium ( $Na_2WO_4$ ). Les cristaux trempés dans la solution de tungstate de sodium ont fondu et n'ont pas pu être testés

#### a. Traitement des jeux de données de cristaux dérivés

La diffraction des cristaux trempés dans les solutions de  $K_2PtCl_4$  et  $K_2PtCl_6$  a été mesurée sur 200 images, avec une oscillation de  $1^\circ$  et un temps d'exposition d'une seconde par image. La collecte des jeux de données a été réalisée à une longueur d'onde unique,

correspondant au seuil d'absorption du platine (1,0716 Å). Les jeux de données obtenus ont été indexés de la même façon que le jeu natif. Dans les deux cas, la structure cristalline est caractérisée par un groupe d'espace identique à celui des cristaux natifs ( $P4_3 2_1 2$  ou  $P4_1 2_1 2$ ), mais avec des paramètres de maille légèrement différents (**Tableau 2**).

	Paramètres de maille (Å) et (°)					
	a	b	c	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
<b>JEU Natif</b>	72,28	72,28	175,71	90	90	90
<b>JEU K<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub></b>	71,58	71,58	174,35	90	90	90
<b>JEU K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub></b>	71,33	71,33	173,26	90	90	90

**Tableau 2 : Paramètres de maille des différents cristaux**

L'intégration des jeux de données a été réalisée en mode de diffusion anormale, où les paires de Friedel sont traitées comme des réflexions indépendantes qui ne sont pas moyennées. On peut alors calculer un score de corrélation anormale, qui mesure la corrélation entre les différences d'intensité des réflexions de Bijvoet sur l'ensemble du jeu de données. Ce score de corrélation diminue à mesure que la résolution augmente (à cause de la baisse du rapport signal/bruit), et doit être pris en compte lors du choix de la limite de résolution : la valeur de la corrélation anormale ne doit pas être inférieure à 30%. Le jeu de données K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> contient du signal anomal. Néanmoins, la corrélation anormale chute drastiquement (en dessous du seuil de 30%) pour des résolutions inférieures à 4,5Å. Concernant le jeu K<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>, il ne contient pas de signal anomal, puisque la corrélation anormale est quasi-nulle. Il est possible que contrairement au tétrachlorure de platine, l'hexachlorure de platine ne se soit pas fixé à la protéine lors du trempage des cristaux dans la solution de métaux lourds.

Pour ces deux jeux de données, j'ai choisi de couper la résolution en tenant compte du coefficient de corrélation CC1/2, et en excluant les résolutions associées à des scores inférieurs à 60%. Ainsi, le jeu K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> a été coupé à une résolution de 4Å et le jeu K<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub> a été coupé à une résolution de 3,4Å. Les données de mise à l'échelle pour ces jeux de données sont détaillées respectivement dans les **figures 28 et 29**.

### b. Phasage

Dans un premier temps, j'ai utilisé la méthode SAD, en utilisant le jeu K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub> pour la recherche des phases. La localisation des sites platine a été réalisée de manière automatique à l'aide du programme autoSHARP (Vonrhein et al 2004). Ce programme alterne la recherche des atomes lourds, l'affinement de leurs positions et le calcul des phases. 3 sites platines ont ainsi été localisés et utilisés pour le calcul des phases. Une première carte de densité électronique a

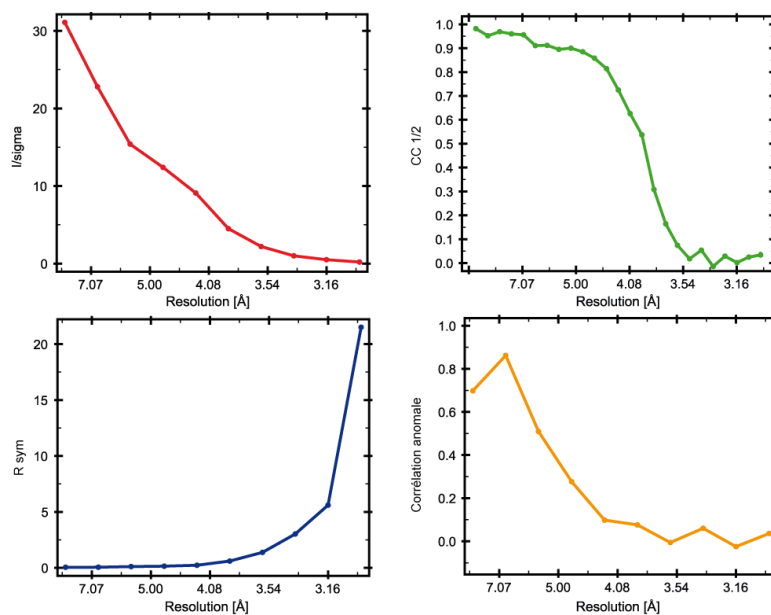


Figure 28 : Statistiques des la mise à l'échelle du jeu de données K<sub>2</sub>PtCl<sub>4</sub>

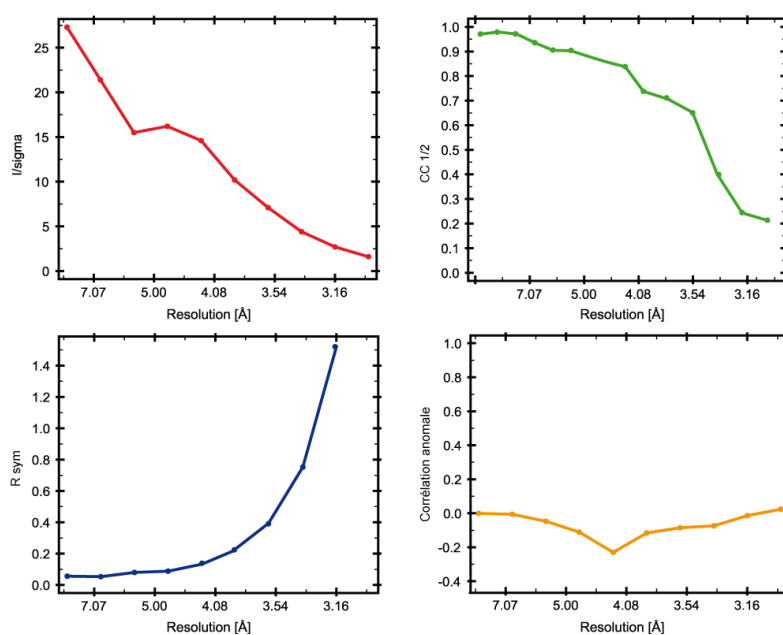


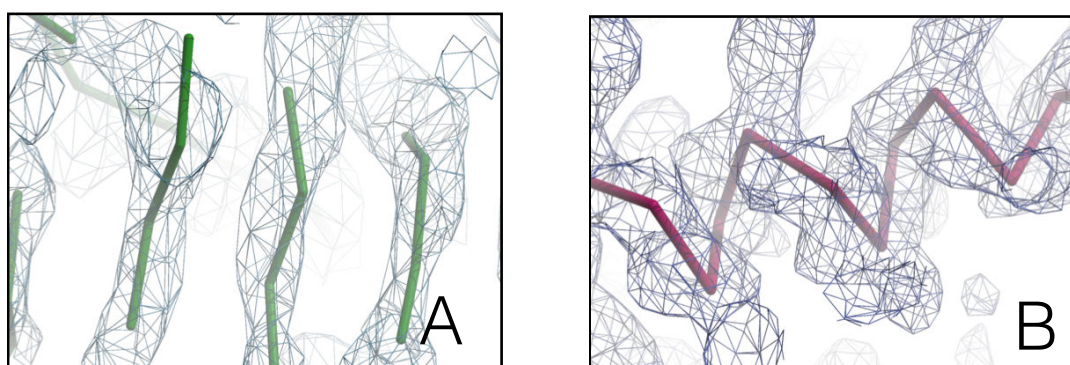
Figure 29 : Statistiques des la mise à l'échelle du jeu de données K<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>

4Å a alors été obtenue, puis améliorée à l'aide de la méthode d'aplanissement de solvant par le logiciel DM (Cowtan 2010). C'est pendant cette étape que les ambiguïtés entre les groupes d'espace énantiomorphes sont levées : le complexe Rpf2/Rrs1 a été cristallisé dans le groupe d'espace P43212. Le logiciel BUCCANEER (Cowtan et al. 2004) a ensuite été utilisé pour reconstruire un modèle dans la carte de densité électronique. Seules quelques régions du

squelette protéique ont pu ainsi être reconstruites (environ 20% du modèle) : la qualité de la carte à 4Å ne permet pas de reconstruire un modèle continu (**Figure 30A**).

Pour améliorer la qualité des cartes calculées, j'ai dans un deuxième temps voulu utiliser la méthode de phasage SIRAS avec les jeux natifs et  $K_2PtCl_4$ . Malheureusement, la condition d'isomorphisme entre ces deux jeux ne semble pas respectée. Cette différence est illustrée par le facteur  $R_{ISO}$ , calculé par le programme SCALEIT (Howell et Smith, 1992) au moment de la mise à l'échelle et la moyennation de plusieurs jeux de données. Ce facteur mesure à la manière du  $R_{SYM}$ , l'écart entre des réflexions équivalentes de plusieurs jeux de données différents, et doit être idéalement inférieur à 0,2. Dans notre cas, ce facteur vaut 0,55. Le remplacement isomorphe ne peut donc pas être utilisé entre les jeux natif et  $K_2PtCl_4$ .

J'ai donc utilisé, dans un troisième temps, le jeu  $K_2PtCl_6$ , qui ne possède pas de signal anomal comme jeu « natif » pour le phasage en SIRAS. En effet, les cristaux  $K_2PtCl_4$  et  $K_2PtCl_6$  sont isomorphes (le  $R_{ISO}$  vaut 0,22). L'information de phase supplémentaire apportée par le remplacement isomorphe a permis la localisation de six sites platines différents et le calcul d'une carte de densité électronique à 3,4Å de résolution. Le logiciel BUCCANEER a ensuite été utilisé pour la reconstruction d'un modèle complet à 90% (**Figure 30B**).



**Figure #10 : Analyse des cartes obtenues après SAD et SIRAS**

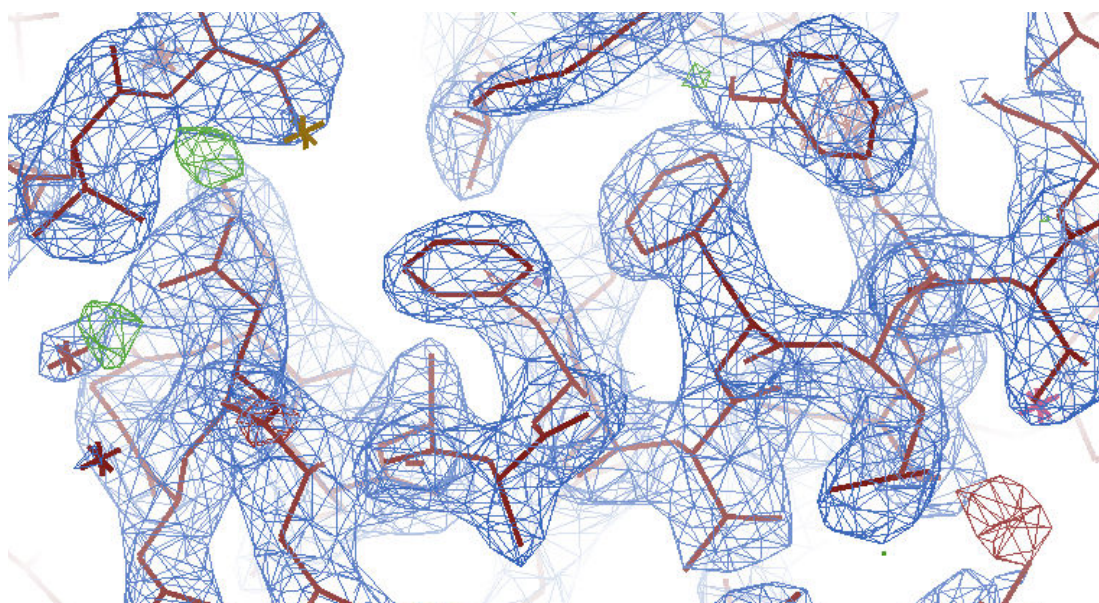
*Cartes de densités électroniques calculées avec de phases déterminées par SAD (A) et SIRAS (B). Dans la première carte, on reconnaît quelques éléments de structure secondaire (notamment des brins), mais la qualité de la carte ne permet pas de reconstruire un modèle continu. En observant la seconde carte, on distingue clairement la position des chaînes latérales des acides aminés.*

Afin d'obtenir une carte de densité électronique à plus haute résolution, j'ai ensuite utilisé ce modèle pour effectuer un remplacement moléculaire contre le jeu natif à 2,4Å. Le remplacement moléculaire a été effectué avec le programme PHASER (McCoy et al. 2007).

#### 4. Affinement du modèle

Le modèle du complexe Rpf2/Rrs1 a été affiné en utilisant le programme PHENIX.REFINE (Adams et al. 2010 ; Afonine et al. 2012). Le but de l'affinement est de minimiser l'écart entre les facteurs de structures observés et ceux calculés à partir des coordonnées x, y, z de chaque atome du modèle. Le facteur d'accord  $R_{\text{WORK}}$  permet de mesurer cet écart. Une estimation moins biaisée de la qualité du modèle peut être mesurée par le facteur  $R_{\text{FREE}}$  qui est calculé à partir d'un ensemble de réflexions choisies aléatoirement (5% des réflexions), et non incluses dans l'affinement.

Entre chaque cycle d'affinement, les cartes de densités électroniques Fo-Fc et 2Fo-Fc sont inspectées, et le modèle corrigé. Cette alternance entre reconstruction manuelle et affinement numérique vise à minimiser les facteurs  $R_{\text{WORK}}$  et  $R_{\text{FREE}}$ . D'autre part, certaines contraintes géométriques sont appliquées au modèle : longueur des liaisons, valeur des angles dièdres, torsions. La conformation de la chaîne principale doit correspondre à des valeurs  $\phi$  et  $\psi$  énergiquement favorables. Ces valeurs tolérées sont répertoriées dans le diagramme de Ramachandran (**Figure 31**). Une représentation d'une partie du modèle, placée dans la carte de densité électronique est montrée dans la **figure 32**. Les statistiques obtenues lors de l'affinement sont répertoriées dans le **tableau 3**.



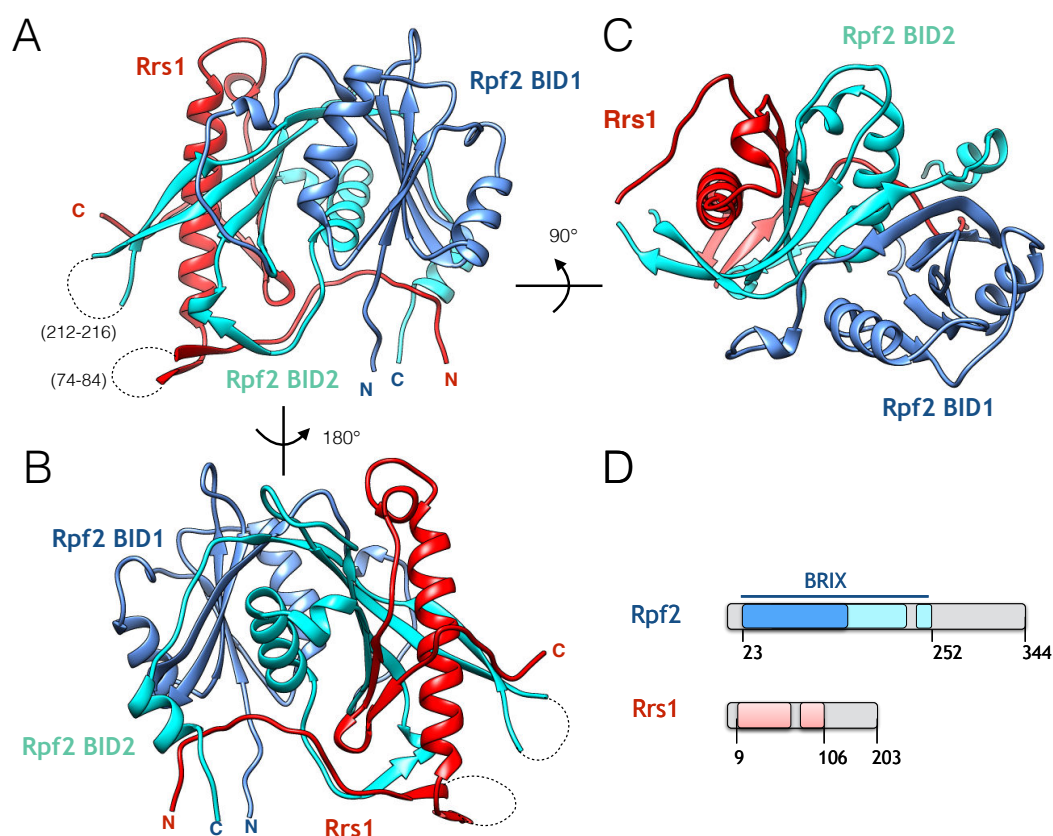
**Figure 32 : Modèle du complexe Rpf2/Rrs1 placé dans la carte de densité électronique**  
Le modèle est représenté en rouge, la carte de densité électronique 2Fo-Fc en maillage bleu, et la carte Fo-Fc en maillage rouge (pics négatifs) et vert (pics positifs). Les molécules d'eau sont représentées par des astérisques rouges.



## IV. Analyse de la structure

Le modèle final contient des fragments des deux protéines, conformément aux données de spectrométrie de masse obtenues après l'expérience de protéolyse ménagée. Le fragment de Rpf2 cristallisé (23-252) contient l'ensemble du domaine BRIX. Seule une boucle (212-216) n'a pas pu être reconstruite. Les fragments de Rrs1 cristallisés ont permis de reconstruire la moitié N-terminale de la protéine (9-106), à l'exception d'une seule boucle de 11 acides aminés (74-84). La **figure 33D** montre l'emplacement de ces fragments cristallisés dans la séquence protéique.

Le domaine BRIX de Rpf2 adopte une structure en sandwich, constituée d'une succession de couches de feuillets  $\beta$  et d'hélices  $\alpha$  (de type  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ ) (**Figure 33**). Ce domaine est homologue à celui de la protéine d'Archae Mth680 (Imp4 chez la levure) (**Figure 34**) (Ng et

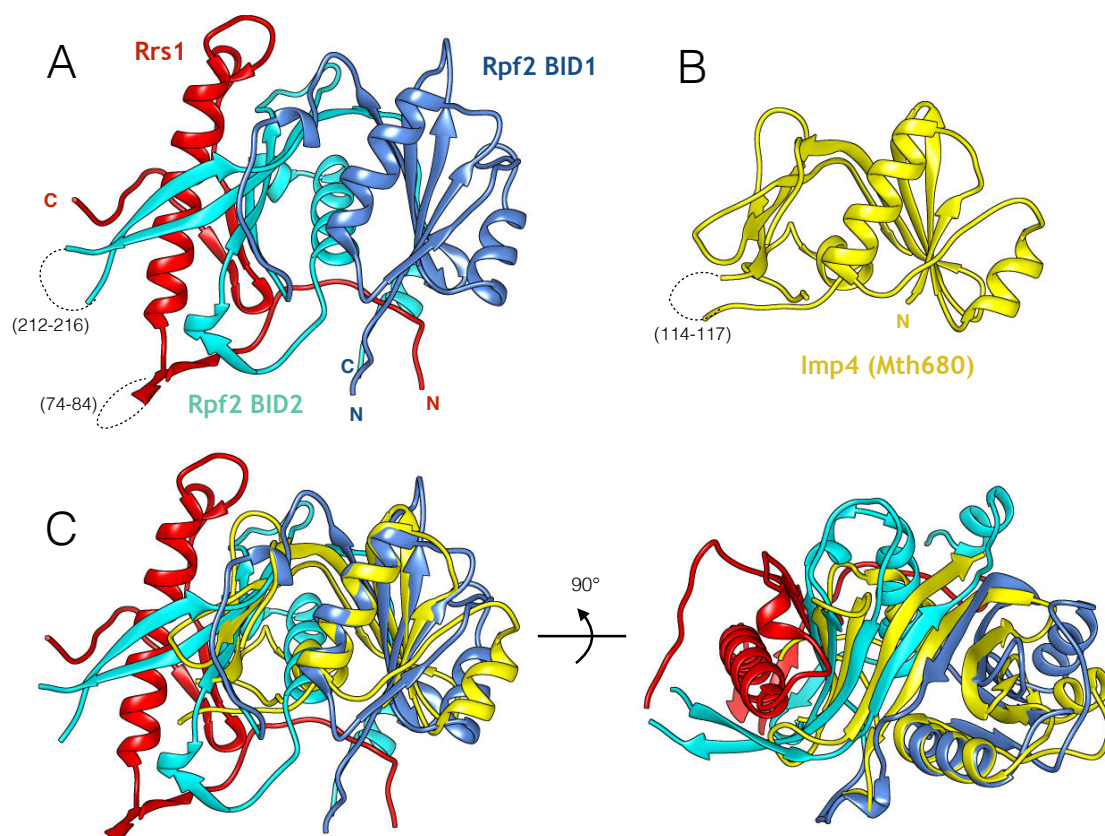


**Figure 33 :Structure cristallographique du complexe Rpf2/Rrs1 à 2.4 Å de résolution**  
(A, B, C) Structure du complexe Rpf2/Rrs1. Rpf2 est représenté en bleu clair et en bleu foncé. Les sous-domaines BID sont représentés en bleu foncé (BID1) et bleu clair (BID2). Rrs1 est représenté en rouge. (D) Représentation des fragments protéiques cristallisés par rapport aux protéines entières.



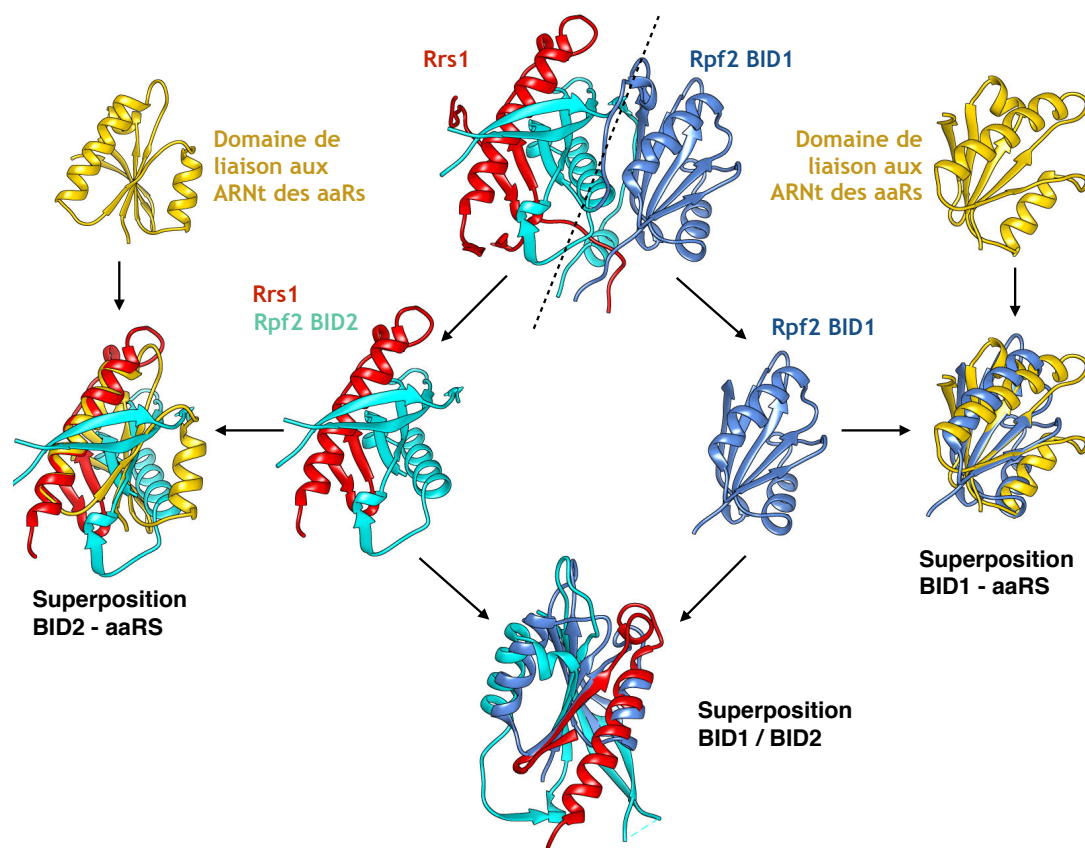
al. 2005) et contient une duplication interne de deux sous-domaines appelés BID (pour BRIX infernal duplication). Ces sous-domaines sont homologues au motif de liaison aux ARNt retrouvé chez les aminoacyl-ARNt synthétases de classe II (aaRS) (**Figure 35**). L'analyse du potentiel électrostatique de la surface du complexe Rpf2/Rrs1 révèle une zone basique, centrée sur Rpf2, et superposable à celle retrouvée chez les aaRS. Le domaine BRIX serait alors issu d'une duplication de ce motif et aurait évolué pour reconnaître d'autres ARN cibles, comme les ARNr (Ng et al. 2005).

L'analyse de la structure du complexe Rpf2/Rrs1 révèle un mode d'interaction protéine-protéine particulier, où les deux facteurs d'assemblage partagent des éléments de structure secondaire. Le second sous-domaine BID de Rpf2 est complété par des éléments structuraux de Rrs1 (deux brins  $\beta$  et une hélice  $\alpha$ ). En d'autres termes, l'hétérodimère Rpf2/Rrs1 peut être séparé en deux parties superposables (**Figure 35**). À la vue de ce mode d'interaction, il n'est



**Figure 34 : comparaison des structures d'Imp4 et de Rpf2**

Structure du complexe Rpf2/Rrs1 (A) et de IMP4 (Mth680 chez les archaee) (code PDB 1w94) (B). (C) Superposition des structures du complexe Rpf2/Rrs1 (en bleu et rouge) avec la structure de Imp4 en jaune. La superposition de ces deux structures a été réalisée sur 180 résidus avec un RMSD de 3Å.



**Figure 35 : Comparaison des sous-domaines BID1 et BID2**

Superposition des sous-domaines BID1 et BID2 avec le domaine de liaison aux ARNt des aaRS (amino-acyl ARNt synthétases) (code PDB : 1W94). Les deux sous-domaines BID ont été également superposés.

pas étonnant d'avoir rencontré des problèmes d'expression et de purification des protéines séparées. Cette interaction est également stabilisatrice *in vivo*, puisque la déplétion de Rrs1 chez la levure déstabilise Rpf2 et mène à sa dégradation (Zhang et al. 2007).

## V. Étude fonctionnelle

En tenant compte des homologies structurales existantes entre le domaine BRIX et le motif de liaison aux ARNt des aaRS, et des données de la littérature qui décrivent des interactions *in vitro* entre Rpf2 et des acides nucléiques synthétiques (poly-U, poly-A et poly-G), il est possible que le domaine BRIX de Rpf2 soit impliqué directement dans la liaison de certains ARNr. Afin d'identifier les différents partenaires ARN de Rpf2 et de Rrs1 *in vivo*, une analyse par CRAC (*UV Crosslinking and Analysis of cDNA*) a été réalisée. Des souches de *S. cerevisiae*

exprimant Rpf2 ou Rrs1 étiquetées HTP (polyHistidine - Site TEV - Protéine A) ont été cultivées en milieu liquide. Ces cultures ont été irradiées aux UV, provoquant le pontage covalent entre acide-nucléiques et protéines. Les protéines Rpf2 ou Rrs1 ont ensuite été purifiées en plusieurs étapes : une purification sur bille IGG permettant de retenir spécifiquement l'étiquette protéine A, suivie d'un clivage à la TEV et d'une purification sur bille de nickel en conditions dénaturantes. Les complexes covalents Rpf2/ARN et Rrs1/ARN ainsi purifiés ont été digérés à la protéinase K pour éliminer les composants protéiques. Pour permettre leur identification, les ARN ont été partiellement digérés, ligués à des amorces universelles en 3' et 5', puis retro-transcrits en ADN complémentaire (ADNc). Ces ADNc ont été séquencés par la méthode de séquençage à haut débit Torrent. Une expérience contrôle a été réalisée dans les mêmes conditions, mais en utilisant une souche de levure où aucune protéine n'a été étiquetée. L'analyse des ARN retrouvés associés à Rrs1 n'a d'ailleurs montré aucun enrichissement particulier comparé au contrôle. Rrs1 ne semble donc pas lier d'ARN *in vivo*. En revanche, parmi les différentes séquences d'ARN retrouvées associées à Rpf2, deux types sont spécifiquement enrichis, et proviennent des ARNr 5S et 25S.

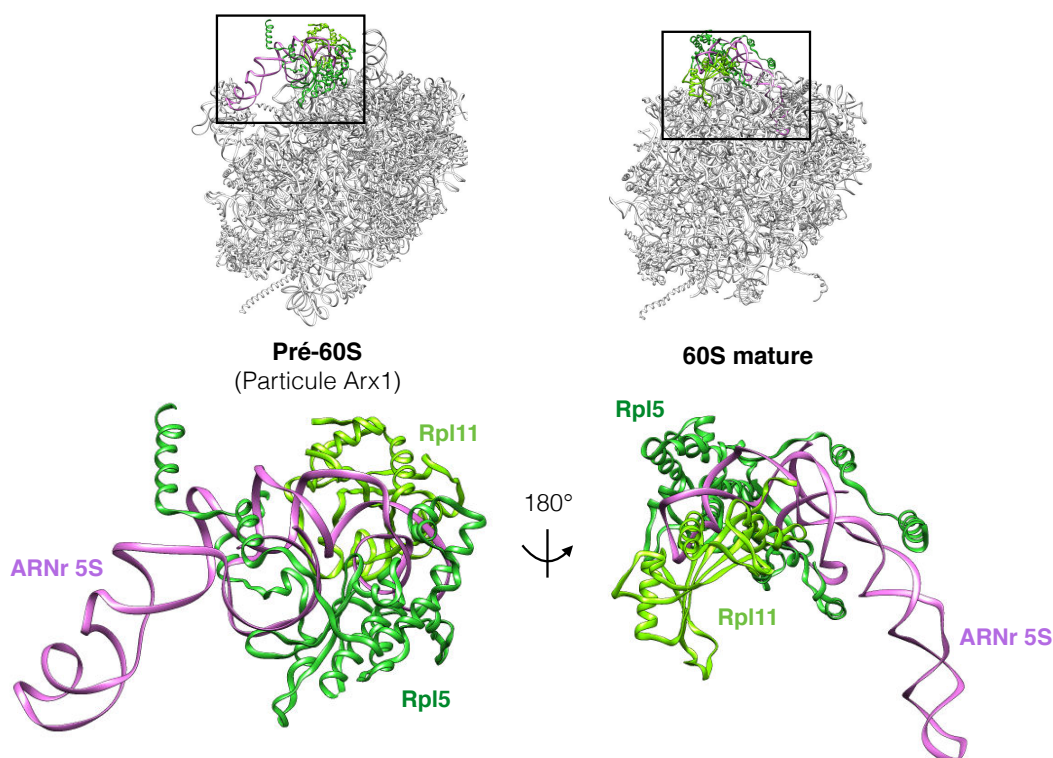
Afin de mieux caractériser l'interaction entre Rpf2 et l'ARNr 5S, des expériences de retard sur gel d'électrophorèse ont été réalisées. Elles ont montré que le complexe Rpf2/Rrs1 était capable d'interagir avec l'ARNr 5S de *S. cerevisiae* en l'absence d'autres protéines. De plus, le complexe protéolysé (dont la structure a été résolue) est également capable d'interagir avec l'ARNr 5S, suggérant que cette liaison est due au domaine BRIX de Rpf2.

Différentes expériences de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS pour *Small Angle X-ray Scattering*) ont également été réalisées. Des données enregistrées sur le dimère Rpf2/Rrs1 protéolysé, sur l'ARNr 5S, ou encore sur le complexe ARN-protéines ont permis de construire un modèle, où le dimère Rpf2/Rrs1 contacte l'ARNr 5S au niveau de la jonction des domaines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ .

Concernant l'interaction avec l'ARNr 25S, l'analyse des données de CRAC a révélé deux sites d'interaction différents pour Rpf2, au niveau des hélices 80 et 87. Dans la structure du ribosome mature, ces deux hélices ARN sont voisines, mais sont enfouies à l'intérieur de la structure de la grande sous-unité. Le fait que Rpf2 contacte directement cette région suggère donc l'existence de larges remaniements structuraux durant la maturation de la protubérance centrale.

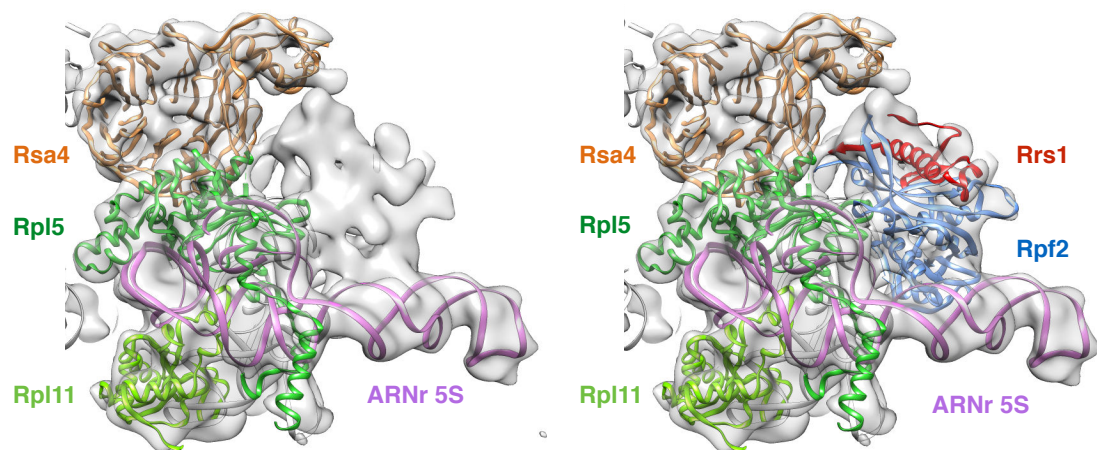
A ce moment de notre étude, l'équipe de Rolland Beckmann a publié la première structure d'une particule pré-60S résolue par cryo-microscopie électronique à une résolution inférieure au nanomètre (Leidig et al. 2014). Cette particule a été purifiée en utilisant comme proie la protéine Arx1, qui est impliquée dans la maturation tardive de la grande sous-unité, en permettant notamment l'export des sous-unités. Cette structure montre une architecture de la

protubérance centrale très différente de celle retrouvée dans les particules matures. En effet, la particule 5S est bien associée aux pré-ribosomes, mais est « tournée » de  $180^\circ$  par rapport à sa position finale (**Figure 36**). Cette structure suggère donc l'existence de larges réarrangements structuraux de la protubérance centrale pendant la maturation tardive de la grande sous-unité, où l'ARNr 5S subit une rotation de  $180^\circ$ . D'autre part, la résolution de cette structure a permis aux auteurs de positionner plusieurs facteurs d'assemblage à la surface de la sous-unité pré-60S, comme Arx1, Rsa4, Mrt4, Nog1 ou eIF6. En revanche, certaines densités électroniques n'ont pas pu être attribuées, par faute de modèle existant dans la PDB. Une de ces densités non attribuées est particulièrement intéressante, puisqu'elle contacte directement l'ARNr 5S (**Figure 37**). De plus, sa position est compatible avec le site d'interaction de Rpf2 identifié par CRAC et par SAXS. Nous avons été capables de positionner la structure du complexe Rpf2/Rrs1 à l'intérieur de cette densité (**Figure 37**). Cela nous a donc procuré un modèle du complexe Rpf2/Rrs1 associé à la particule pré-60S. Dans ce modèle, le domaine BRIX de Rpf2 contacte directement la boucle E du domaine  $\gamma$  de l'ARNr 5S. La spécificité de cette liaison a d'ailleurs été testée *in vitro* par des expériences de *filter-binding*. En revanche, ce modèle ne nous a pas permis de visualiser les contacts entre Rpf2 et les hélices 80 et 87 de l'ARNr 25S.



**Figure 36 : Rotation de la particule 5S**

Comparaison des structures de la particule pré-60S (particule Arx1) (code PDB : AV7F) et de la sous-unité 60S mature (code PDB : 5GAK).



**Figure 37 : Le complexe Rpf2/Rrs1 dans la structure de la sous unité pré-60S**

Nous avons attribué cette interaction à l'extrémité C-terminale de Rpf2, absente de la structure protéolysée. Alors que Rpf2 est plutôt engagé dans des interactions de type protéine-ARN, Rrs1 établit des contacts avec les protéines Rpl5 et Rsa4. Le complexe Rpf2/Rrs1 agirait alors comme une plate-forme d'interactions, en ancrant la particule 5S aux composants ARN et protéiques de la sous-unité pré-60S.

L'ensemble de ces données ont été publiées dans le journal *Genes & Development* en 2015, dans l'article *Chaperoning 5S assembly*.

# Chaperoning 5S RNA assembly

Clément Madru<sup>1</sup>, Simon Lebaron<sup>1</sup> Magali Blaud<sup>1</sup>, Lila Delbos<sup>1</sup>, Juliana Pipoli<sup>2</sup>, Eric Pasmant<sup>3</sup>, Stéphane Réty<sup>1</sup> et Nicolas Leulliot<sup>1</sup> .

1. Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques, UMR, CNRS 8015, Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie, Sorbonne Paris Cité, 75006 Paris, France
2. Plateforme Génomique, Institut Cochin, UMR\_S1016, INSERM, 75006 Paris, France;
3. Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 75006 Paris, France

Publié en 2015, dans le journal *Genes and development*

## ABSTRACT :

In eukaryotes, three of the four ribosomal RNAs (rRNAs)—the 5.8S, 18S, and 25S/28S rRNAs—are processed from a single pre-rRNA transcript and assembled into ribosomes. The fourth rRNA, the 5S rRNA, is transcribed by RNA polymerase III and is assembled into the 5S ribonucleoprotein particle (RNP), containing ribosomal proteins Rpl5/uL18 and Rpl11/uL5, prior to its incorporation into preribosomes. In mammals, the 5S RNP is also a central regulator of the homeostasis of the tumor suppressor p53. The nucleolar localization of the 5S RNP and its assembly into preribosomes are performed by a specialized complex composed of Rpf2 and Rrs1 in yeast or Bxdc1 and hRrs1 in humans. Here we report the structural and functional characterization of the Rpf2–Rrs1 complex alone, in complex with the 5S RNA, and within pre-60S ribosomes. We show that the Rpf2–Rrs1 complex contains a specialized 5S RNA E-loop-binding module, contacts the Rpl5 protein, and also contacts the ribosome assembly factor Rsa4 and the 25S RNA. We propose that the Rpf2–Rrs1 complex establishes a network of interactions that guide the incorporation of the 5S RNP in preribosomes in the initial conformation prior to its rotation to form the central protuberance found in the mature large ribosomal subunit.

# Chaperoning 5S RNA assembly

Clément Madru,<sup>1,5</sup> Simon Lebaron,<sup>1,2,5</sup> Magali Blaud,<sup>1</sup> Lila Delbos,<sup>1</sup> Juliana Pipoli,<sup>3</sup> Eric Pasmant,<sup>4</sup> Stéphane Réty,<sup>1</sup> and Nicolas Leulliot<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Cristallographie et RMN Biologiques, UMR, CNRS 8015, Université Paris Descartes, Faculté de Pharmacie, Sorbonne Paris Cité, 75006 Paris, France; <sup>2</sup>CR2 INSERM; <sup>3</sup>Plateforme Génomique, Institut Cochin, UMR\_S1016, INSERM, 75006 Paris, France; <sup>4</sup>Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 75006 Paris, France

**In eukaryotes, three of the four ribosomal RNAs (rRNAs)—the 5.8S, 18S, and 25S/28S rRNAs—are processed from a single pre-rRNA transcript and assembled into ribosomes. The fourth rRNA, the 5S rRNA, is transcribed by RNA polymerase III and is assembled into the 5S ribonucleoprotein particle (RNP), containing ribosomal proteins Rpl5/uL18 and Rpl11/uL5, prior to its incorporation into preribosomes. In mammals, the 5S RNP is also a central regulator of the homeostasis of the tumor suppressor p53. The nucleolar localization of the 5S RNP and its assembly into preribosomes are performed by a specialized complex composed of Rpf2 and Rrs1 in yeast or Bxdc1 and hRrs1 in humans. Here we report the structural and functional characterization of the Rpf2–Rrs1 complex alone, in complex with the 5S RNA, and within pre-60S ribosomes. We show that the Rpf2–Rrs1 complex contains a specialized 5S RNA E-loop-binding module, contacts the Rpl5 protein, and also contacts the ribosome assembly factor Rsa4 and the 25S RNA. We propose that the Rpf2–Rrs1 complex establishes a network of interactions that guide the incorporation of the 5S RNP in preribosomes in the initial conformation prior to its rotation to form the central protuberance found in the mature large ribosomal subunit.**

[*Keywords:* 5S RNP; ribosome assembly; p53; Brix domain]

Supplemental material is available for this article.

Received February 13, 2015; revised version accepted June 2, 2015.

The production of ribosomes is one of the most energy-consuming processes in eukaryotic cells. Ribosome biogenesis is a highly organized and regulated pathway that requires the sequential action of >200 nonribosomal factors (Gamalinda et al. 2014). Ribosome biogenesis starts by the transcription of a pre-rRNA precursor in the nucleolus, a specialized non-membrane-bound nuclear compartment. Three of the four ribosomal RNAs (rRNAs)—the 5.8S, 18S, and 25S rRNAs—are cotranscribed as a single 35S precursor by polymerase I. This precursor is cotranscriptionally modified, folded, cleaved, and assembled with both ribosomal proteins and nonribosomal factors to generate the mature ribosomes. During ribosome production, preribosomal particles are exported first to the nucleus and then to the cytoplasm. The final maturation step occurs in a translation-like cycle involving the pre-40S complex and the mature 60S subunit (Lebaron et al. 2012; Strunk et al. 2012). The production of ribosomes has been suggested to be a sequential series of quality control steps that block and recycle nonoptimally assembled preribosomes. Defects in the ribosome assembly pathway have been identified in a number of inherited

hematopoietic disorders, collectively called ribosomopathies, which have been linked to progression into cancer (Armistead et al. 2009; Narla and Ebert 2011; Sondalle and Baserga 2014).

In contrast to the 5.8S, 18S, and 25/28S rRNAs, the maturation of 5S RNA follows a totally different pathway before incorporation into preribosomes. The 5S rRNA is transcribed by a different polymerase (RNA polymerase III) at a locus not associated with nucleoli in metazoans or located in proximity to the nucleolus in yeast and has to be imported into the nucleolus for integration in preribosomal particles. A significant fraction of the 5S rRNA in the cell is not associated with ribosomes (Knight and Darnell 1967; Sloan et al. 2013) and has been shown to interact with several proteins (for review, see Ciganda and Williams 2011). The La protein binds immature 5S RNA containing additional uridines at the 3' terminus. The transcription factor TFIIA, which binds the 5S rDNA and activates its transcription, also binds 5S RNA to form a 7S ribonucleoprotein particle (RNP) in several organisms (for review, see Layat et al. 2013). In *Xenopus*

<sup>5</sup>These authors contributed equally to this work.

Corresponding authors: nicolas.leulliot@parisdescartes.fr, simon.lebaron@parisdescartes.fr

Article is online at <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.260349.115>.

© 2015 Madru et al. This article is distributed exclusively by Cold Spring Harbor Laboratory Press for the first six months after the full-issue publication date (see <http://genesdev.cshlp.org/site/misc/terms.xhtml>). After six months, it is available under a Creative Commons License (Attribution-NonCommercial 4.0 International), as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

oocytes, the 7S RNP is found in the cytoplasm; TFIIIA protects the RNA from degradation and “stores” the 5S RNA for later assembly into ribosomes.

The 5S rRNA associates with the Rpl5 and Rpl11 proteins (also referred to as uL18 and uL5), the main 5S rRNA-interacting proteins in mature ribosomes, prior to its incorporation into ribosomes (Steitz et al. 1988; Zhang et al. 2007; Sloan et al. 2013). Rpl5 and Rpl11 are imported and probably assembled on the 5S RNA by the specialized importin Syo1 (Calviño et al. 2015). The 5S RNP has recently been found to be a major actor in the p53–MDM2 regulation pathway in humans. MDM2 is an E3 ubiquitin ligase that ubiquitinates p53 and targets it for proteasomal degradation. The 5S RNP binds to and inhibits MDM2, resulting in the stabilization and activation of p53. This pathway regulates energy metabolism, senses nucleolar stress such as impairment of ribosome biogenesis, and is an essential control for oncogene overexpression (Donati et al. 2013; Sloan et al. 2013; Liu et al. 2014). The regulation of the 5S RNP/p53 pathway plays a major role in ribosomopathies, such as Diamond Blackfan anemia, 5q syndrome, and Treacher Collins syndrome, which are believed to be caused by the misregulation of p53. As a master regulator of the tumor suppressor p53 and ribosome biogenesis, the 5S RNP pathway is therefore a promising therapeutic target for the treatment of both cancer and ribosomopathies (Miliani de Marval and Zhang 2011; Sasaki et al. 2011).

Assembly of the 5S RNP into preribosomes requires two nonribosomal proteins: Rpf2 (Bxdc1 in humans) and Rrs1 (Zhang et al. 2007). These factors form a binary complex and interact with the 5S RNP to form the complex that is incorporated into preribosomes. Rpf2/Bxdc1 contains a Brix domain that is found in a family of proteins involved in ribosome biogenesis that includes Rpf1, Imp4, Brix1, and Ssf1/Ssf2 (Wehner and Baserga 2002). The Brix domain is predicted to be an RNA-binding motif, although no specific RNA target has been determined so far for any of the family members. The structure and function of Rrs1 are unknown. Depletion of Rpf2/Bxdc1 or Rrs1/hRrs1 leads to a processing defect of the large ribosomal subunit rRNAs, mislocalization of Rpl5/Rpl11, impairment of 5S RNP recruitment into preribosomes, and impairment of nuclear export of preribosomes (Zhang et al. 2007; Donati et al. 2013; Sloan et al. 2013). The cryo-electron microscopy (cryo-EM) structure of late pre-60S particles has shown that the central protuberance (CP), which contains the 5S RNP, is structurally very different from that found in the mature ribosome (Leidig et al. 2014). In the preribosome, the 5S RNP is docked to helix 84 in the 25S rRNA but is rotated by  $\sim 180^\circ$  relative to its position in the mature 60S complex. The conformational state of the 5S RNP in the preribosome is locked by the ribosome biogenesis factor Rsa4, which interacts with Rpl5/uL18 and the 25S rRNA. Remodeling of the CP to generate the conformation present in the mature 60S subunit and removal of Rsa4 is performed by the dynein-related AAA ATPase Rea1 (Baßler et al. 2014) and is coupled to the action of the Nug2 GTPase to generate an export-competent particle (Matsuo et al. 2014).

In this study, we set out to elucidate the function of the Rpf2–Rrs1 complex in the incorporation of the 5S RNP into preribosomes. We solved the structure of the Rpf2–Rrs1 complex alone, bound to 5S RNA, and within pre-60S particles using X-ray crystallography and small angle X-ray scattering in solution (SAXS) and fitting these structures to pre-60S cryo-EM envelopes. These structural studies, complemented by *in vivo* and *in vitro* study of RNA and protein interactions, enable us to propose a model for the function of Rpf2–Rrs1 in ribosome biogenesis.

## Results

### *Structure solution of the Rpf2–Rrs1 complex*

The full-length yeast Rpf2–Rrs1 proteins were expressed in a bacterial system using a polycistronic construct. A two-step purification procedure using nickel affinity purification (Rpf2 was expressed with an N-terminal histidine tag) followed by size exclusion chromatography yielded a sample purified to homogeneity that was suitable for structural studies (Supplemental Fig. S1). However, no crystals were obtained using the full-length Rpf2–Rrs1 proteins. This was likely due to the presence of unstructured regions in the N-terminal and C-terminal regions of both proteins. Limited trypsin proteolysis identified a stable structural core comprising both Rpf2 and Rrs1 (Supplemental Fig. S1). This sample crystallized under several of the tested conditions without any further purification. The structure was phased at 3.4 Å resolution by single isomorphous replacement with anomalous scattering using a platinum derivative and was further refined to 2.4 Å resolution in a nonisomorphous native data set. Data collection and refinement statistics are reported in Table 1.

The Rpf2 and Rrs1 proteins are present in a 1:1 complex (Fig. 1) in agreement with the elution volume from size exclusion chromatography and molecular weight derived from SAXS data (see later). The final model includes the conserved domains identified by sequence analysis for both Rpf2 and Rrs1, and the residues observed are consistent with the fragments identified by mass spectrometry analysis of the proteolyzed sample. The crystallized Rpf2 fragment is a single polypeptide chain spanning residues 23–252, with missing electron density for the  $\beta_9$ – $\beta_{10}$  loop (residues 212–216), englobing the predicted Brix domain (32–237) (Supplemental Fig. S1). The Rrs1 fragment contained residues 9–106, with missing density for the  $\beta_4$ – $\beta_5$  loop (residues 74–84) (Supplemental Fig. S1).

The Rpf2 structure shows the same overall  $\alpha$ – $\beta$ – $\alpha$ – $\beta$  sandwich fold as the archaeal Brix domain protein Mth680 (9% sequence identity) (Ng et al. 2005) and superposes with 3 Å root mean square deviation over 180 residues. As in the archaeal protein, the structure is composed of an extended U-shaped  $\beta$  sheet forming a taco shell-shaped structure (Fig. 1). This sheet forms two layers: The first  $\beta$  layer (L1) (light blue in Fig. 1) is formed by the  $\beta_2$ – $\beta_1$ – $\beta_3$ – $\beta_4$ – $\beta_5$ – $\beta_{10b}$  strands, and the second  $\beta$  layer (L2) (dark blue in Fig. 1) is formed by the  $\beta_6$ – $\beta_8$ – $\beta_9$ – $\beta_{10a}$  strands.  $\beta_{10}$  forms an extended strand that spans and



**Table 1.** X-ray diffraction statistics

	Native	PtCl6	PtCl4
Wavelength	0.934 Å	1.0716 Å	1.0716 Å
Resolution	45.51–2.40	45.51–3.40	48.72–4.01
Space group	P 43 21 2	P 43 21 2	P 43 21 2
Unit cell	72.28 Å, 72.28 Å, 175.71 Å	72.28 Å, 72.28 Å, 175.71 Å	72.28 Å, 72.28 Å, 175.71 Å
Total reflections	217,634 (20,401)	49,898 (4494)	32,462 (2861)
Unique reflections	18,921 (1811)	6270 (585)	4141 (363)
Multiplicity	11.5 (11.3)	8.0 (7.7)	7.8 (7.9)
Completeness	99.72% (97.52%)	92.83% (90.56%)	98.85% (92.84%)
Mean I/σ(I)	17.82 (1.92)	19.19 (4.01)	21.51 (4.69)
Solvent content	52.80%		
R-merge	0.098(1.09)	0.084 (0.57)	0.097 (0.60)
CC 1/2	0.999 (0.680)	0.998 (0.776)	0.999 (0.936)
CC*	1 (0.9)	0.999 (0.935)	1 (0.983)
R-work	0.19 (0.28)		
R-free	0.23 (0.35)		
RMS (bonds)	0.009		
RMS (angles)	1.17°		
Ramachandran favored	97%		
Ramachandran allowed	3%		

connects the two layers. The central  $\alpha$ -helical layer filling the taco shell is composed of the  $\alpha_1$  and  $\alpha_3$  helices inserted between the first and the second strand in each  $\beta$  layer ( $\beta_1$ – $\beta_2$  and  $\beta_6$ – $\beta_8$ ). The  $\alpha_2$  helix inserted between the  $\beta_2$ – $\beta_3$  strands packs on the outward face of  $\beta$  layer L1. No structural homologs could be identified for Rrs1.

#### *Rpf2 and Rrs1 form an intimate complex*

The Rpf2–Rrs1 complex forms an unexpected and surprising structure where the structural elements of Rrs1 extend the Rpf2  $\beta$  sheets. Rrs1 is composed of a long  $\alpha$  helix ( $\alpha_{1'}$ ) at the N terminus and four  $\beta$  strands ( $\beta_{1'}$  to  $\beta_{4'}$ ). The  $\beta_{1'}$  and  $\beta_{2'}$  strands extend the Rpf2  $\beta$  layer L2 after the Rpf2  $\beta_6$  strand (Fig. 1C). The Rrs1  $\alpha_{1'}$  helix packs on the exterior of this extended  $\beta$  layer L2 (Fig. 1B). The Rrs1  $\beta_{3'}$  and  $\beta_{4'}$  strands form an additional  $\beta$  sheet with the Rpf2  $\beta_7$  strand and pack on the C terminus of the  $\alpha_{1'}$  helix.

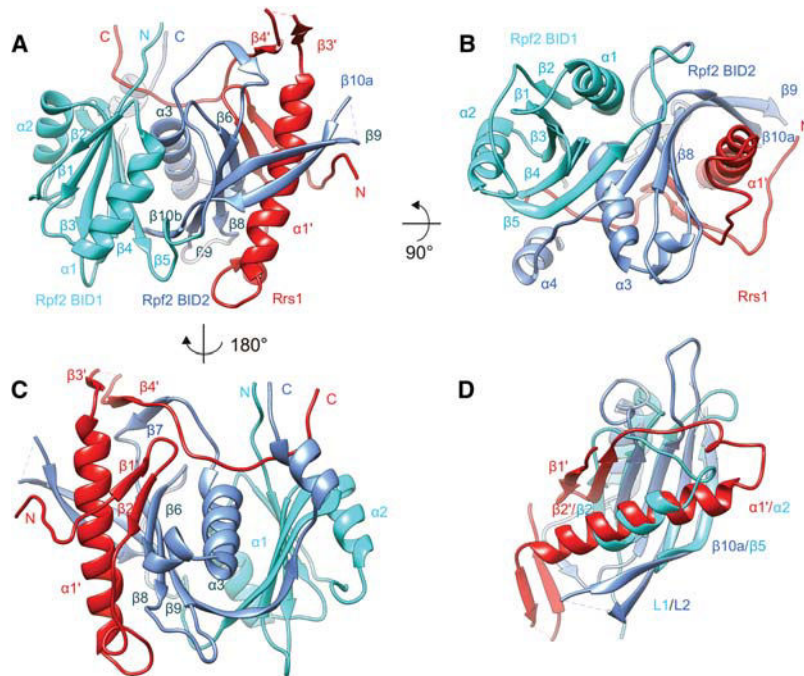
The structure of the archaeal protein Mth680 revealed that Brix domains harbor an internal duplication of an  $\alpha$ – $\beta$  layer related by a twofold symmetry, indicating that the Brix family proteins could have arisen from a gene duplication and fusion event (Ng et al. 2005). This duplicated unit, hereafter called the Brix internal duplicated (BID) domain, corresponds to the two halves of the taco shell (colored light and dark blue in Fig. 1). The BID domain is structurally homologous to the anti-codon loop-binding domain of class IIa aminoacyl-tRNA synthetases (aaRSs) (Ng et al. 2005). A remarkable feature of the Rpf2–Rrs1 complex is that Rrs1 completes the structure of the Rpf2 BID domain. Indeed, superposition of the two  $\beta$  layers reveals that the Rrs1  $\beta_{2'}$  strand in  $\beta$  layer L2 mirrors the position of Rpf2  $\beta_2$  in  $\beta$  layer L1 (i.e., the  $\beta_2$ – $\beta_1$ – $\beta_3$ – $\beta_4$ – $\beta_5$  layer superposes with the  $\beta_{2'}$ – $\beta_{6'}$ – $\beta_{8'}$ – $\beta_{9'}$ – $\beta_{10a}$  strands) (Fig. 1D). In contrast, in the Mth680 protein, the  $\beta_7$  strand completes the L2  $\beta$  layer before  $\beta_6$ , while the Rpf2  $\beta_7$  is looped out and forms the extra  $\beta$  sheet with the

Rrs1  $\beta_{3'}$  and  $\beta_{4'}$  strands (Fig. 1D). The structural change in the topology of the  $\beta$  layer L2 could be induced by Rrs1 binding.

In addition, Rrs1 extends the BID domain by providing an extra  $\alpha$ -helical layer. Superposition of the two  $\beta$  layers in Rpf2 and Mth680 shows that the  $\alpha_1$  and  $\alpha_3$  helices composing the central  $\alpha$  layer in the taco shell (Fig. 1D) are structural equivalents: They superpose in the same region and are inserted between equivalent  $\beta$  strands. However, in the CTDs of both Mth680 and Rpf2, there is no equivalent  $\alpha$  helix to  $\alpha_2$ , which packs on the exterior surface of  $\beta$  layer L1. In the Rpf2–Rrs1 complex, the Rrs1  $\alpha_{1'}$  helix packs on the exterior face of  $\beta$  layer L2 in the same position and orientation as  $\alpha_2$  (Fig. 1D). Moreover,  $\alpha_{1'}$  follows the  $\beta_{2'}$  strand in L2, equivalent to  $\beta_2$  in L1. This structural and topological analogy defines  $\alpha_{1'}$  as a structural equivalent to the  $\alpha_2$  helix and extends the duplicated BID domain to the entire  $\alpha$ – $\beta$ – $\alpha$  layer. Recently, the crystal structure of the Rpf2–Rrs1 complex from *Aspergillus nidulans* has been reported (Asano et al. 2015). Despite being from two different organisms, the structures obtained are very similar. Interestingly, the same portion of the proteins was stabilized after proteolysis treatment, and the overall structural elements are conserved.

#### *Rpf2 is a 5S rRNA-specific RNA-binding protein*

The Brix domain proteins have been suggested to bind RNA, but their cognate RNA-binding sites have not been determined. The electrostatic potential mapped to the surface of the Rpf2–Rrs1 complex shows an extended basic surface along one side of the complex, principally centered within the Rpf2 protein that encompasses the  $\alpha_1$  and  $\alpha_2$  helices; the  $\beta_1$ – $\alpha_1$ ,  $\beta_3$ – $\beta_4$ , and  $\beta_9$ – $\beta_{10}$  loops; and the  $\beta_5$ – $\beta_6$  linker between the two domains (Supplemental Fig. S2). This basic patch is likely the RNA-binding surface of Rpf2 and corresponds, on the first BID, to the



**Figure 1.** Structure of the Rpf2–Rrs1 complex. (A–C) Ribbon representation of three orthogonal views of the Rpf2–Rrs1 complex. The Brix internal duplicated (BID) domains are represented in light and dark blue, and Rrs1 is shown in red. (D) Superposition of the two Rpf2 BID domains shows that Rrs1 completes the structural elements in the second BID domain.

RNA binding surface of the homologous aaRS domain (Ng et al. 2005).

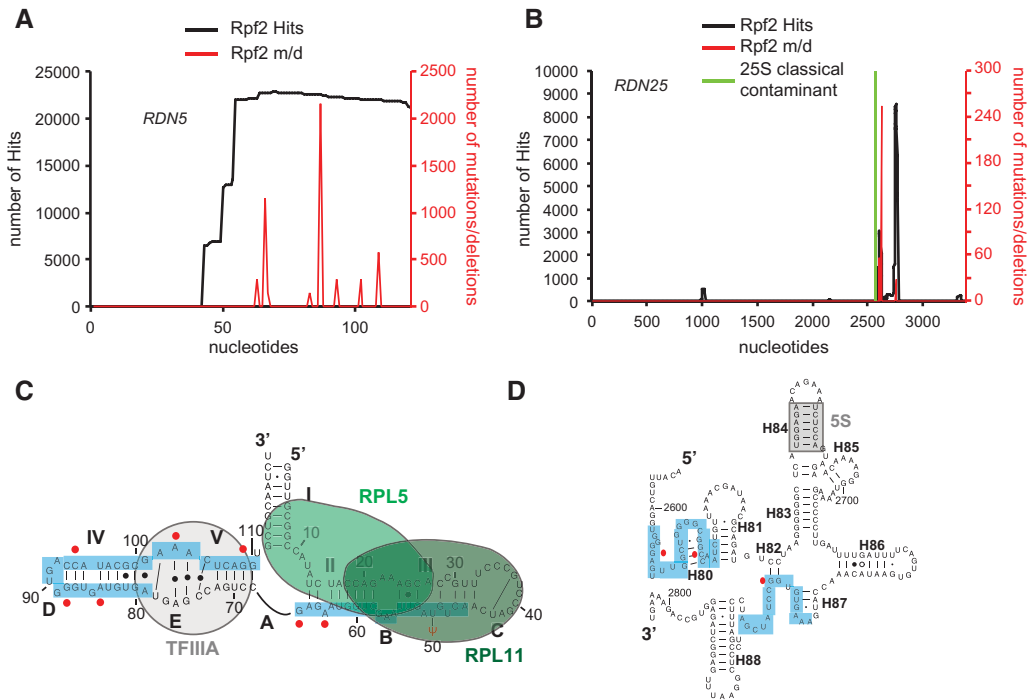
To identify Rpf2 and Rrs1 substrates in the cell, we performed genome-wide *in vivo* identification of the RNA-binding sites of Rpf2 and Rrs1 using the cross-linking and cDNA (CRAC) analysis methodology. Briefly, HTP-tagged Rpf2 or Rrs1 was cross-linked to RNA using UV irradiation, the protein-bound RNA was purified using denaturing conditions using the protein affinity tag and trimmed to the region protected by the protein using a cocktail of RNases, cDNAs were generated, and the sequences were revealed by high-throughput sequencing (Granneman et al. 2009). During the process, the cross-linked RNAs were labeled with  $^{32}\text{P}$  and analyzed by autoradiography. No enrichment for RNAs associated with Rrs1 was seen compared with the control. The majority of RNA fragments bound to Rpf2 correspond to the 5S RNA, as was expected, since Rpf2 is involved in 5S RNP recruitment into the ribosome (Fig. 2A,B). In addition to the 5S rRNA fragments, sequences corresponding to two neighboring regions of 25S rRNA were found bound to Rpf2 (Fig. 2C,D). Interestingly, these two regions flank helix 84—the binding site of both Rpl5 and Rpl11 and the main docking site for the 5S RNP in the pre-60S subunit.

We next set out to confirm the interaction of the recombinant Rpf2–Rrs1 complex with the 5S RNA *in vitro*. The 5S RNA is composed of a three-way junction containing five helical regions (I–V) and five loops (A–E) with coaxial packing of helix I onto helix II (Fig. 2C). As these types of structures can be hard to fold *in vitro*, we purified the 5S RNA from yeast to obtain RNA samples containing both post-transcriptional modifications and native-like structures (as evidenced from SAXS) (data not shown). The interaction of the Rpf2–Rrs1 complex with the 5S

rRNA was performed by both electrophoretic mobility shift assays (EMSAs; using radioactive-labeled RNA to determine the strength of the interaction) and circular dichroism (CD) spectroscopy to assess the conformational changes in RNA and protein components upon complex formation. We found that the Rpf2–Rrs1 complex efficiently bound to the 5S rRNA with a  $K_d$  of  $\sim 57$  nM (Fig. 3A,B), and CD spectroscopy showed that the interaction involves a structural rearrangement of the RNA (Fig. 3C). In agreement with the *in vivo* data, no change in CD spectra was observed when Rrs1 alone was used (Supplemental Fig. S3C), indicating that Rrs1 does not contact this RNA directly. Rpf2 alone is very unstable but was still able to induce a small change in the RNA CD spectra (Supplemental Fig. S3B). We conclude that the contacts to the 5S rRNA principally involve Rpf2 and that, at least *in vitro*, Rpf2 is stabilized by the presence of Rrs1.

#### *Assembly of the Rpf2–Rrs1 complex onto the 5S rRNA*

Since the Rpf2–Rrs1 complex can interact with the 5S rRNA *in vitro*, we performed structural studies using SAXS to study the assembly of the complex in solution (data collection and modeling statistics are shown in Table 2). We first recorded SAXS data for both the full-length and the proteolyzed Rpf2–Rrs1 complex. The data clearly show that the proteolyzed complex is globular, and modeling confirms that the solution structure is the same structure as in the crystal (Fig. 4A). Analysis of the full-length complex revealed that the C-terminal regions of Rpf2 and Rrs1 form extended and unstructured extensions that protrude away from the structural core (data not shown). Because of the difficulty in modeling a protein–RNA complex with these unstructured regions, we performed EMSA



**Figure 2.** In vivo RNA-binding sites of Rpf2. (A,B) RNAs in Rpf2-HTP cells were UV cross-linked in cells growing in culture medium, trimmed and ligated to linkers, amplified by RT-PCR, and sequenced with an ionTorrent. Sequences were aligned with main hits to the 5S rRNA (nucleotides 1–120) (A) and the 25S rRNA (nucleotides 1–3396) (B). The frequency of recovery (hits per 100,000 mapped reads) is plotted for each individual nucleotide (shown in black). The locations of mutations/deletions that are likely due to RNA cross-linking to the residue are shown in red. The location of a classical contaminant sequence found in the 3' end of the 25S rRNA (recovered with the “no tag” control experiment) is represented by a green bar. (C) Secondary structure of 5S rRNA in yeast. The binding sites recovered for Rpf2-HTP are indicated on the sequence (blue). Mutated nucleotides that indicate a direct cross-link are indicated by red dots alongside the sequence. Known binding sites for 5S-binding protein TFIIIA, Rpl5, and Rpl11 are indicated as gray, light-green, and dark-green circles, respectively. (D) Secondary structure of the 25S rRNA in yeast. The binding sites recovered for Rpf2-HTP are indicated on the sequence (blue). Mutated nucleotides are indicated by red dots alongside the sequence. Transient interaction between 5S and 25S in pre-60S particle is indicated as a gray square (Leidig et al. 2014).

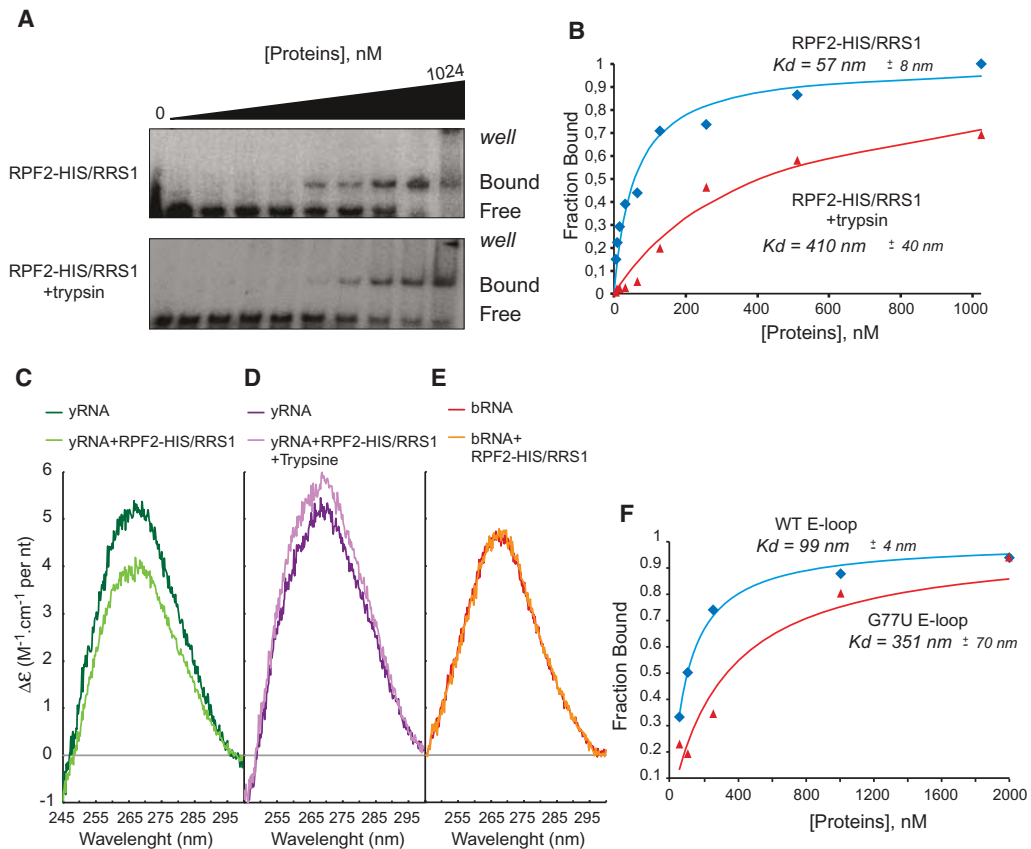
using the trypsin proteolyzed samples that we used for the crystallization of the Rpf2–Rrs1 complex to determine whether it could be used for structural studies using RNA. Surprisingly, we found that while the proteolyzed sample still binds 5S RNA, it does so with eightfold less affinity compared with the complex containing the full-length proteins (Fig. 3A,B). The conformational changes in the RNA observed by CD were also less pronounced with the proteolyzed sample (Fig. 3D). Since Rrs1 does not bind RNA, we attribute the higher affinity of the full-length complex to the C terminus of Rpf2. These residues are not part of the consensus core Brix domain but are conserved in Rpf2 homologs. We conclude that in our in vitro assays, the nonconserved extensions of Rpf2 and Rrs1 likely refold when bound to the RNA and contribute to the binding affinity.

We further characterized the 5S rRNA–Rpf2–Rrs1 complex interaction using the proteolyzed Rpf2–Rrs1 complex and yeast 5S rRNA. Interestingly, the SAXS-derived molecular envelope of the free 5S rRNA clearly shows an unstacking of the RNA helices compared with the ribosome-bound structure (Fig. 4C). We interpreted and modeled the extended conformation of the RNA as

the unbending and unstacking of helices I, II, and III in the absence of the Rpl11 and Rpl5 proteins. In the 5S rRNA–Rpf2–Rrs1 complex, inspection of the molecular envelopes for the RNA and protein phases revealed that the RNA adopts an extended conformation and that the protein complex binds within the first half of the RNA length around 5S RNA helix I (Fig. 4C). The modeling of the complex was performed using the ribosome-bound Rps2–Rrs1 structure (see the next section).

#### Structure of the preribosome-bound Rpf2–Rrs1 complex

Since the Rpf2–Rrs1 complex recruits the 5S RNP to the early preribosome complexes and is still present in late pre-60S particles, we reasoned that it should be present in the cryo-EM structures of Tap-Alb1-purified pre-60S particles (Leidig et al. 2014). Indeed, the presence of Rpf2 in these preribosomes was confirmed by mass spectrometry, and Rrs1 was probably not identified because of overlap with ribosomal protein bands. These particles contain ~20 ribosomal assembly factors and the CP/5S RNP rotated 180° in respect to its final position in mature ribosomes (Supplemental Fig. S5; Leidig et al. 2014). We identified an



**Figure 3.** In vitro interaction of the Rpf2–Rrs1 complex with 5S rRNA. (A) EMSA of the 5S rRNA. 5′-<sup>32</sup>P-labeled 5S rRNA was bound with 0, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, and 1024 nM indicated proteins. (B) Fractions of bound 5S rRNA for each protein concentration were quantified using PhosphorImager and plotted for the Rpf2/Rrs1 complex before (blue diamonds) or after (red triangles) 1 h of trypsin proteolysis. The theoretical curves are represented for the Rpf2/Rrs1 complex before (blue) and after (red) trypsin treatment. (C–E) CD analysis of the RNA conformational changes upon Rpf2/Rrs1 binding. (C) CD spectra of the yeast 5S rRNA (yRNA) are present in two separate cuvette compartments (dark green) or after mixing the two compartments (light green). (D) The same experiment as in C but with the protein complex Rpf2/Rrs1 after trypsin treatment. Spectrum were recorded before (dark purple) and after (light purple) mixing proteins and yRNA. (E) The same experiment as in C with bacterial 5S rRNA (bRNA) and the complex Rpf2/Rrs1 before (red) or after (orange) mixing the two compartments. (F) Filter-binding assay of the 5S rRNA E loop to the RPF2/RRS1 complex. The fluorescently labeled E loop of wild type or the G77U mutant was bound with 0, 25, 50, 100, 250, 1000, and 2000 nM protein complex. Fractions of the bound E loop of wild type or the G77U mutant of the 5S rRNA for each protein concentration were quantified using odyssey (Li-COR) and are plotted for the wild-type E loop (blue diamonds) and G77U mutant (red triangles). The theoretical curves are represented for the wild type (blue) and G77U mutant (red).

unattributed density in the pre-60S structure contacting the 5S rRNA helices I and V (Fig. 5A) in a region compatible with both the CRAC and SAXS data. We were able to fit the Rpf2–Rrs1 complex into this density (Fig. 5B). We then refined the structures of the neighboring molecules against the cryo-EM density, which provided us with a molecular model of Rpf2–Rrs1 in complex with the 5S rRNA, ribosomal proteins, and preribosomal assembly factors within the pre-60S ribosome (Fig. 5B,C). The high resolution obtained in these cryo-EM studies (8.7 Å) gives us a model of the Rpf2–Rrs1–preribosome structure in which the overall binding interfaces are unambiguously defined, but the detailed interaction at the residue level will require higher-resolution structures.

In this model, the Rpf2–Rrs1 complex contacts the 5S rRNA at the junction of the helices I and IV (Fig. 5B), a

region distinct from the Rpl5- and Rpl11-binding regions (Figs. 2C, 5B). The structure shows that the four proteins Rpf2, Rrs1, Rpl5, and Rpl11 can coexist in the same complex with 5S rRNA. Furthermore, in this complex, Rpl5 and Rpl11 are in the same conformation (relative to the 5S rRNA) as found in mature ribosomes. A model of the ribosome-bound 5S–Rpf2–Rrs1 complex was used in refinement against SAXS data, and we found a good fit to the scattering data and in the molecular envelope with a conformation in which the Rpf2–Rrs1 complex interaction is conserved, and helices II and III form an extended helix (Fig. 4D).

In summary, the preribosome-bound and solution structure of the 5S–Rpf2–Rrs1 complex shows that Rpf2–Rrs1 can bind to the 5S rRNA in the absence of Rpl5 and/or Rpl11 and in the same overall conformation as the

**Table 2.** SAXS data collection and modelling statistics

	5S RNA	Rpf2–Rrs1 trypsinized	5S–Rpf2–Rrs1 trypsinized
Data collection parameters			
Instrument	SWING	BM29	BM29
Beam geometry	0.4 mm × 0.1 mm	0.5 mm × 0.5 mm	0.5 mm × 0.5 mm
Wavelength	1.03 Å	1.00 Å	1.0 Å
<i>q</i> range	0.007–0.5 Å <sup>-1</sup>	0.0025–0.5 Å <sup>-1</sup>	0.0025–0.5 Å <sup>-1</sup>
Exposure time/nb frames	1 sec/100	1 sec/10	1 sec/10
Concentration range	10 mg/mL	5–25 mg/mL	5–25 mg/mL
Temperature	288	288	288
Structural parameters			
I(0) [from P(r)]	0.02 cm <sup>-1</sup>	0.06 cm <sup>-1</sup>	0.17 cm <sup>-1</sup>
R <sub>g</sub> [from P(r)]	37.8 Å	22.49 Å	38.06 Å
I(0) (from Guinier)	0.02 cm <sup>-1</sup>	0.06 cm <sup>-1</sup>	0.17 cm <sup>-1</sup>
R <sub>g</sub> (from Guinier)	35.2 Å ± 2.3 Å	22.89 Å ± 1.23 Å	36.84 Å ± 0.83 Å
<i>D</i> <sub>max</sub>	122.3 Å	71.5 Å	128.9 Å
Porod estimate	62,902 Å <sup>3</sup>	63,190 Å <sup>3</sup>	104,848 Å <sup>3</sup>
Molecular mass determination			
Partial specific volume	0.54 cm <sup>3</sup> /g	0.745 cm <sup>3</sup> /g	0.639 cm <sup>3</sup> /g
Contrast ( $\Delta\rho \times 10^{10}$ cm <sup>-2</sup> )	6.283	2.736	4.510
Molecular mass <i>M</i> <sub>r</sub> [from I(0)]	39,314	39,494	75,530
Calculated monomeric <i>M</i> <sub>r</sub> from sequence	39,155	37,558	76,713
Data processing			
Primary data reduction	FOXTROT	EDNA–SAS pipeline	EDNA–SAS pipeline
Data processing	PRIMUS	PRIMUS	PRIMUS
Ab initio analysis	DAMMIF	DAMMIF	MONSA
Number of models	50	50	20
Model $\chi^2$	2.196 ± 0.020	0.855 ± 0.050	2.38 ± 0.068
Validation and averaging	DAMAVR	DAMAVR	DAMAVR
Normalized spatial discrepancies	0.786 ± 0.145	0.978 ± 0.169	0.629 ± 0.112
Rigid body modeling	MC-SYM	DADIMODO	SASREF
Computation of model intensities	CRY SOL	CRY SOL	CRY SOL
Model $\chi^2$	1.866	1.289	1.677

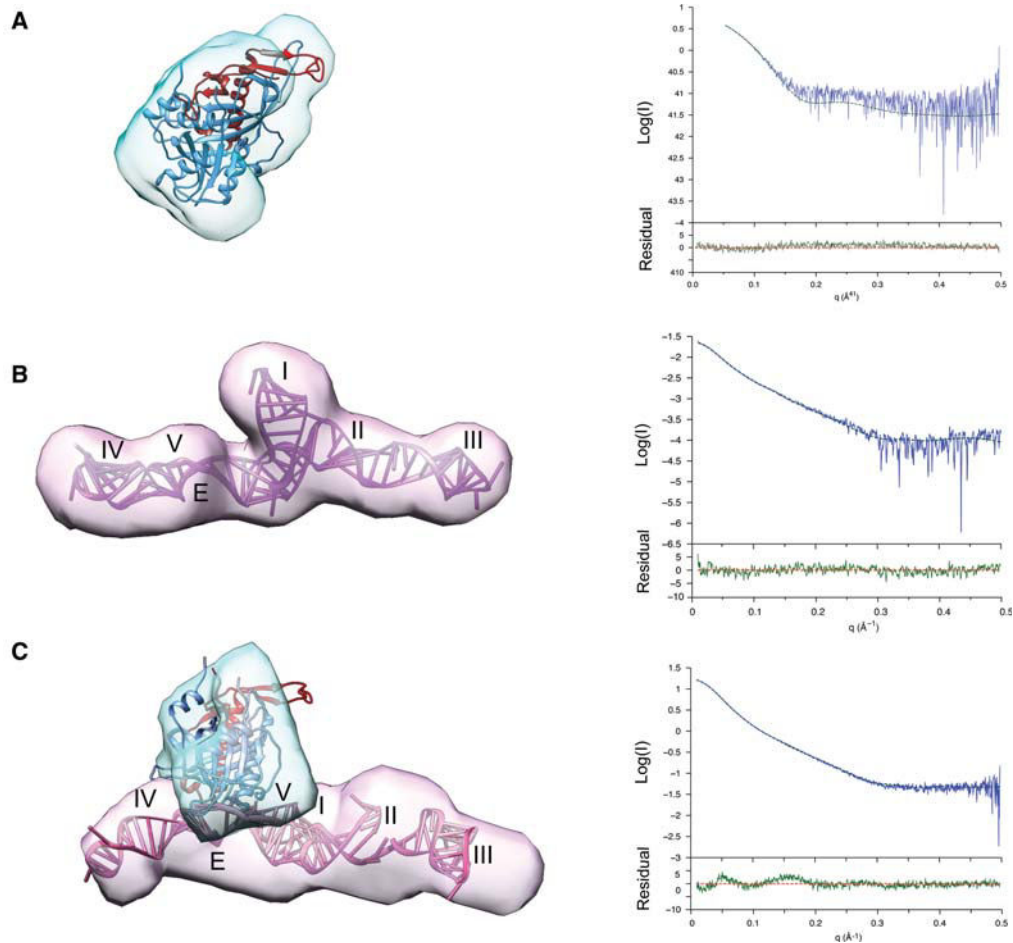
ribosome-bound conformation for helices I and V in the 5S rRNA but that helices II and III require the interaction with Rpl5 and Rpl11 in order to attain their mature conformation. Our data are consistent with the model in which the 5S RNP–Rpf2–Rrs1 complex is incorporated as an independent structural module in preribosomes.

#### *Rpf2 recognizes a eukaryote-specific E loop in the 5S rRNA*

Close analysis of the preribosome-bound Rpf2–Rrs1 complex reveals that the main contact to 5S RNA is with the E loop between helices IV and V (Fig. 2C). While all 5S rRNA species contain an E loop, the sequence is significantly different between eukaryotes and prokaryotes. The E loop forms a G-bulged cross-strand stack structure consisting of three stacked non-Watson-Crick base pairs, a bulged-out guanine (G77) that forms a base triple with A78 and U102, and two cross-strand purine stacking interactions. Loop E is therefore a well-folded and rigid structure (Lee et al. 2006) that provides structural features that could constitute a specific protein-binding site: an unusual backbone geometry, a widened major groove, unique hydrogen-bonding possibilities to the non-Watson-Crick base pairs, and a bulged-out guanine. To confirm that the E loop is important for the specific recognition of the 5S RNA by

Rpf2, we performed *in vitro* binding assays with bacterial-purified 5S rRNA (Fig. 3E), which contains the same overall structure as the eukaryote rRNA but a different E loop. No interaction between Rpf2–Rrs1 and bacterial 5S rRNA was observed by gel shift assays (data not shown) or CD spectra (Fig. 3E), indicating that the eukaryote E loop is the specific RNA-binding element for Rpf2. To confirm this result, we analyzed the interaction between the Rpf2–Rrs1 complex and a labeled RNA probe containing only the E loop and its flanking helices (Supplemental Fig. S3E) using a filter-binding assay. The Rpf2/Rrs1 complex was able to bind this construct with a *K*<sub>d</sub> of 99 nM, and the substitution of the looped-out guanine residue (G77) (Fig. 6A) for a uridine leads to a threefold decrease of the binding affinity (Fig. 3F; Supplemental Fig. S3D).

Rpf2 contacts the 5S rRNA along the previously observed conserved basic patch (Supplemental Fig. S2). The contacts to loop E in the major groove involve the  $\beta_1$ – $\alpha_1$  and  $\beta_3$ – $\beta_4$  loops. The  $\beta_2$ – $\alpha_2$  loop also contacts the loop E 5' strand backbone and the minor groove of helix IV. The  $\beta_3$ – $\beta_4$  loop contains conserved and charged amino acids that bind the RNA backbone on both sides of the loop E and certainly contribute to the specific recognition of the loop E structure. It also places residues of the  $\beta_3$ – $\beta_4$  loop within hydrogen-bonding distance of the bulged guanine (Fig. 6A). All of the protein interactions with the



**Figure 4.** SAXS-derived solution structures of the Rpf2 subcomplexes. Solution structure model of the Rpf2–Rrs1 complex in the proteolyzed state ( $\chi^2 = 1.289$ ) (A), the full-length Rpf2–Rrs1 complex ( $\chi^2 = 1.701$ ) (B), the free 5S RNA ( $\chi^2 = 1.866$ ) (C), and the Rpf2–Rrs1–5S complex with proteolyzed proteins ( $\chi^2 = 1.677$ ). The structures are superposed to a representative envelope calculated by DAMMIN (A,B) or MONSA (C). The proteins and RNA are represented in the same orientation. The corresponding calculated X-ray scattering curves (dashed green) superposed to the experimental scattering curves (blue) are shown in the *right* panel. The locations of interesting 5S structural elements are indicated by their names to refer to Figure 2C.

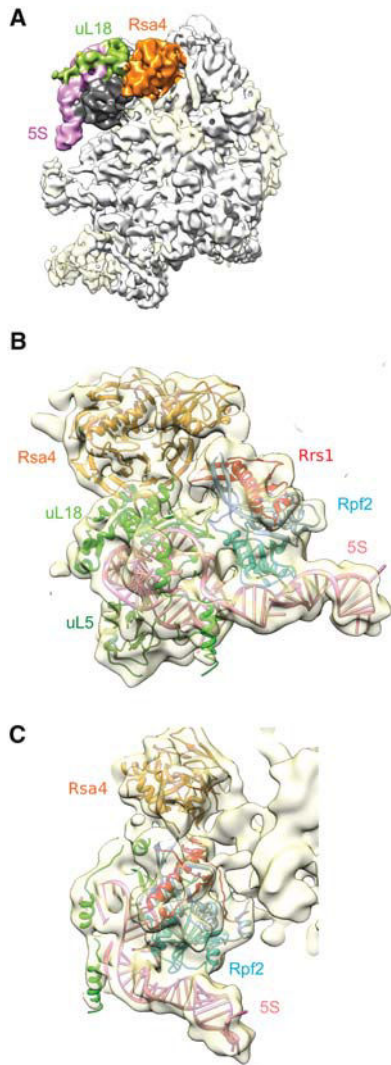
E loop lie within the first BID domain of Rpf2. Superposition of the Rpf2–5S RNA and aaRS–synthetase–tRNA complex shows that the proteins recognize very different RNA substrates with different regions of the protein domain: Binding of Rpf2 is primarily to the E-loop major groove, while aaRS binds the anti-codon loop of a stem-loop structure (Supplemental Fig. S4B). The only common RNA-binding element maps to the  $\beta_2$ – $\alpha_2$  loop contacting the 3' strand of the loop E in the Rpf2–5S complex.

Loop E-like structures are known to mediate specific protein–RNA interactions, such as the sarcin–ricin loop (SRL) of the 25S rRNA with ricin or EF-G and, more interestingly, TFIIIA to the 5S rRNA E loop (Lu et al. 2003). Superposition of the structures of Rpf2 and TFIIIA bound to the 5S rRNA shows that although the two proteins use different strategies to bind the 5S loop E, the binding surfaces of the two proteins overlap on the RNA. This indicates that binding of TFIIIA and Rpf2 to the 5S rRNA is mutually exclusive (Supplemental Fig. S4A). It has

also been reported that Rpl5 displaces TFIIIA on the 5S rRNA due to overlap of their binding sites. These mutually exclusive interactions might ensure the proper sequential interaction of proteins with the 5S rRNA along the maturation pathway. Indeed, TFIIIA could prevent Rpf2 from binding the naked 5S rRNA early in the pathway before the TFIIIA/Rpl5 exchange.

*The Rpf2 complex docks the 5S RNP into the pre-60S particles using a network of RNA and protein interactions*

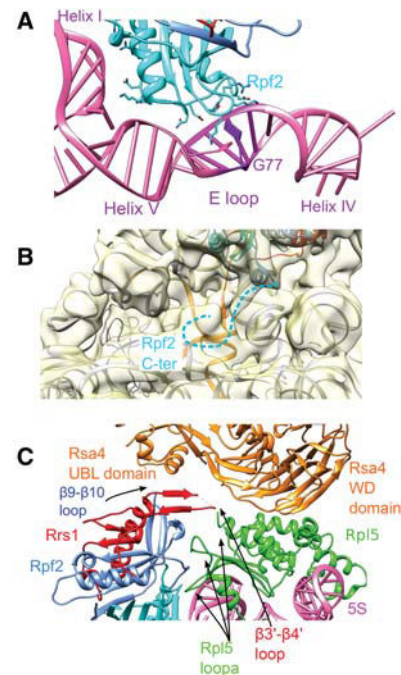
The structure of the Rpf2–Rrs1 complex bound to the pre-60S defines its interaction with the 5S rRNA but also suggests additional contacts to the 25S rRNA and neighboring proteins. Analysis of the CRAC data revealed that, in addition to the 5S rRNA, Rpf2 contacts the 25S rRNA around helices 80 and 87. No contacts between the conserved Brix domain structural core and the 25S RNA are



**Figure 5.** Electron microscopy structure of pre-60S bound Rpf2–Rrs1. (A) Cryo-EM structure of the Alb1-TAP purified pre-60S particles (emd 2528) (Leidig et al. 2014). The unidentified density in contact with 5S (pink) and Rsa4 (orange) is shown in dark gray. (B, C) Orthogonal views of the Rpf2–Rrs1 crystal structure fit in the cryo-EM density. No optimization of the Rpf2–Rrs1 structure was performed.

observable in the pre-60S complex in this region. However, the position of the RNA regions found is compatible with an interaction with the “unstructured” C-terminal region of Rpf2, which was not visible in the crystal structure. Unidentified electron density links the last observed residues of Rpf2 with the 25S rRNA, suggesting that the conserved region following the canonical Brix domain binds this region of the rRNA (Fig. 6B). In the *in vitro* binding assays, we showed that this region has RNA-binding capabilities because it improves binding of Rpf2 to the 5S rRNA (Fig. 3A–D). We propose that the Rpf2 C-terminal extension contributes to 5S RNP assembly in preribosomes by binding an exposed region of the 25S rRNA in proximity to the 5S-binding site.

The importance of the C-terminal domain (CTD) of Rpf2 has been tested by expressing either PTH-tagged versions of full-length (FL) Rpf2, the N-terminal domain (NTD) 1–252 of Rpf2, or the CTD 253–344 of Rpf2 in the presence or absence of the endogenous protein in yeast (Supplemental Fig. S6). As expected, only the full-length protein was able to complement the absence of the endogenous copy (Supplemental Fig. S6A). Interestingly, expression of the NTD mutant exerts a clear dominant-negative effect on growth (Supplemental Fig. S6A). This result supports a model in which the NTD competes with the endogenous copy for 5S RNP binding but fails to progress further in the maturation pathway. This could be due to the impossibility of recruiting the 5S RNP to the ribosome or the inhibition of a subsequent step mediated by the Rpf2 C terminus. In order to distinguish between these two possibilities, we affinity-purified Rpf2-FL, Rpf2-NTD, and Rpf2-CTD and analyzed the bound RNA. We found a 1.6-fold decrease in the ratio of bound 5.8S versus 5S RNA between Rpf2-FL and Rpf2-NTD, indicating that the recruitment of Rpf2 in the ribosome is affected in the absence of Rpf2-CTD (Supplemental Fig. S6C,D). No significant amount of RNA was retrieved with Rpf2-CTD alone, indicating that this region is not



**Figure 6.** RNA and protein contacts in the preribosomes. (A) Rpf2 binds the 5S RNA E loop. The 5S RNA and the Rpf2–Rrs1 complex were fitted simultaneously in the electron density with flexible molecular dynamics using MdFF. The E loop is colored in purple, and the looped-out guanine is depicted in a solid cartoon. (B) Rpf2 contacts to the 25S rRNA. The predicted C-terminal extension of Rpf2, not visible in the crystal structure, is shown by a dashed line. The rRNA sequence identified by CRAC is colored in orange. (C) Protein–protein interaction with the Rpf2–Rrs1 complex in the preribosome.

sufficient for binding preribosomal particles but, in synergy with the Rpf2-NTD, helps the recruitment of the 5S RNP.

In the pre-60S-bound complex, Rpf2 and Rrs1 are in close proximity to the ribosomal protein Rpl5 and the nonribosomal protein Rsa4. Rpl5/uL18 has already been shown to interact with Rsa4 (Leidig et al. 2014), and interactions have been observed between Rpl5, Rpl11, Rpf2, and Rrs1 (Zhang et al. 2007). The structure of the ribosome-bound Rpf2 complex shows that the Rpf2/Rpl5 interaction involves the Rpl5 eukaryote-specific loops that are also involved in Rsa4 binding (Leidig et al. 2014). This suggests that Rpf2 specifically binds to the 5S rRNA/Rpl5 complex for integration in the preribosomes. In addition, Rrs1 and Rpf2 interact with not only Rpl5 but also the Rsa4 assembly factor. In the pre-60S structure, the Rrs1  $\beta_3$ - $\beta_4$  and Rpf2  $\beta_9$ - $\beta_{10}$  loops, which are not visible in the crystallographic electron density of the Rpf2-Rrs1 complex, are in proximity to the WD repeat domain and the ubiquitin-like (UBL) domain of Rsa4 (Fig. 6C). These interactions could participate in the network of protein-protein and protein-RNA interactions that anchor the Rpf2-Rrs1-5S RNP complex in the preribosomes containing the Rsa4 assembly factor and the correct local structure of the 25S rRNA.

## Discussion

### *Brix domain proteins serve as structural hubs that bind both RNA and protein*

The structure of the Rpf2-Rrs1 complex provides us with a model for the function of Brix domain proteins. The first striking observation is the unexpected nature of the interaction between the two proteins. Rrs1 forms a tight complex with Rpf2 and completes the Rpf2 structure. The absence of a free pool of Bxdc1 and hRrs1 in vivo (Sloan et al. 2013), the poor solubility and stability of Rpf2 in vitro (this study), and the instability of Rpf2 in vivo upon depletion of Rrs1 (Zhang et al. 2007) suggest that the proteins always exist in a complex. It is tempting to speculate that other members of the Brix domain family use the same interaction surface to bind Rrs1-like partner proteins. The Rpf2 residues forming salt bridges and/or hydrogen bonds with Rrs1 are not strictly conserved in the Brix domain family, suggesting that Rrs1 does not bind other Brix domain proteins. However, conserved residues specific to each family lie along the Rrs1-interacting surface, suggesting that they bind other proteins, which could define a Brix domain-associated protein (BAP) family. Members of the Brix family have been shown to form specific complexes with other ribosome assembly factors: Imp4 with Imp3/Mpp10 and Brx1 with Ebp2. It remains to be determined whether these Brix domains use the same binding strategy as Rpf2.

The identification of the Rpf2-Rrs1 complex in the pre-60S structure revealed how this complex binds RNA. All of the protein-RNA contacts are made by Rpf2 in both the Brix domain and the C-terminal extension. On the other hand, Rrs1 does not contact RNA; it faces the exte-

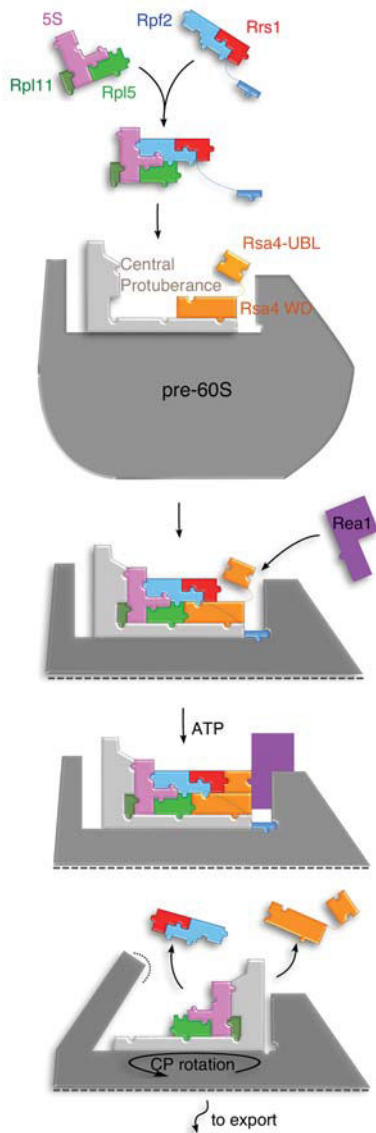
rior of the 5S RNP and is available to interact with other proteins. The data presented here on Rpf2 provide the first evidence that Brix domain proteins can bind specific RNA elements with high affinity. The binding site for Rpf2 in the 5S rRNA, the three-way junction, and loop E structure suggest that Brix domain proteins bind both double-helical and loop/bulge RNA structures and can therefore recognize complex RNA three-dimensional structures. The C-terminal extension also provides long-range RNA-binding capabilities to either recruit the complex to a specific loci or monitor the proper folding of distal RNA structures. In agreement with this hypothesis, the Brix domain of Imp4 is sufficient to bind the U3 snoRNA, but the full-length Imp4 is required to form the duplex between the U3 snoRNA and the pre-rRNA (Gércezi and Correll 2004).

From our data, we conclude that the Brix domain is a docking platform that mediates both RNA and protein contacts. Domain duplication in the Brix domain was followed by function specialization: The first domain provides RNA specificity (Fig. 6A), and the second serves as a protein-binding module (Fig. 6C). The function of Rpf2 is to bring together different regions of the preribosomes by acting as a structural hub for preribosomal proteins, rRNA, and ribosomal proteins. In the case of the Rpf2-Rrs1 complex, the question arises of why the Rpf2 Brix domain binds the Rrs1 BAP, which in turn provides binding specificity to Rsa4. An intriguing possibility is that the ancestral form of the Brix domain was able to bind multiple BAPs that acted as adapters for an RNA substrate structure resembling the E loop and protein interaction sites. In the course of evolution, these complexes specialized to form different Brix domain proteins having different RNA substrate specificities. This is in agreement with the observation that archaeal genomes contain only one Brix domain protein, yeasts contain half a dozen, and metazoan genomes code for >10 members of this family of protein. The differences in the number of Brix domain proteins between archaea, yeast, and metazoans correlate with the increasing complexity of ribosome biogenesis in these organisms. A speculative hypothesis is that, in eukaryotes, a single Brix domain protein could be addressed to different RNAs through protein-protein interactions using different BAPs. This would be compatible with the ribosome-independent roles of several ribosome assembly factors, including Rrs1 (Gambe et al. 2009), Brix protein Ssf1 homolog PeterPan (Bugner et al. 2011), and Imp4 (Furtado et al. 2007).

### *The Rpf2-Rrs1-5S RNP complex acts as a structural probe for correct ribosome assembly*

The ribosome-bound structure of the Rpf2-Rrs1 complex not only defines it as a 5S rRNA binding module but shows that Rpf2 and Rrs1 anchor the 5S rRNA and Rpl5 in a network of interactions with the Rsa4 assembly factor and 25S rRNA. This work has enabled us to assign possible function to Rpf2 and Rrs1 during 5S RNP incorporation into the preribosome (Schematic model in Fig. 7). Rpf2





**Figure 7.** Jigsaw puzzle model for Rpf2/Rrs1 complex function in 5S RNP integration in preribosomes. Strong affinity of the Rpf2/Rrs1 complex for the 5S rRNA suggests that it recruits the free pool of 5S RNP. In this complex, the 5S RNP can only assemble the preribosomes containing the correct conformation. The preassembled Rpf2/Rrs1 targets the 5S RNP onto pre-60S ribosomes using interactions between Rpf2 and the 25S rRNA and between Rpf2/Rrs1/Rpl5 and Rsa4. The Rsa4 UBL domain is positioned by Rrs1 to allow the interaction with Real1, which recycles Rsa4 and Rpf2/Rrs1 from the pre-60S particle and allows the 5S RNP to adopt its final configuration state through a 180° rotation of the CP.

specifically binds to the 5S rRNA/Rpl5 RNP and helps dock this complex onto the 25S rRNA. The 5S assembly pathway prior to this step has been omitted in Figure 7, and it is not known whether Rpf2/Rrs1 can have a role in the assembly of Rpl5/Rpl11 on the 5S rRNA. It is also possible that the import factor Syo1 is involved in chaperoning the assembly of Rpl11 on the H84 helix (Calviño

et al. 2015). The Rpf2-binding surface on the 25S rRNA identified by CRAC is exposed only in the rotated state of the pre-60S CP and not in the mature 60S particles, which confirms that this state is indeed an on-pathway intermediate. Additional contacts to the Rsa4 factor by Rpl5, Rpf2, and Rrs1 also ensure that 5S RNP is addressed to ribosomes with the rotated CP. This interaction could provide selectivity for recruiting the 5S RNP only to the particles that have the proper conformation (Fig. 7). Indeed, because the 5S rRNA–Rpl5–Rpl11 complex has the same structure as mature ribosome-bound 5S RNP, it could very well associate with malformed preribosomal particles that have bypassed quality control mechanisms, for example, by the premature action of Real1 to rotate the CP before the 5S RNP and other factors have been assembled. However, since the 5S RNP–Rpf2–Rrs1 complex is not compatible with the position of the 5S in the mature 60S (Supplemental Fig. S5), the association of Rpf2–Rrs1 to 5S RNP in the nucleolus would function in preventing the association with malformed preribosomes. The high affinity of Rpf2–Rrs1 to the 5S RNP and the requirement of Bxdc1/hRrs1 for nucleolar localization of the 5S RNP (Sloan et al. 2013) suggest that it binds the 5S RNP nucleolar pool to control and direct its incorporation in the correct preribosomes. We suggest that the interaction of the Rpf2–Rrs1 complex with the 5S RNP provides a quality control checkpoint by defining a building block that can interact with only specific preribosomal particles (Fig. 7).

It has been hypothesized that Rsa4 relays structural information at various regions of the pre-60S. It is thought that removal of this central “pin” by the Real1 AAA ATPase rips out the interacting proteins and leads to a major remodeling of the pre-60S particles by rotation of the CP (Baßler et al. 2014). It is not yet known what triggers the action of the Real1 ATPase. We suggest that the Rpf2–Rrs1 complex, positioned at the interface between Rsa4 and 5S rRNA, contributes to this major rearrangement. Indeed, the Rpf2–Rrs1 complex binds the UBL domain of Rsa4, which is involved in recruiting the Real1 ATPase (Ulbrich et al. 2009). In the Rsa4 crystal structure, this domain is found in different orientations with respect to the WD repeat domain (Leidig et al. 2014). Interaction with the Rpf2–Rrs1 complex could stabilize an orientation of the UBL domain, which offers an extended interaction surface for Real1 recruitment and activation. In this model, recruitment of the 5S RNP by the Rpf2–Rrs1 complex would act to both select the correct preribosomes and enable the ribosome biogenesis to proceed to the next step by activation of Real1.

Recent advance in the understanding of the Mdm2–p53–ribosomal protein revealed that regulation of p53 is mediated by the 5S RNP. The 5S RNP appears to be an important target for anti-cancer and anti-ribosomopathy drugs. In addition, it was shown that depletion of either hRrs1 or Bxdc1 induces the p53 response. We therefore propose that targeting the Rpf2–Rrs1/5S rRNA interaction would both impair ribosome biogenesis and activate p53 by the Mdm2–p53–5S RNP pathway and could constitute a novel therapeutic target for cancer.

## Materials and methods

### Cloning, expression, and purification

The ORFs of the *RRS1* and *RPF2* genes from *Saccharomyces cerevisiae* were synthesized commercially by Genscript Corp. and inserted into pET21(a<sup>+</sup>) (Novagen) as a pET21-Rpf2-Rrs1 polycistronic construct with an N-terminal 6xHis-tagged Rpf2 fusion protein. The expression and purification were essentially as described (Loc'h et al. 2014). Briefly, the proteins were expressed in the Rosetta 2DE3 strain from *Escherichia coli* (Invitrogen) at 37°C in LB medium (Sigma) supplemented with 100 µg/mL ampicillin and 25 µg/mL chloramphenicol until OD<sub>600</sub> between 0.6 and 0.8. Recombinant protein expression was induced by adding 1 mM isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside, incubating overnight at 20°C, harvesting by centrifugation, and resuspending in buffer A (50 mM Tris-HCl at pH 8, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole) supplemented with complete EDTA-free protease inhibitors (Roche). Cells were lysed by sonication, and lysate was centrifuged at 20,000 rpm for 30 min.

The clear lysate containing the Rrs1-Rpf2 6xHis-tagged complex was loaded onto a 5-mL HisTrap (GE Healthcare) connected to an ÄKTA pure (GE Healthcare). The Rrs1-Rpf2 6xHis-tagged complex was eluted with a linear gradient of imidazole (buffer B, 50 mM Tris-HCl at pH 8, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole). Gel filtration was then performed on the eluted fractions containing protein complex using buffer C (50 mM Tris-HCl at pH 8, 150 mM NaCl) on a Superdex 200 26/60 (GE Healthcare).

### Crystallization, data collection, and processing

Crystallization trials were performed at 18°C using the hanging drop vapor diffusion technique in 1-µL drops (with a 1:1 protein:precipitant ratio) equilibrated against 500 µL of reservoir solution. The Rrs1-Rpf2 His-tagged complex was first digested for 1 h at 30°C using a bovine trypsin solution at 1/1000 ratio (w/w) and was used in crystallization trials without further purification. Crystals were obtained in 0.2 M LiSO<sub>4</sub>, 30% (w/v) polyethylene glycol 4000, and 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5) with a complex solution at 15 mg/mL containing trypsin. Crystals were cryoprotected using successive soaking steps in increasing concentrations of ethylene glycol.

X-ray data were tested and optimized at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) and collected at the Soleil synchrotron on beamlines Proxima1 and Proxima2. For phasing, crystals were soaked in a reservoir solution containing 10 µM potassium tetrachloroplatinate (PtCl<sub>4</sub>) or hexachloroplatinate (PtCl<sub>6</sub>), and data were collected at the absorption threshold of platinum (1.0716 Å). Native and derivative data sets were indexed using XDS (Kabsch 2010) and Mosflm (Leslie and Powell 2007). The structure was solved by single isomorphous replacement with anomalous scattering using the PtCl<sub>4</sub> derivative. Since native data sets were not isomorphous, the PtCl<sub>6</sub> data set, which did not contain anomalous signal, was used as a native data set and phased with SHARP (Bricogne et al. 2003). Experimental phasing and molecular replacement were carried out with the Autosol and Phaser programs from Phenix (Adams et al. 2010). The initial rebuilding was carried out with Buccaneer from the CCP4 program suite (Collaborative Computational Project 1994) and subsequent rebuilding and refinement were carried out with COOT (Emsley and Cowtan 2004) and the Refine module from Phenix. Structures were fitted in the cryo-EM electron density (emdb 2528) using Chimera (Pettersen et al. 2004) and were refined using MdFF (Trabuco et al. 2008).

### Yeast strains

The strains used are listed in Supplemental Table S1. For the CRAC approach, the genomic copies of Rpf2 and Rrs1 were C-ter-

minally tagged (Longtine et al. 1998) for expression as a Rpf2-His6-TEV-2ProteinA (HTP) and a Rrs1-HTP fusion in the BY4741 (MATa; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*) background. The HTP tags did not detectably affect cell growth. To obtain plasmids expressing PTH-tagged mutants of Rpf2, cDNAs corresponding to each mutant were amplified by PCR and cloned into pRS415-PTH via XmaI restrictions sites.

### Yeast RNA isolation

The wild-type BY4741 strain from *S. cerevisiae* was grown at 25°C in 1 L of YPD medium to an OD<sub>600</sub> of 8. The cell culture was then divided into six pots and harvested by centrifugation. Extracts were prepared from pellets resuspended in 1.5 mL of guanidinium thiocyanate-phenol mix (1:1 [v/v]) with 1.5 mL of zirconia beads and vortexed for 5 min. Twelve microliters of guanidinium thiocyanate-phenol mix (1:1 [v/v]) was then added, and extracts were incubated for 10 min at 65°C and left for 10 min on ice. Four microliters of 100 mM sodium acetate and 6 mL of chloroform were added, and extracts were centrifuged at 4600 rpm for 30 min. Aqueous phases were removed and subjected to ethanol precipitation. Precipitated RNA were resuspended in buffer A (10 mM Tris-HCl at pH 8, 400 mM NaCl) and loaded onto a 13-mL 15Q chromatography column connected to an ÄKTA pure system (GE Healthcare). RNAs were then eluted with a linear gradient of NaCl (buffer B, 10 mM Tris-HCl at pH 8, 700 mM NaCl). Gel filtration was then performed on the eluted fractions containing the 5S RNA using buffer C (10 mM Tris-HCl at pH 8, 150 mM NaCl) on a Superdex 200 16/60 (GE Healthcare).

### Immunoprecipitations

Immunoprecipitations using the ProtA tag on IgG sepharose beads were performed as described before (Lebaron et al. 2005).

### EMSA

5S RNA was purified from yeast, dephosphorylated, labeled with <sup>32</sup>P at the 5' end, and purified on G50 column. Labeled RNA (0.1 nM) was incubated with protein in a 10-µL reaction containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, and 5% glycerol for 10 min at room temperature. The reactions were resolved in 5% native polyacrylamide gels running in 0.5× TBE (pH 7.8) buffer at 4°C. The gels were dried and autoradiographed using a BAS-5000 PhosphorImager (Fugi).

### CD

CD spectra were recorded using a Jobin-Yvon Mark VI circular dichrograph at a scan speed of 0.2 nm/sec. Quartz spare split-compartment cuvettes with a 0.437-cm path length per compartment were used. The relevant protein solution was placed in one compartment of the cuvette, and the RNA target solution was placed in the other one. The CD spectra were recorded before and after mixing the cuvette contents. Blanks were run before each spectrum and subtracted from the raw data. Three spectra were averaged to increase the signal to noise ratio. The final protein and/or RNA concentration was 1 µM in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 8) containing 150 mM NaCl, and the assays were carried out at 20°C. The protein and RNA spectra alone were recorded by replacing one or the other compartment by buffer. The results are presented as normalized Δε values on the basis of the nucleotide mean residue mass of 330 Da. Taking into account a sensitivity of δ(ΔA) = 10<sup>-6</sup> for the apparatus, the nucleotide concentration, and the optical path length of the cuvette, measurements were obtained at a precision of δ(Δε) = ±0.01 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> per nucleotide.

### Filter-binding assay

The fluorescently 5' IRD800-labeled RNA was ordered to IDT. After reception, the RNA was heated for 2 min at 65°C, immediately placed for 10 min on ice, and diluted in binding buffer containing 1× PBS (pH 7.6), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 6% glycerol, 0.5 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 5 µg of *E. coli* tRNA per milliliter, and 50 µg of BSA per milliliter. Binding reactions consisted of 10 µL of RNA at 0.5 nM and 5 µL of proteins (final concentration from 25 to 2000 nM). Binding reactions were incubated for 15 min at 20°C and then applied directly to filters containing the two membranes under gentle vacuum. Before and after application of the binding reactions, 200 µL of binding buffer was used to equilibrate and rinse the system. Binding was quantified using an Odyssey apparatus (Li-Cor) and Image Lite program (Li-Cor). The intensity was corrected for background and fit for  $K_d$  using GnuPlot (<http://www.gnuplot.info>) using the following equation:  $f(x) = x/(x + K_d)$ , where  $x$  is the concentration of protein.

### Cross-linking and analysis of Torrent sequence data

Cells expressing Rpf2-HTP, Rrs1-HTP, or wild type were grown to an OD<sub>600</sub> of 0.5 in synthetic dextrose (SD) medium lacking Trp and Ura with 2% glucose. Cells were directly cross-linked inside culture media using Megatron (Granneman et al. 2011). Cells were processed as previously described (Granneman et al. 2009). Torrent sequencing data were aligned to yeast genome using TMAP (<http://www.iontorrent.com>). Downstream analyses, including the pileups presented here, were performed using the pyCRAC tool suite (Webb et al. 2014).

### SAXS data collection

SAXS data on *S. cerevisiae* free 5S RNA were collected on beamline SWING (Soleil Synchrotron) at an energy of 13 keV. SAXS data on the Rpf2–Rrs1 protein complex and the 5S–Rpf2–Rrs1 RNA–protein complex, either full-length or proteolyzed, were collected on beamline BM29 (ESRF) at an energy of 12.5 keV. Scattering data were collected at 20°C at sample concentrations between 1 and 25 mg/mL. For measurement on the 5S RNA at SWING, the sample was injected on a gel filtration column (bio-SEC 3, Agilent), and data were recorded on the in-line elution profile (David and Perez 2009). For proteins and protein–RNA complexes, samples were injected directly on the BM29 flow cell (Pernot et al. 2013). Buffer background scattering was collected on the gel filtration buffers used for the RNA, proteins, and RNA–protein complexes. Background subtraction, averaging, and scaling were carried out using Foxtrot on the SWING beamline or the EDNA pipeline available on the BM29 beamline.

### SAXS data processing

Further processing and data analysis were done using the programs of the ATSAS suite (Petoukhov et al. 2012). Guinier analysis was carried out in PRIMUS on data in the scattering range consistent with  $Q_{\max} \times R_g < 1.3$ . Distance distribution functions and  $D_{\max}$  were determined using the program Gnom. Ab initio free atom modeling was performed using the program DAMMIF protein complex. For RNA–protein complexes, the multiphase approach implemented in MONSA was used for shape modeling using the information from free RNA, Rpf2–Rrs1 alone, and RNA–protein complexes. Multiple MONSA calculations were run on the ATSAS online server. Several models (20–50) were computed for each macromolecule. Superposition, averaging, filtering, and computation of normalized spatial discrepancies

(NSDs) were done using the program DAMAVER for each model ensemble.

### Molecular modelling

The missing parts of the proteins were modeled by an ab initio approach using Rosetta (Rohl et al. 2004). Structures of each missing domain were calculated with Rosetta and clustered with a root mean square deviation (RMSD) radius of 5 Å. The top cluster as each domain was included as a template for homology modeling with Modeller for full atom model generation (Sali and Blundell 1993). The structures calculated with Modeller were ranked by the DOPE score (Shen and Sali 2006). SAXS data were then used for further modeling with DADIMODO (Evrard et al. 2011). The free RNA structure was modeled by generating 2000 models based only on secondary structure restraints using MC-SYM (Parisien and Major 2008). This data set explored a wide range of 5S RNA structures in both the structure of each helix and the relative orientation of the helices of the three-way junction. The RNA–protein complexes were modeled by superposing the structure of the protein complex in the same orientation as the cryo-EM bound model on all of the RNA structures generated. For each model, the goodness of fit was estimated by  $\chi^2$  calculation with Crysol.

### Accession numbers

The Gene Expression Omnibus accession number for all sequence data reported in this study is GSE68431. The structure of the Rpf2–Rrs1 complex was deposited at the Protein Data Bank under code 5a53.

### Acknowledgments

We thank Professor Nicolas James Watkins from Newcastle University for his careful reading of the manuscript and fruitful suggestions. We thank Dr. Frank Letourneur for his technical support on deep-sequencing analysis. Work at Université Paris Descartes was supported by Centre National de la Recherche Scientifique, University Paris Descartes, the RNPGenesis grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR JC RNP-Genesis), and the Institut Universitaire de France. We acknowledge SOLEIL and ESRF for provision of synchrotron radiation facilities and thank the beamline scientists on the PROXIMA I and II, SWING, and BM29 beamlines. C.M. and S.L. expressed, purified, and crystallized the Rpf2 complex. C.M., N.L., and S.R. solved the crystal structure. S.L., M.B., L.D., and C.M. performed RNA- and protein-binding assays. S.R., M.B., N.L., S.L., and C.M. performed the SAXS experiments. S.L., J.P., and E.P. performed the CRAC experiments. N.L. designed the studies, interpreted data, and wrote the paper with contributions from S.L., C.M., M.B., and S.R.

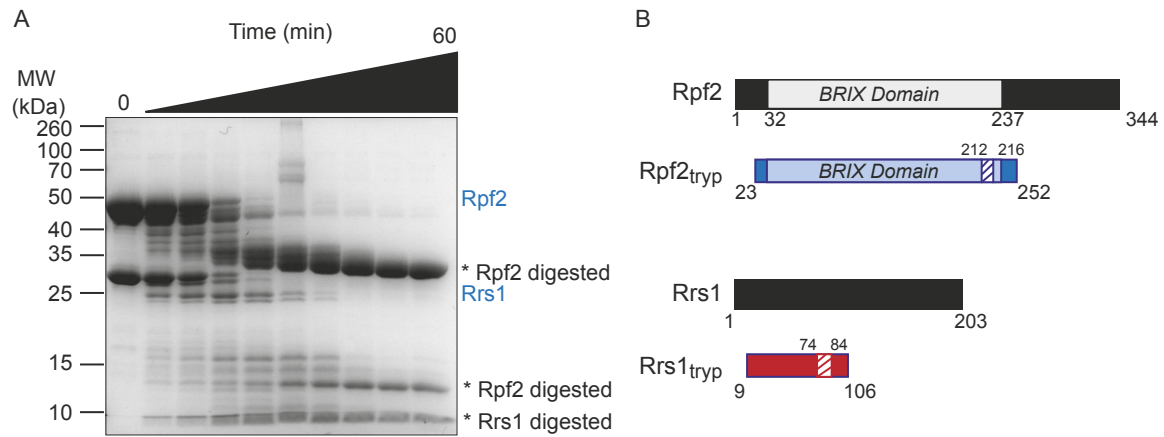
### References

- Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung L-W, Kapral GJ, Grosse-Kunstleve RW, et al. 2010. Phenix: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 213–221.
- Armistead J, Khatkar S, Meyer B, Mark BL, Patel N, Coghlan G, Lamont RE, Liu S, Wiechert J, Cattini PA, et al. 2009. Mutation of a gene essential for ribosome biogenesis, EMG1, causes Bowen-Conradi syndrome. *Am J Hum Genet* **84**: 728–739.

- Asano N, Kato K, Nakamura A, Komoda K, Tanaka I, Yao M. 2015. Structural and functional analysis of the Rpf2-Rrs1 complex in ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res* **43**: 4746–4757.
- Baßler J, Paternoga H, Holdermann I, Thoms M, Granneman S, Barrio-Garcia C, Nyarko A, Stier G, Clark SA, Schraivogel D, et al. 2014. A network of assembly factors is involved in remodeling rRNA elements during preribosome maturation. *J Cell Biol* **207**: 481–498.
- Bricogne G, Vornrhein C, Flensburg C, Schiltz M, Paciorek W. 2003. Generation, representation and flow of phase information in structure determination: recent developments in and around Sharp 2.0. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**: 2023–2030.
- Bugner V, Tecza A, Gessert S, Kühl M. 2011. Peter Pan functions independently of its role in ribosome biogenesis during early eye and craniofacial cartilage development in *Xenopus laevis*. *Development* **138**: 2369–2378.
- Calviño FR, Kharde S, Ori A, Hendricks A, Wild K, Kressler D, Bange G, Hurt E, Beck M, Sinning I. 2015. Symportin 1 chaperones 5S RNP assembly during ribosome biogenesis by occupying an essential rRNA-binding site. *Nat Commun* **6**: 6510.
- Ciganda M, Williams N. 2011. Eukaryotic 5S rRNA biogenesis. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**: 523–533.
- David G, Perez J. 2009. Combined sampler robot and high-performance liquid chromatography: a fully automated system for biological small-angle X-ray scattering experiments at the Synchrotron SOLEIL SWING beamline. *J Appl Crystallogr* **42**: 892–900.
- Donati G, Peddigari S, Mercer CA, Thomas G. 2013. 5S ribosomal RNA is an essential component of a nascent ribosomal precursor complex that regulates the Hdm2–p53 checkpoint. *Cell Rep* **4**: 87–98.
- Emsley P, Cowtan K. 2004. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**: 2126–2132.
- Evrard G, Mareuil F, Bontems F, Sizun C, Perez J. 2011. DADI-MODO: a program for refining the structure of multidomain proteins and complexes against small-angle scattering data and NMR-derived restraints. *J Appl Crystallogr* **44**: 1264–1271.
- Furtado C, Regis-da-Silva CG, Passos-Silva DG, Franco GR, Macedo AM, Junho Pena SD, Machado CR. 2007. *Schistosoma mansoni*: the IMP4 gene is involved in DNA repair/tolerance after treatment with alkylating agent methyl methane sulfonate. *Exp Parasitol* **116**: 25–34.
- Gamalinda M, Ohmayer U, Jakovljevic J, Kumcuoglu B, Woolford J, Mbom B, Lin L, Woolford JL. 2014. A hierarchical model for assembly of eukaryotic 60S ribosomal subunit domains. *Genes Dev* **28**: 198–210.
- Gambe AE, Matsunaga S, Takata H, Ono-Maniwa R, Baba A, Uchiyama S, Fukui K. 2009. A nucleolar protein RRS1 contributes to chromosome congression. *FEBS Lett* **583**: 1951–1956.
- Gérczei T, Correll CC. 2004. Imp3p and Imp4p mediate formation of essential U3-precursor rRNA (pre-rRNA) duplexes, possibly to recruit the small subunit processome to the pre-rRNA. *Proc Natl Acad Sci* **101**: 15301–15306.
- Granneman S, Kudla G, Petfalski E, Tollervey D. 2009. Identification of protein binding sites on U3 snoRNA and pre-rRNA by UV cross-linking and high-throughput analysis of cDNAs. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 9613–9618.
- Granneman S, Petfalski E, Tollervey D. 2011. A cluster of ribosome synthesis factors regulate pre-rRNA folding and 5.8S rRNA maturation by the Rat1 exonuclease. *EMBO J* **30**: 4006–4019.
- Kabsch W. 2010. XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**: 125–132.
- Knight E, Darnell JE. 1967. Distribution of 5 s RNA in HeLa cells. *J Mol Biol* **28**: 491–502.
- Layat E, Probst AV, Tourmente S. 2013. Structure, function and regulation of transcription factor IIIA: from *Xenopus* to *Arabidopsis*. *Biochim Biophys Acta* **1829**: 274–282.
- Lebaron S, Froment C, Fromont-Racine M, Rain J-C, Monsarrat B, Caizergues-Ferrer M, Henry Y. 2005. The splicing ATPase prp43p is a component of multiple preribosomal particles. *Mol Cell Biol* **25**: 9269–9282.
- Lebaron S, Schneider C, van Nues RW, Swiatkowska A, Walsh D, Böttcher B, Granneman S, Watkins NJ, Tollervey D. 2012. Proofreading of pre-40S ribosome maturation by a translation initiation factor and 60S subunits. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 744–753.
- Lee BM, Xu J, Clarkson BK, Martinez-Yamout MA, Dyson HJ, Case DA, Gottesfeld JM, Wright PE. 2006. Induced fit and ‘lock and key’ recognition of 5S RNA by zinc fingers of transcription factor IIIA. *J Mol Biol* **357**: 275–291.
- Leidig C, Thoms M, Holdermann I, Bradatsch B, Berninghausen O, Bange G, Sinning I, Hurt E, Beckmann R. 2014. 60S ribosome biogenesis requires rotation of the 5S ribonucleoprotein particle. *Nat Commun* **5**: 3491.
- Leslie AG, Powell HR. 2007. Processing diffraction data with Mosflm. In *Evolving methods for macromolecular crystallography* (ed. Read R, Sussman JL), pp. 41–51. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Liu Y, He Y, Jin A, Tikunov AP, Zhou L, Tollini LA, Leslie P, Kim T-H, Li LO, Coleman RA, et al. 2014. Ribosomal protein-Mdm2–p53 pathway coordinates nutrient stress with lipid metabolism by regulating MCD and promoting fatty acid oxidation. *Proc Natl Acad Sci* **111**: E2414–E2422.
- Loc’h J, Blaud M, Réty S, Lebaron S, Deschamps P, Bareille J, Jombart J, Robert-Paganin J, Delbos L, Chardon F, et al. 2014. RNA mimicry by the Fap7 adenylate kinase in ribosome biogenesis. *PLoS Biol* **12**: e1001860.
- Longtine MS, McKenzie A, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, Philippsen P, Pringle JR. 1998. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 953–961.
- Lu D, Alexandra Searles M, Klug A. 2003. Crystal structure of a zinc-finger–RNA complex reveals two modes of molecular recognition. *Nature* **426**: 96–100.
- Matsuo Y, Granneman S, Thoms M, Manikas R-G, Tollervey D, Hurt E. 2014. Coupled GTPase and remodelling ATPase activities form a checkpoint for ribosome export. *Nature* **505**: 112–116.
- Miliani de Marval PL, Zhang Y. 2011. The RP–Mdm2–p53 pathway and tumorigenesis. *Oncotarget* **2**: 234–238.
- Narla A, Ebert BL. 2011. Translational medicine: ribosomopathies. *Blood* **118**: 4300–4301.
- Ng CL, Waterman D, Koonin EV, Antson AA, Ortiz-Lombardía M. 2005. Crystal structure of Mil (Mth680): internal duplication and similarity between the Imp4/Brix domain and the anticodon-binding domain of class IIa aminoacyl-tRNA synthetases. *EMBO Rep* **6**: 140–146.
- Parisien M, Major F. 2008. The MC-sold and MC-sym pipeline infers RNA structure from sequence data. *Nature* **452**: 51–55.
- Pernot P, Round A, Barrett R, De Maria Antolinos A, Gobbo A, Gordon E, Huet J, Kieffer J, Lentini M, Mattenet M, et al. 2013. Upgraded ESRF BM29 beamline for SAXS on macromolecules in solution. *J Synchrotron Radiat* **20**: 660–664.

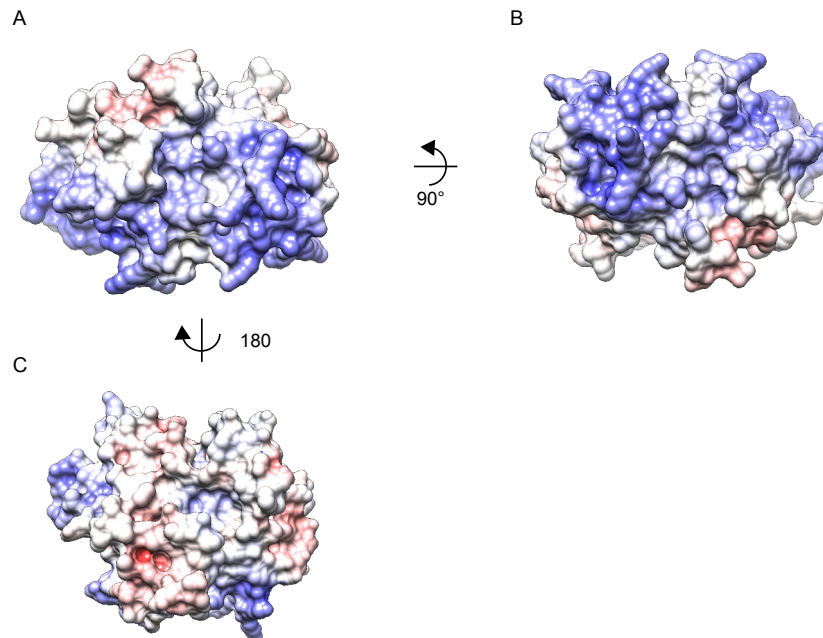
- Petoukhov MV, Franke D, Shkumatov AV, Tria G, Kikhney AG, Gajda M, Gorba C, Mertens HD, Konarev PV, Svergun DI. 2012. New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *J Appl Crystallogr* **45**: 342–350.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**: 1605–1612.
- Rohl CA, Strauss CEM, Misura KMS, Baker D. 2004. Protein structure prediction using Rosetta. *Methods Enzymol* **383**: 66–93.
- Sali A, Blundell TL. 1993. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* **234**: 779–815.
- Sasaki M, Kawahara K, Nishio M, Mimori K, Kogo R, Hamada K, Itoh B, Wang J, Komatsu Y, Yang YR, et al. 2011. Regulation of the MDM2–P53 pathway and tumor growth by PICT1 via nucleolar RPL11. *Nat Med* **17**: 944–951.
- Shen M-Y, Sali A. 2006. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Sci* **15**: 2507–2524.
- Sloan KE, Bohnsack MT, Watkins NJ. 2013. The 5S RNP couples p53 homeostasis to ribosome biogenesis and nucleolar stress. *Cell Rep* **5**: 237–247.
- Sondalle SB, Baserga SJ. 2014. Human diseases of the SSU processome. *Biochim Biophys Acta* **1842**: 758–764.
- Steitz JA, Berg C, Hendrick JP, La Branche-Chabot H, Metspalu A, Rinke J, Yario T. 1988. A 5S rRNA/L5 complex is a precursor to ribosome assembly in mammalian cells. *J Cell Biol* **106**: 545–556.
- Strunk BS, Novak MN, Young CL, Karbstein K. 2012. A translation-like cycle is a quality control checkpoint for maturing 40S ribosome subunits. *Cell* **150**: 111–121.
- Trabuco LG, Villa E, Mitra K, Frank J, Schulten K. 2008. Flexible fitting of atomic structures into electron microscopy maps using molecular dynamics. *Structure* **16**: 673–683.
- Ulbrich C, Diepholz M, Baßler J, Kressler D, Pertschy B, Galani K, Böttcher B, Hurt E. 2009. Mechanochemical removal of ribosome biogenesis factors from nascent 60S ribosomal subunits. *Cell* **138**: 911–922.
- Webb S, Hector RD, Kudla G, Granneman S. 2014. PAR-CLIP data indicate that Nrd1-Nab3-dependent transcription termination regulates expression of hundreds of protein coding genes in yeast. *Genome Biol* **15**: R8.
- Wehner KA, Baserga SJ. 2002. The  $\sigma 70$ -like motif: a eukaryotic RNA binding domain unique to a superfamily of proteins required for ribosome biogenesis. *Mol Cell* **9**: 329–339.
- Zhang J, Hampicharnchai P, Jakovljevic J, Tang L, Guo Y, Oeffinger M, Rout MP, Hiley SL, Hughes T, Woolford JL. 2007. Assembly factors Rpf2 and Rrs1 recruit 5S rRNA and ribosomal proteins rpL5 and rpL11 into nascent ribosomes. *Genes Dev* **21**: 2580–2592.

## Supplementary Figures



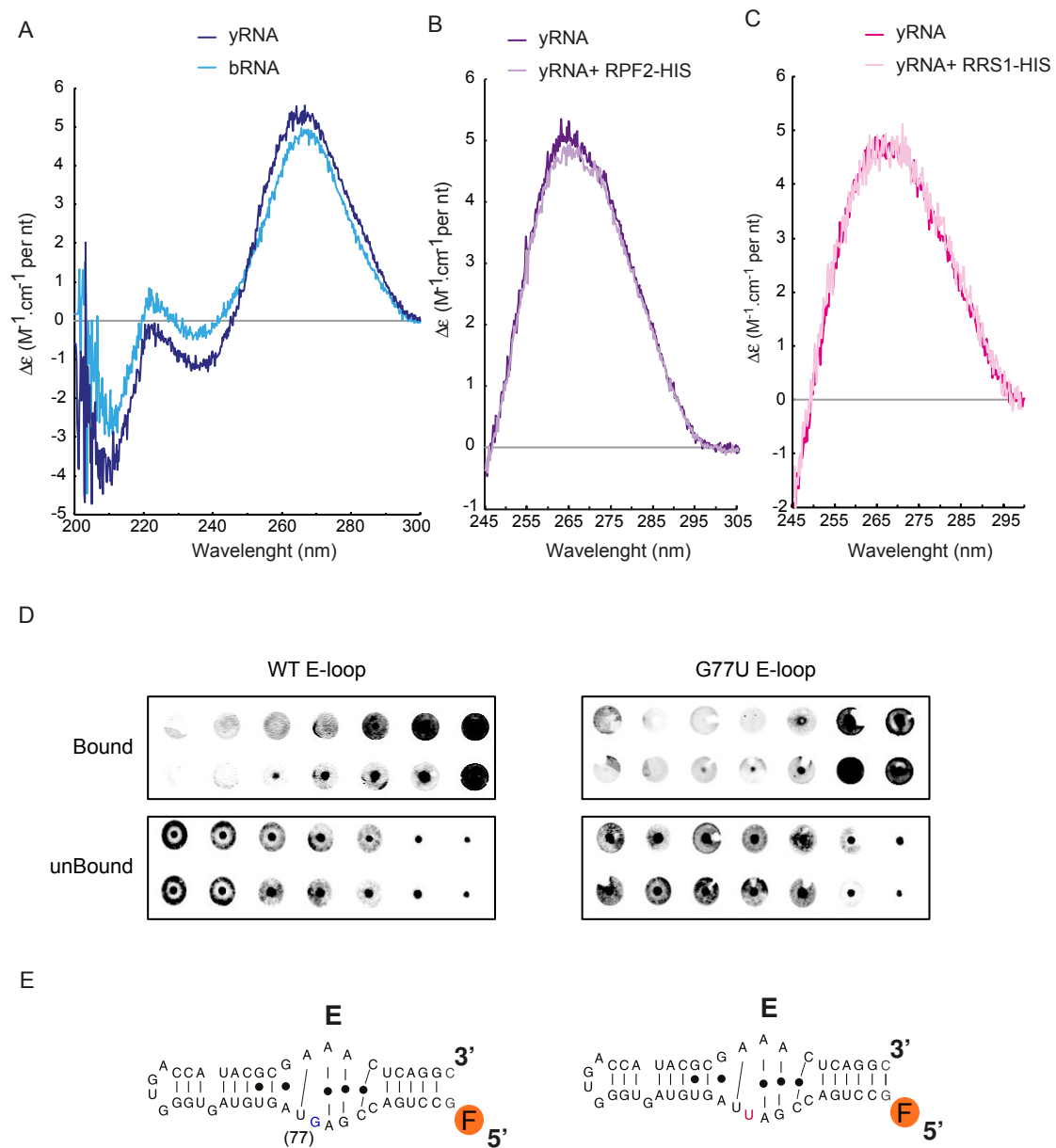
**Figure S1 : Limited proteolysis of the Rpf2-Rrs1 complex**

(A) Purified Rpf2-Rrs1 complex was partially digested using trypsin in 1/1000 mass ratio and incubated at 30°C for 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45 and 60 minutes. The different peptides obtained were then analyzed by coomassie staining and mass spectrometry. (B) Partially digested peptides recovered after tryptic digestion of Rpf2/Rrs1 complex and solved by X-ray crystallography are indicated underneath full-length proteins. Unstructured loop absent from the solved structure are indicated as dashed squares.



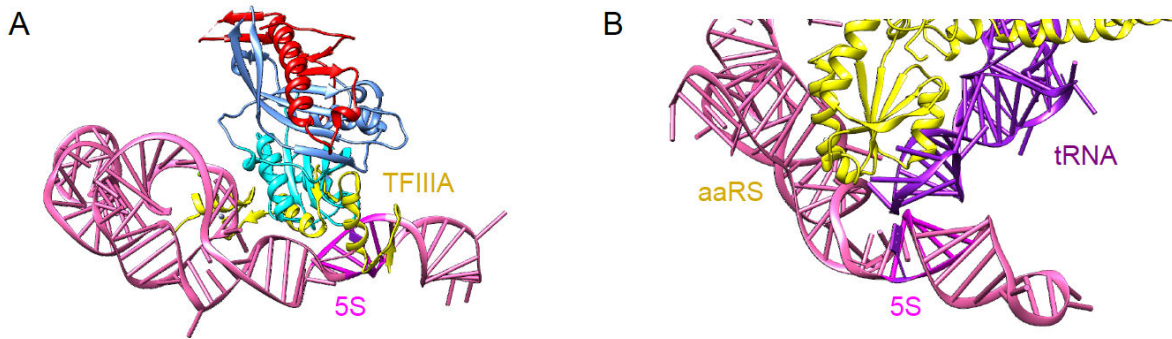
**Figure S2 : Electrostatic potential of the Rpf2-rrs1 Complex**

Electrostatic potential mapped on the structure of the Rpf2-Rrs1 complex in the same orientation as Figure 1, panel A, B and C.



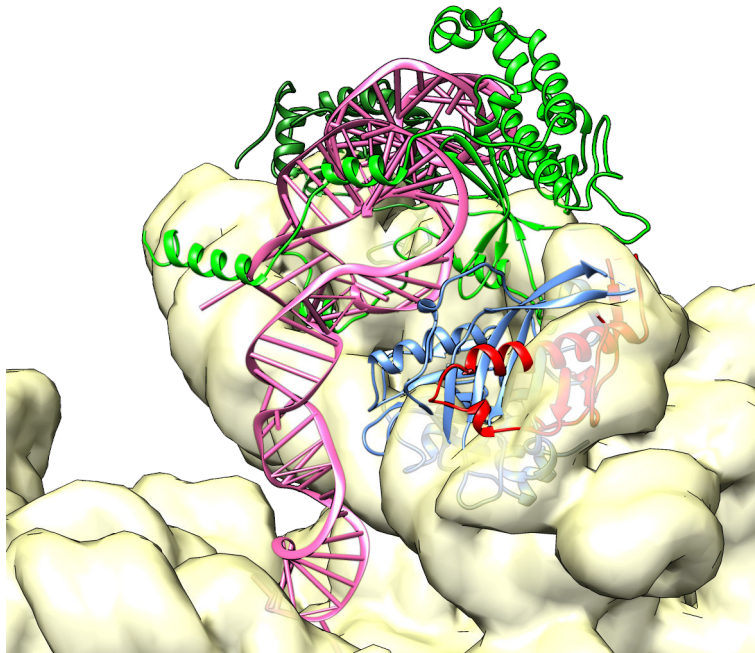
**Figure S3 : Complementary CD analysis**

(A) CD spectra of yRNA 5S (dark blue) and bRNA 5S (light blue) scanned in the range of 200 to 300 nm. (B) CD spectra of yRNA 5S obtained when the protein Rpf2 and the yRNA are present in two separate cuvette compartments (dark purple) and after mixing the two compartments (light purple). (C) CD spectra of yRNA 5S obtained when the protein Rrs1 and the yRNA are present in two separate cuvette compartments (dark pink) and after mixing the two compartments (light pink). (D) Filter-binding assay of fluorescently labelled wild-type E-loop (WT) or G77U mutant (G77U) to Rpf2/Rrs1 complex. Free RNA molecules hybridize to nylon filter (unBound) and RNA associated to different concentration of proteins (0, 25, 50, 100, 250, 1000 and 2000nM) are retained on protran filter (Bound). (E) Secondary structure of E-loop used in the filter-binding assay. Position of the fluorescent label and two additional residues used to strengthen the loop are indicated as a circled F and with a grey color respectively.



**Figure S4: Comparison of Rpf2 5S RNA binding with TFIIIA and aaRS proteins**

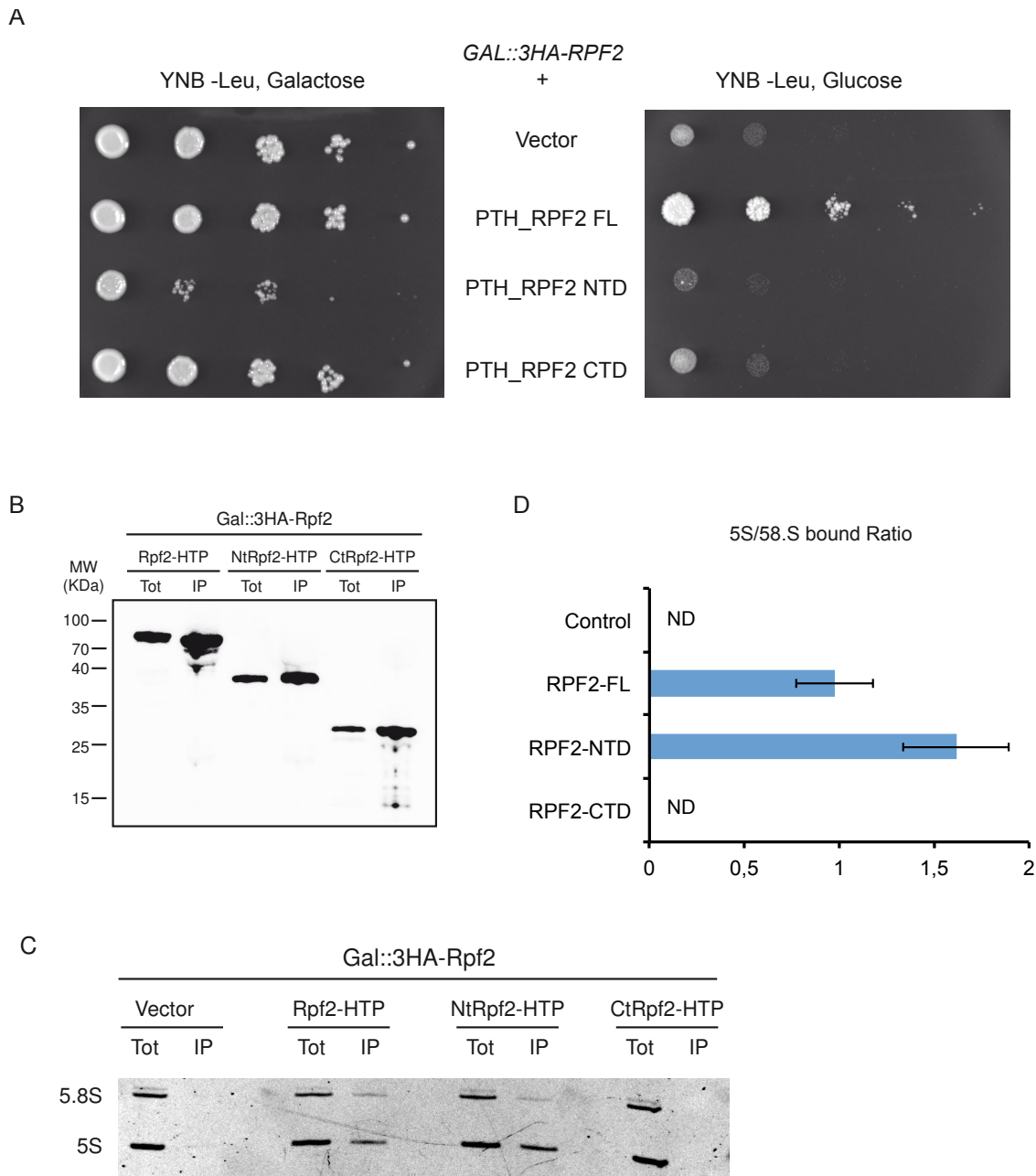
(A) Superposition of TFIIIA (PDB 1UN6) and Rpf2-Rrs1 bound to 5S shows that binding is mutually exclusive. TFIIIA is represented in yellow. (B) The threonyl-tRNA synthetase-tRNA(Thr) complex (PDB 1Q6F) was superposed on the BID domain of Rpf2. The Rpf2-Rrs1 complex is omitted for clarity. The binding of the aaRS anticodon binding domain to tRNA shows a different binding structure compared to the 5S RNA.



**Figure S5: Rpf2 binding to 5S RNA is not compatible with its conformation in mature ribosomes.**

The Proteins are colored as in Figure 5. The Rpf2-Rrs1 complex is superposed on the 5S RNP of mature 60S structure (Ben-Shem et al., 2011). The ribosome rRNA is represented in surface representation, the proteins have been omitted for clarity.





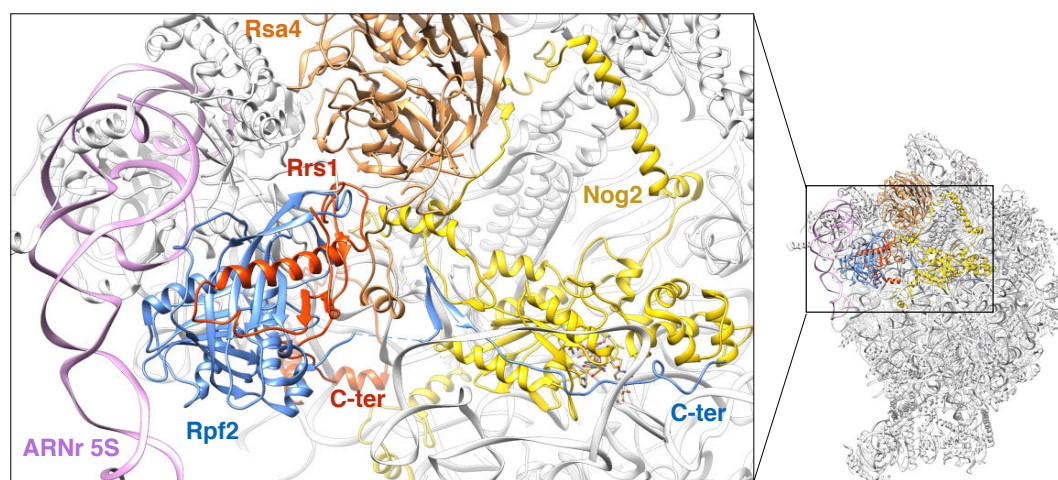
**Figure S6: Rpf2 C-terminal Domain is required for proper binding to pre-60S ribosomes**

(A) Drop test analysis of expression of Rpf2 full-length (FL), Rpf2 N-terminal domain (NTD, 1-252) and Rpf2 C-terminal domain (CTD, 252-344) mutants. Effect on growth of the expression of the different mutants was analysed either in presence (galactose) or in absence (glucose) of the endogenous copy of RPF2. (B,C and D) To test the capacity of the different mutants of RPF2-HTP, an immuno-precipitation experiment was performed using extract from cells grown in absence of the endogenous copy (Glucose). (B) Correct expression and precipitations of the different proteins was assessed by western-blot using anti-PAP antibodies. (C) RNAs co-precipitated with the different mutants were analysed on acrylamide gel stained by Ethidium Bromide, extract from cell transformed with empty vector was used as control. 5S and 5.8S species are indicated. (D) Ratio between percentage of 5S and 5.8S bound to the different Rpf2 mutants were quantified and reported as bars or as not determined (ND) when no amount was detected. Standard deviations between the different experiments are reported as error bars.

## VII. Discussion

Depuis 2015, trois autres groupes ont publié la structure du complexe Rpf2/Rrs1 issu de différents organismes : *Aspergillus nidulans* (Asano et al. 2015 ; Kharde et al. 2015) et *S. cerevisiae* (Sun et al. 2017). Pour toutes ces structures, les fragments cristallisés sont les mêmes, et correspondent à ceux obtenus au laboratoire après protéolyse ménagée. Par ailleurs, les structures du complexe Rpf2/Rrs1 sont très bien conservées entre ces deux organismes.

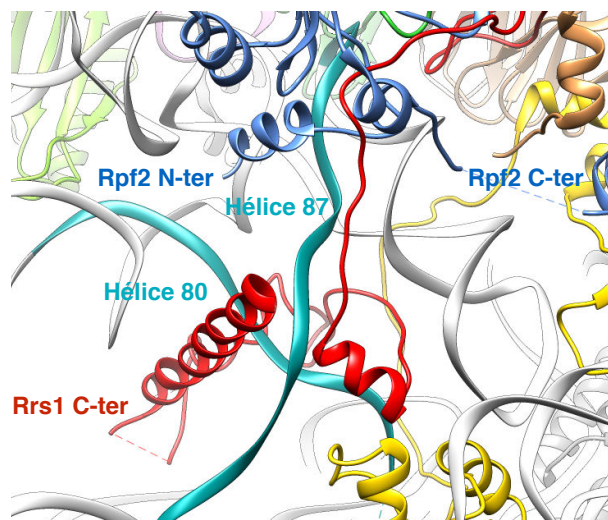
Depuis trois ans, l'essor de la cryo-microscopie électronique a profondément changé notre vision de la biogenèse du ribosome, en fournissant différentes structures de pré-ribosomes. La structure de la particule 66S de *S. cerevisiae* purifiée en utilisant le facteur d'assemblage Nog2 comme proie a été résolue en 2016 par le groupe de John Woolford (Wu et al. 2016). Dans ce modèle, la particule 5S est associée au complexe Rpf2/Rrs1 et n'a pas encore subi de rotation. Les données de microscopie à haute résolution (3,1Å contre 8,7Å pour la particule Arx1) ont également permis aux auteurs de reconstruire les extrémités C-terminales de Rpf2 et de Rrs1, qui contactent toutes deux le facteur d'assemblage Nog2 : Rpf2 (275-300) interagit directement avec son domaine GTPase, alors que Rrs1 (112-120) lie son extrémité N-terminale (**Figure 38**). Conformément aux données déjà décrites dans la littérature, la présence du dimère Rpf2/Rrs1 serait donc bien nécessaire au recrutement de la GTPase Nog2 à la surface des particules 66S avant le clivage en C<sub>2</sub> (Talkish et al. 2012). Durant notre étude, l'analyse des données CRAC nous a permis d'identifier deux sites de liaison pour Rpf2 au niveau



**Figure 38 : Structure de la particule Nog2**

Seuls l'ARNr 5S et les facteurs Rsa4, Rrs1, Rpf2 et Nog2 ont été colorés ici. le reste de la particule est en blanc. Nog2 interagit directement avec les extrémités C-terminales de Rpf2 et de Rrs1 (code PDB : 3JCT)

des hélices 80 et 87 de l'ARNr 25S. Nous avons attribué cette interaction à l'extension C-terminale de Rpf2. L'observation de cette région dans la structure des particules Nog2 montre bien une interaction entre Rpf2 et l'ARNr 25S, mais celle-ci est médiée par l'extension N-terminale de Rpf2. De manière plus étonnante, Rrs1 interagit également avec ces deux régions alors qu'aucun enrichissement particulier en ARN n'avait été observé lors de l'expérience de CRAC (**Figure 39**).



**Figure 39 : Interaction entre les hélices 80 et 87 de l'ARNr 25S et le complexe Rpf2/Rrs1 dans les pré-ribosomes**

Les sites d'interactions de Rpf2 sur l'ARNr 25S identifiés lors de l'expérience de CRAC sont représentés en bleu turquoise. Le reste de l'ARNr 25S est représenté en blanc.

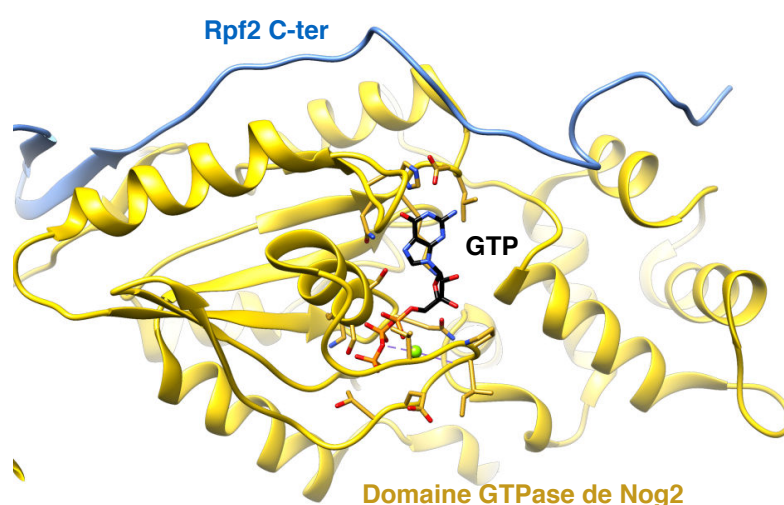
Dans la même étude, le groupe de John Woolford a publié deux autres structures de la particule Nog2. Cette série de modèles reflète les différents états intermédiaires de maturation des particules 66S associées à Nog2 avant leur export dans le cytoplasme. Dans ces deux autres états, le dimère Rpf2/Rrs1 est absent, et la particule 5S a atteint sa position finale après une rotation de 180°. Le deuxième état contient cinq « nouveaux » facteurs d'assemblage (Sda1, Ipi1, Ipi3, Rix1 et Rea1) et adopte une structure très similaire aux particules Rix1-Rea1 dont la structure a été résolue début 2016 par le groupe d'Ed Hurt ([Barrio-Garcia et al. 2016](#)). Le recrutement du complexe Rix1/Rea1 coïncide donc avec la dissociation du dimère Rpf2/Rrs1 des pré-ribosomes et avec la rotation de la particule 5S. Cependant, les mécanismes qui régissent ces événements sont encore mal connus.

L'AAA-ATPase Rea1 utilise l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour dissocier plusieurs facteurs d'assemblage des particules 66S. C'est notamment le cas du complexe Ytm1/Erb1 qui quitte les particules 66S à leur sortie du nucléole ([Bassler et al. 2010](#)). Dans un second temps,

Rea1 stimule d'une manière ATP-dépendante la dissociation du facteur d'assemblage Rsa4 en contactant directement son domaine UBL (Ulbrich et al. 2009). Cette étape engendrerait des réarrangements structuraux qui stimulent l'activité GTPase de Nog2. L'activation de Nog2 conduirait alors à son départ des sous-unités, et à la fixation du facteur d'export Nmd3 (Matsuo et al. 2014). La dissociation de Rsa4 par Rea1 provoquerait donc une réaction en chaîne qui aboutirait à l'export des sous-unités pré-60S.

Comme Rrs1 contacte directement le domaine UBL de Rsa4 dans les particules Nog2 et Arx1, nous avons dans un premier temps supposé que cette interaction était nécessaire au recrutement de l'ATPase Rea1 : le recyclage de Rsa4 serait alors couplé à celui du dimère Rpf2/Rrs1 et à la rotation de la particule 5S. Cependant, plusieurs éléments publiés récemment contredisent cette hypothèse. Ces éléments proviennent en partie de l'étude du mutant catalytique K1089A de Rea1 qui se fixe bien aux particules 66S, mais qui est incapable de provoquer la dissociation de Rsa4. L'étude de la structure de particules 66S Rea1 K1089A montre que l'ARNr 5S a déjà subit sa rotation et n'est plus associé au dimère Rpf2/Rrs1 (Barrio-Garcia et al. 2016). L'hydrolyse de l'ATP par Rea1 ne serait donc pas l'élément déclencheur de la rotation du 5S.

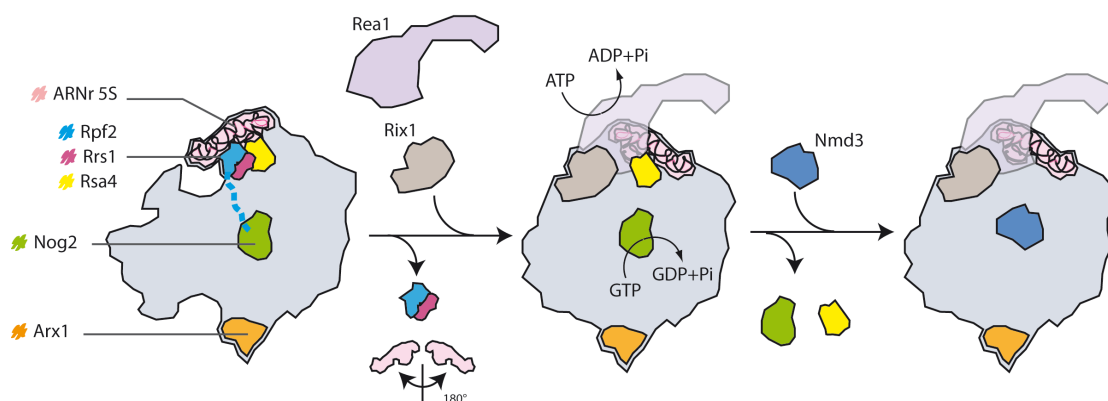
L'événement moléculaire précis qui déclenche la rotation de la particule 5S n'est pas connu à ce jour. L'étude structurale de particules 66S purifiées en utilisant la protéine Rix1 tronquée à son extrémité C-terminale (Rix1ΔC) nous apporte cependant quelques indices (Barrio-Garcia et al 2016). L'extension C-terminale de Rix1 est nécessaire au recrutement de l'ATPase Rea1, qui est donc absente des particules Rix1ΔC. Le dimère Rpf2/Rrs1 est toujours associé à ces particules, et l'ARNr 5S n'a pas encore subit sa rotation. La rotation de l'ARNr 5S



**Figure 40 : Interaction entre l'extrémité C-terminale de Rpf2 et le domaine GTPase de Nog2 dans les pré-ribosomes**

et le recyclage des facteurs Rpf2/Rrs1 surviendrait alors quelque part entre le recrutement de Rea1 et la dissociation de Rsa4.

D'autre part, la position du dimère Rpf2/Rrs1 sur l'ARNr 5S n'est pas compatible avec la conformation mature de la particule 5S. Il est donc évident que ces facteurs d'assemblage doivent être dissociés avant la rotation. Le complexe Rpf2/Rrs1 apparaît alors comme un inhibiteur de la rotation, en établissant des contacts étroits entre l'ARNr 25S, l'ARNr 5S et Rsa4. Il empêcherait ainsi la rotation de la particule 5S dans des ribosomes immatures, jusqu'au recrutement de l'AAA-ATPase Rea1. Rpf2 bloquerait également Nog2 à la surface des particules 66S en contactant directement son domaine GTPase (**Figure 40**). Comme Nog2 possède le même site de fixation que le facteur d'export Nmd3, l'interaction Nog2-Rpf2 empêcherait l'export cytoplasmique de sous-unités immatures qui ne possèdent pas la bonne conformation de la protubérance centrale. Le dimère Rpf2/Rrs1 serait alors essentiel dans la coordination des derniers événements nucléaires de la maturation de la grande sous-unité (**Figure 41**).



**Figure 41: Modèle de rotation de la particule 5S dans les pré-ribosomes**

## Chapitre II : Étude structurale du complexe Rpf2/Rrs1/ARNr 5S

---

La particule 5S influence directement les capacités de prolifération cellulaire. L'équilibre entre sa forme libre et sa forme liée au ribosome contrôle directement l'expression du facteur suppresseur de tumeur p53. En favorisant l'intégration de la particule 5S au sein des pré-ribosomes, les facteurs Rpf2 et Rrs1 participent indirectement à l'homéostasie de p53. L'étude de l'interaction entre Rpf2 et l'ARNr 5S revêt alors un intérêt particulier, puisque inhiber cette interaction reviendrait à stabiliser directement p53.

Les structures en microscopie électronique de pré-ribosomes (particules Arx1 et Nog2) ont permis de mieux caractériser l'interaction entre Rpf2 et l'ARNr 5S. Cependant, l'ARNr 5S se situe dans une région très mobile de la grande sous-unité. Cette flexibilité abaisse la résolution locale des cartes de microscopie électronique. Les détails atomiques de l'interaction entre Rpf2 et l'ARNr 5S ne sont donc pas connus. Nous avons donc entrepris une étude de la structure cristallographique du complexe 5S/Rpf2/Rrs1.

Pour cela, des essais de cristallisation ont été réalisés en utilisant différentes constructions d'ARNr 5S : un ARNr 5S endogène de *S. cerevisiae* purifié à partir d'une culture de souche sauvage de levure, une forme tronquée transcrite *in vitro* correspondant aux domaines  $\alpha$  et  $\beta$  de l'ARNr 5S de *S. cerevisiae*, et une forme synthétique correspondant à la boucle E de l'ARNr 5S de *S. cerevisiae*. Les différentes méthodes permettant la production et la purification de ces ARN sont décrites dans la première partie de ce chapitre. La seconde partie détaille les essais de cristallisation du complexe Rpf2/Rrs1/5S et les modèles structuraux obtenus.

## I. Reconstitution du complexe Rpf2/Rrs1/5S et essais de cristallisation

Les premiers essais de cristallisation du complexe ARNr5S/Rpf2/Rrs1 ont été réalisés avec l'ARNr 5S endogène de *S. cerevisiae*, purifié à partir d'une souche sauvage. Cette méthode présente plusieurs avantages comparée à la transcription *in vitro* classiquement utilisée pour la production de petits ARN destinés à être cristallisés. Elle permet l'obtention d'un ARNr 5S correctement replié et modifié *in vivo*. Les données de SAXS enregistrées pour cet ARNr 5S (cf publication) montrent en effet que la méthode de purification n'affecte pas la structure globale de la molécule.

### 1. Purification d'ARNr 5S endogène de *S. cerevisiae*

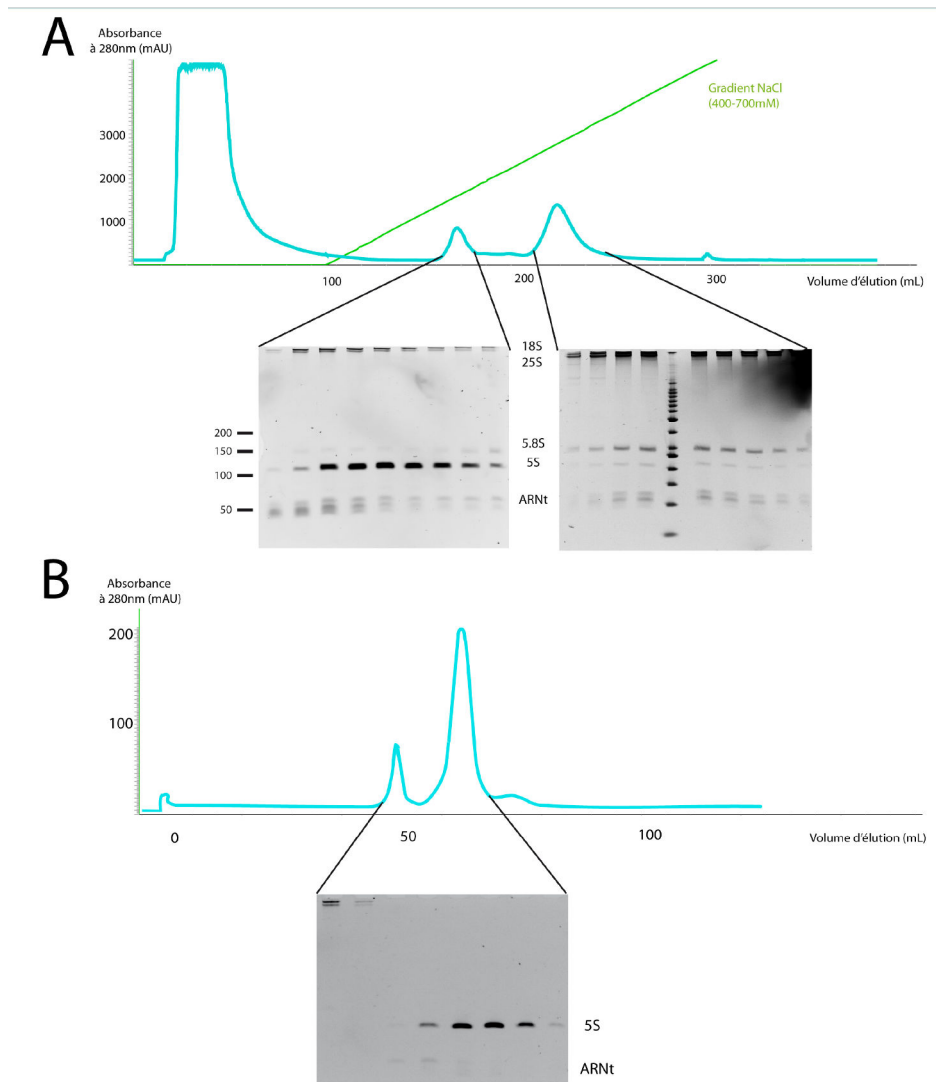
Une extraction d'ARN totaux d'une culture de souche sauvage de *S. cerevisiae* a été réalisée au phénol-chloroforme (voir matériel et méthode). L'ARNr 5S est ensuite purifié en suivant un protocole à deux étapes, comportant une chromatographie par échange d'ions suivie d'une chromatographie d'exclusion stérique. La chromatographie par échange d'ions a été réalisée sur une colonne monoQ chargée positivement. Les ARN retenus sur la colonne ont été élués par un gradient de sel (**Figure 42**). Le chromatogramme obtenu montre deux pics dont les fractions correspondantes ont été déposées sur gel 5% de polyacrylamide-urée 8M. Le premier pic élué correspond à un mélange de petits ARN (ARNt, 5S et 5.8S) alors que le deuxième pic contient l'ensemble des quatre ARNr ainsi que des ARNt. Les fractions collectées correspondant au premier pic ont été concentrées et injectées sur colonne d'exclusion stérique de type Superdex75. Les fractions contenant uniquement l'ARNr 5S ont été regroupées et dosées par spectrophotométrie UV : pour 3 litre de culture de levure, environ 1 mg d'ARNr 5S a été purifié.

### 2. Association avec Rpf2/Rrs1 et essais de cristallisation

Dans le but de caractériser les déterminants moléculaires de l'interaction entre le dimère Rpf2/Rrs1 et l'ARNr 5S, ce complexe a été reconstitué *in vitro*. Pour cela, l'ARNr 5S purifié a été incubé sur roue pendant 30 minutes avec un excès de complexe Rpf2/Rrs1 (rapport 1:3). Ce mélange a ensuite été injecté sur une colonne de chromatographie d'exclusion stérique Superdex200 et les fractions correspondant au complexe ARNr5S/Rpf2/Rrs1 ont été regroupées et concentrées dans le but de réaliser des essais de cristallisation.

Ces essais ont été réalisés par criblage robotisé de plusieurs kits de cristallisation commerciaux, mais aucun cristal n'a été obtenu. En suivant la même stratégie de cristallogénèse que pour le complexe Rpf2/Rrs1 seul, des essais de cristallisation ont ensuite été réalisés en présence de protéases (trypsine, chymotrypsine). Plusieurs essais ont également été

réalisés en présence de RNase A avec un rapport 1 : 1000 en masse dans les gouttes. Malgré ces différents traitements, le complexe 5S/Rpf2/Rrs1 n'a pas pu être cristallisé.



**Figure 42 : Purification de l'ARNr 5S endogène de *S. cerevisiae***

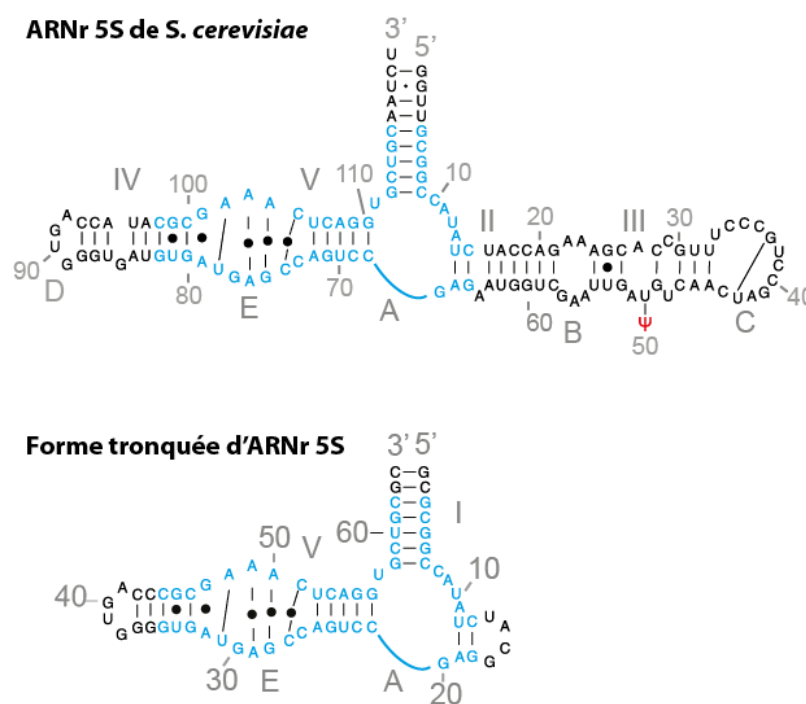
(A et B) Photographie des cristaux obtenus pour le complexe Rpf2/Rrs1 natif et (D et E) en présence de trypsine. (C) Profil de digestion du complexe Rpf2/Rrs1 en présence de Trypsine. Les bandes marquées d'une astérisque ont été identifiées en spectrométrie de masse. Le fragment de 30kDa appartient à Rpf2, Les fragments de 12 et 5 kDa appartiennent à Rrs1.



## II. Production d'une forme tronquée d'ARNr 5S et essais de cristallisation

### 1. Choix de la construction d'ARN

Afin de réduire la flexibilité de l'ARNr 5S et faciliter l'obtention de cristaux, j'ai décidé de produire une forme tronquée d'ARNr 5S par transcription *in vitro* (appelée 5SΔ). Le domaine β de l'ARNr 5S qui correspond au site de fixation des protéines RpL5 et RpL11 a été supprimé et les domaines α et γ ont été raccourcis (**figure 43**). Cet ARN de 64 nucléotides est similaire à celui contenu dans la structure du complexe 5S/TFIIIA résolue en 2003 par l'équipe d'Aaron Klug (Lu et al. 2003).



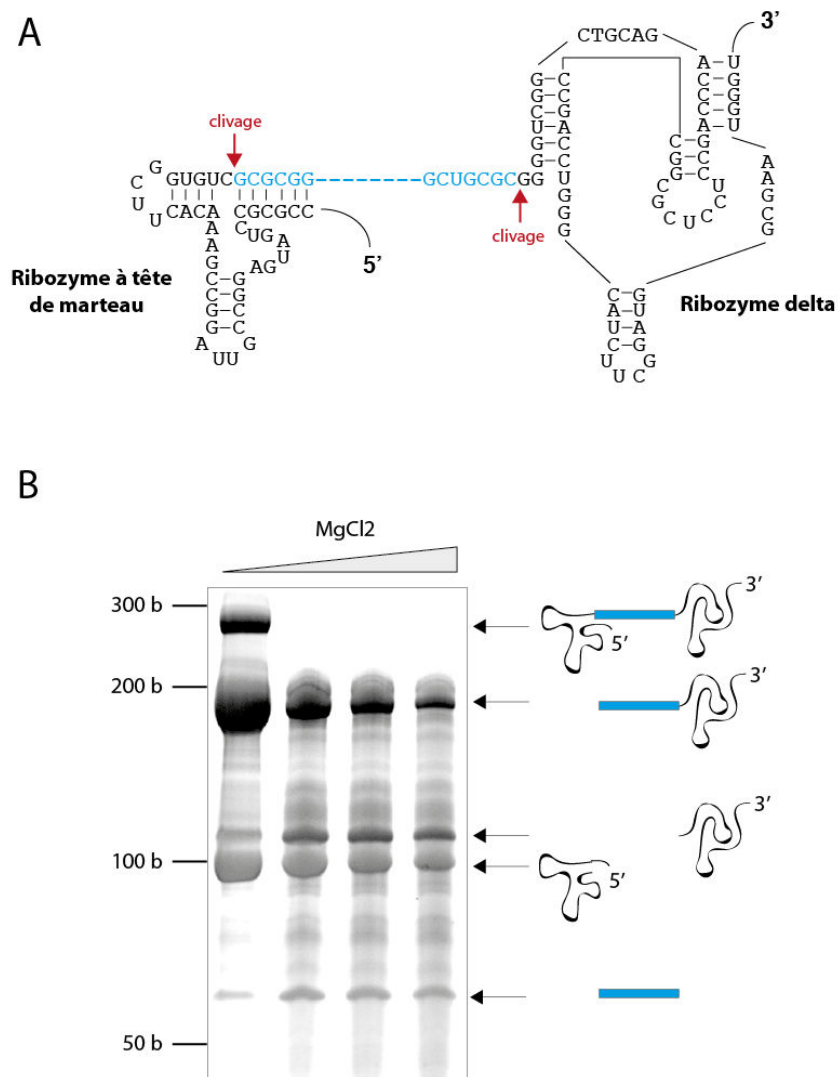
**Figure 43 : Forme tronquée d'ARNr 5S**

Représentation des structures secondaires de l'ARNr 5S de *S. cerevisiae* et de l'ARNr 5S tronqué transcrit *in vitro*. Les séquences conservées entre ces deux ARN sont représentées en bleu.

## 2. Transcription *in vitro*

J'ai choisi d'utiliser un système de transcription *in vitro* utilisant l'ARN polymérase du phage T7. L'inconvénient majeur de la transcription T7 est qu'elle mène à l'obtention d'une population de transcrits souvent hétérogènes. En effet, outre la dissociation précoce de la polymérase qui conduit à la formation de transcrits abortifs, des nucléotides non-codés appelés « n+1 » peuvent être ajoutés à l'extrémité 3' (Milligan et al. 1987 ; Kholod et al. 1998). Certains nucléotides additionnels peuvent également être transcrits au niveau de l'extrémités 5' (Pleiss et al. 1998 ; Helm et al. 1999). Cette hétérogénéité est un obstacle à la cristallogénèse. Une solution possible est d'introduire en amont et en aval de la séquence transcrite des ribozymes auto-clivables. Ces séquences particulières d'ARN sont retrouvées *in vivo*, notamment chez des viroïdes pathogènes de plantes, et sont aujourd'hui utilisées en transcription *in vitro* pour pallier ce problème d'hétérogénéité. En effet, la coupure autocatalytique de ces ribozymes se fait en des sites précis, de manière reproductible. La réaction de clivage ne nécessite aucun apport énergétique ou partenaire protéique et requiert la présence d'ions métalliques divalents.

Deux types de ribozymes ont été utilisés : un ribozyme à tête de marteau en 5', et un ribozyme du virus de l'hépatite delta (ou ribozyme delta) en 3' (**Figure 44A**). Ces ribozymes sont constitués de 90 et 110 bases respectivement. Ils sont sensiblement plus longs que l'ARNr 5S tronqué (64 nucléotides), ce qui permet de discriminer facilement les différents transcrits après clivage et dépôt sur gel. La transcription *in vitro* a été réalisée à 37°C à partir d'une matrice d'ADN plasmidique (voir matériel et méthodes) Les ARN obtenus après 4 heures de transcription *in vitro* ont été déposés sur gel 5% polyacrylamide-urée 8M (**Figure 44B**). Conformément aux données de la littérature, l'analyse du profil de migration révèle un clivage co-transcriptionnel majoritaire du ribozyme à tête de marteau présent à l'extrémité 5'. En revanche le clivage co-transcriptionnel en 3' du ribozyme delta est minoritaire, et doit être optimisé. Plusieurs paramètres pouvant influencer l'efficacité de cette réaction ont été testés, comme la concentration en MgCl<sub>2</sub> (**Figure 44B**), la température, ou encore le volume réactionnel (données non présentées). Malgré ces différents tests, les rendements n'ont été que très légèrement améliorés. Les conditions de clivage ainsi déterminées sont détaillées dans le matériel et méthode. L'ARN d'intérêt a ensuite été purifié sur gel, et dosé au spectrophotomètre UV : pour 1 mL de transcription *in vitro*, environ 60µg d'ARN 5SΔ ont été purifiés. Les différentes expériences de transcription *in vitro* et de clivage réalisées au laboratoire m'ont permis de purifier environ 300µg d'ARN 5SΔ.



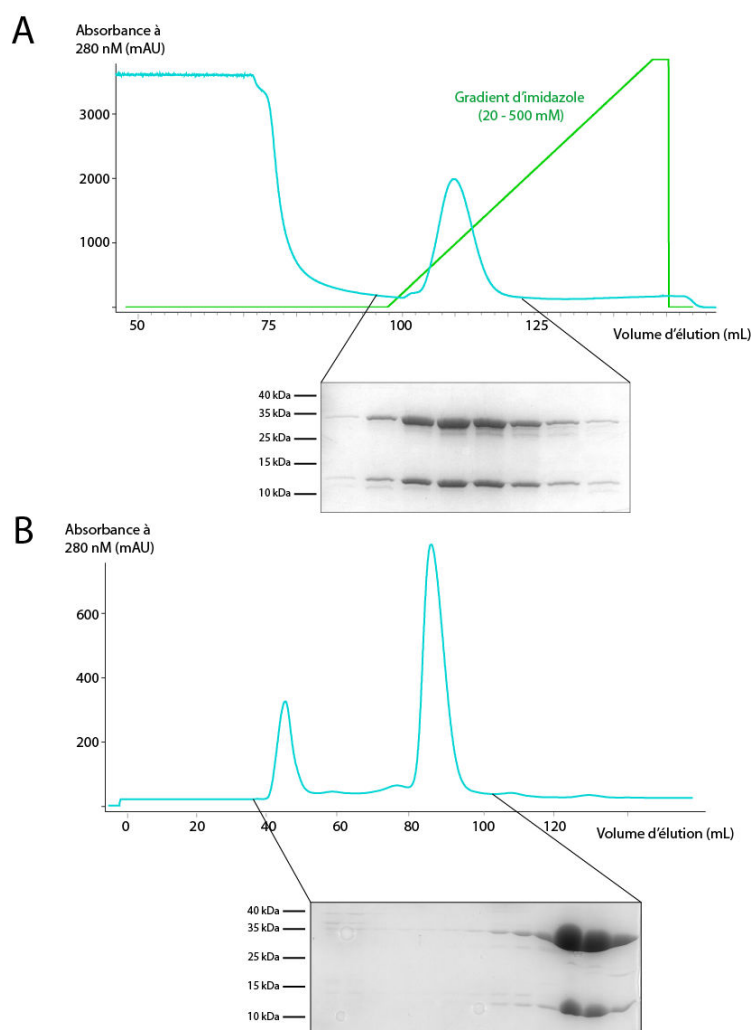
**Figure 44 : Transcription *in vitro* de l'ARNr 5S tronqué**

(A) Représentation de la structure secondaire des ribozymes à tête de marteau et delta, respectivement en 5' et en 3' de la séquence codante. (B) Détermination des conditions de clivage. Les échantillons obtenus après transcription *in vitro* (piste 1) ont été incubés pendant 10 minutes à 80°C puis 4H à 55°C en présence de différentes concentrations de  $MgCl_2$  (25, 50 et 100 mM), puis déposés sur gel 5% polyacrylamide-urée 8M

### 3. Purification du complexe Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$

Pour faciliter les essais de cristallisation, j'ai choisi de produire et de purifier une forme tronquée du complexe Rpf2/Rrs1 (appelée Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$ ). Ce dimère correspond

exactement à la forme cristallisée. Les ADN codants pour les fragments de Rpf2 (23-252) et de Rrs1 (9-103) cristallisés ont été clonés dans un plasmide polylistronique. L'expression et la purification du complexe Rpf2 $\Delta$ Rrs1 $\Delta$  ont été réalisées de la même façon que pour le complexe pleine-taille (**Figure 45**).

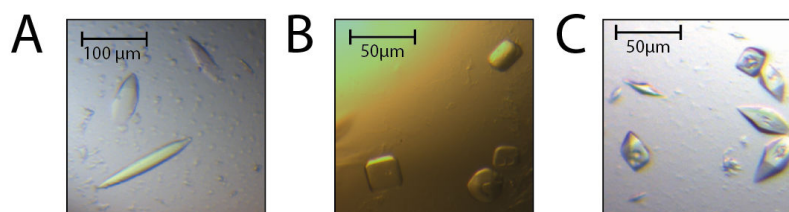


**Figure 45 : Purification du complexe Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$**

(A) Chromatogramme représentant le profil de purification du complexe Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$  par affinité (His-Trap) en fonction du gradient en imidazole (20-500mM). Les fractions collectées correspondant au pic d'absorbance sont analysées en SDS-PAGE 15%. (B) Chromatogramme représentant le profil de purification du complexe Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$  par exclusion de taille (Superdex 200). Les fractions collectées correspondant au pic d'absorbance sont analysées en SDS-PAGE 15%.

#### 4. Reconstitution du complexe 5SΔ/Rpf2Δ/Rrs1Δ et essais de cristallisation

Des quantités équimolaires d'ARN 5SΔ et du complexe Rpf2Δ/Rrs1Δ ont été incubées sur roue pendant 30 minutes à 20°C. Devant les quantités limitées d'ARN 5SΔ obtenues, et afin de limiter les pertes d'échantillon, j'ai décidé de ne pas purifier ce complexe par chromatographie d'exclusion stérique. Les essais de cristallisation ont donc été effectués directement à partir de ce mélange. Trois kits de cristallisation différents ont pu être testés et deux conditions ont mené à l'apparition de cristaux qui ne diffractent pas les rayons X (**Figure 46A et 46B**). Des cristaux ont également été obtenus dans les mêmes conditions de cristallisation que pour le complexe Rpf2/Rrs1 seul (**Figure 46C**). Un jeu de données a pu être collecté au synchrotron à une résolution de 3Å. Cependant, Le traitement de ces données a rapidement montré que l'ARNr 5SΔ n'était pas présent dans ces cristaux.



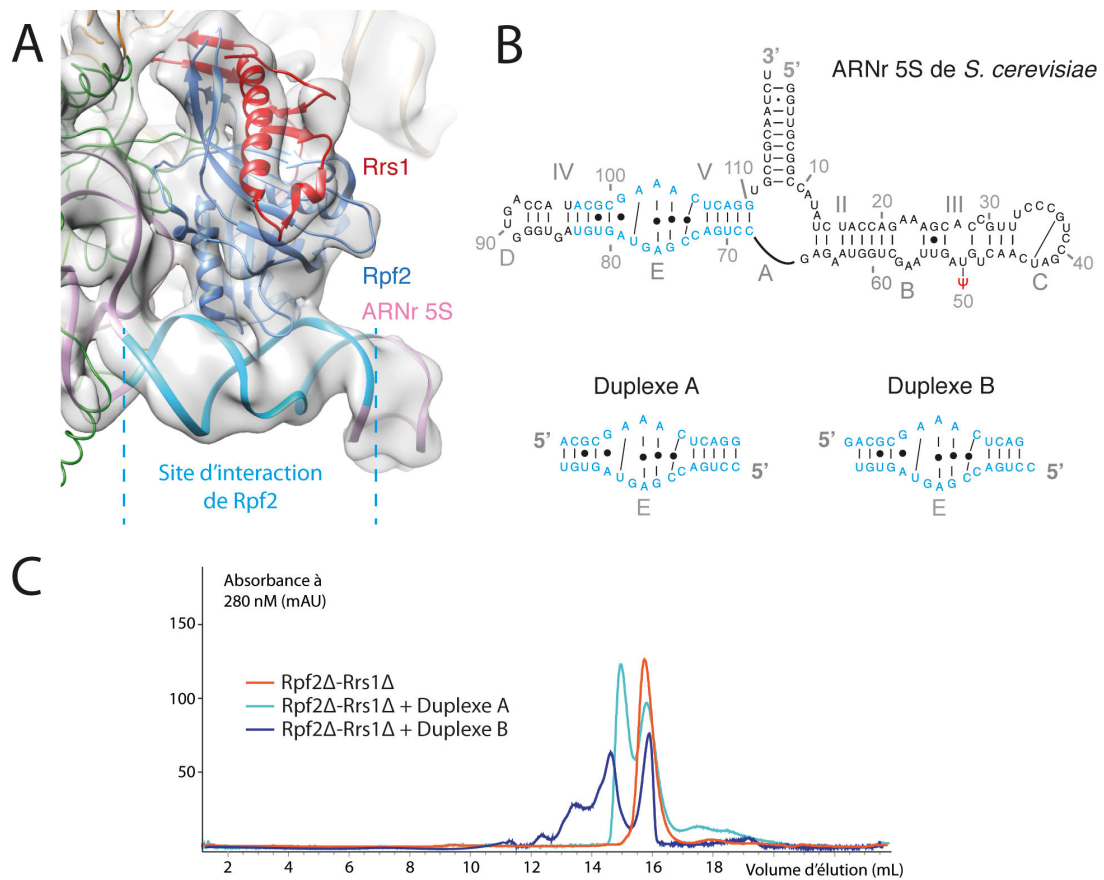
**Figure 46 : Cristaux obtenus pour le complexe 5SΔ/Rpf2Δ/Rrs1Δ**

### III. Reconstitution de la boucle E de l'ARNr 5S et essais de cristallisation

Devant les difficultés rencontrées lors des expériences de transcription *in vitro*, des ARN de synthèse ont été commandés dans le but de reconstituer le site de fixation du dimère Rpf2/Rrs1 sur l'ARNr 5S. Ces oligonucléotides d'une quinzaine de nucléotides s'hybrident deux à deux pour reconstituer la boucle E de l'ARNr 5S.

#### 1. Choix de la construction d'ARN

Le choix des oligonucléotides a été effectué en observant la structure des pré-ribosomes contenant le complexe Rpf2/Rrs1 associé à l'ARNr 5S (Particules purifiée avec Arx1 comme proie, code PDB : AV7F). À partir de ce modèle, j'ai déterminé la longueur minimale de l'ARN nécessaire à la fixation de Rpf2 (**Figure 47A**). Les régions de l'ARN qui ne contactent pas Rpf2 ont été enlevées afin de limiter la flexibilité. Deux duplexes différents (A et B) ont été utilisés. Ils possèdent des séquences quasi-identiques, et diffèrent juste par la nature de leurs extrémités. Le duplexe A possède des bouts-francs alors que le duplexe B possède des bouts-



**Figure 47 : Reconstitution de la boucle E de l'ARNr 5S**

(A) Interaction entre Rpf2 et l'ARNr 5S (codes PDB : 5A53 et AV7F). Les séquences qui correspondent aux duplexes A et B sont représentées en bleu sur l'ARNr 5S. (B) Représentation des structures secondaires de l'ARNr 5S de *S. cerevisiae* et des deux duplexes d'ARN utilisés pour les essais de cristallisation (C) Caractérisation des complexes Rpf2Δ/Rrs1Δ, DuplexeA/Rpf2Δ/Rrs1Δ et DuplexeB/Rpf2Δ/Rrs1Δ par chromatographie d'exclusion stérique analytique

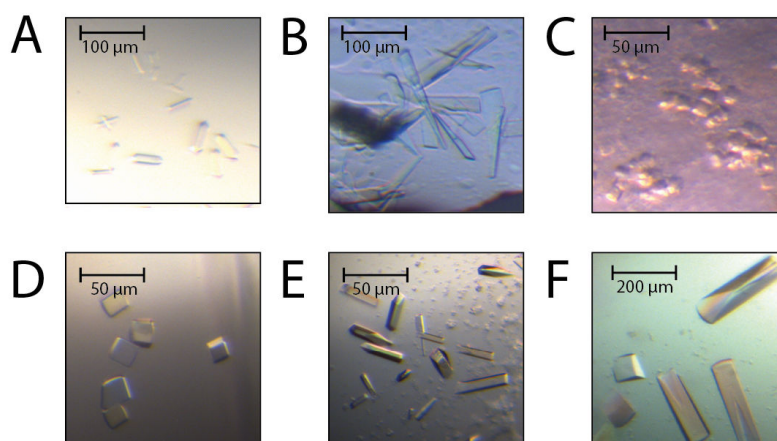
cohésifs (**Figure 47B**). Le duplexe B est donc capable de former des concatémères, qui pourraient faciliter les contacts cristallins entre différents complexes ARN-protéine.

## 2. Reconstitution du complexe et essais de cristallisation

Dans un premier temps, j'ai voulu tester l'association entre ces duplexes et le dimère Rpf2Δ/Rrs1Δ par chromatographie d'exclusion stérique. Des solutions contenant le complexe Rpf2Δ/Rrs1Δ seul, ou incubé en présence des 2 duplexes A et B en quantité équimolaire ont été injectées sur colonne analytique superdex S200 10/300. Les chromatogrammes obtenus sont présentés dans la **figure 6**. Dans les deux cas, la présence des duplexes provoque l'apparition

de pics pour des volumes d'élution plus faibles, caractéristiques de complexes de plus haut poids moléculaire. Le chromatogramme obtenu en présence de duplexe A montre 2 pics différents : un pic à 16mL contenant le complexe Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$  et un autre pic à 15mL. Ce volume d'élution correspond à une masse moléculaire apparente de 50 kDa, proche de celle du complexe DuplexeA/Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$  (45kDa). D'autre part, le chromatogramme obtenu avec le duplexe B montre 4 pics différents : le pic à 16mL, correspondant au complexe Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$  seul, et 3 pics à 12,5mL, 13,5mL et 14,5mL associés à des masses moléculaires apparentes de 135, 90 et 55 kDa respectivement. L'apparition de ces pics suggère donc l'existence de complexes contenant plusieurs duplexes B et/ou plusieurs dimères Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$ .

Encore une fois, les premiers essais de cristallisation ont été réalisés au robot Mosquito, Le dimère Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$  a été incubé en présence des duplexes A ou B (stoechiométrie 3:4) pendant 30 minutes à 20°C. Les essais de cristallisation ont été réalisés directement à partir de ce mélange, sans étape de purification supplémentaire. Aucun cristal n'a été obtenu en utilisant le duplexe A. En revanche, des cristaux obtenus en présence du duplexe B ont été observés dans 5 conditions (**Figure 48**). Les cristaux montrés dans la **figure 48E** ont été emmenés au synchrotron et ont diffracté les rayons X à une résolution de 8Å. Après de nombreuses optimisations des conditions de cristallisation, j'ai obtenu de plus gros cristaux (environ 200 $\mu$ m) (**Figure 48F**) qui ont diffracté à plus de 3,5Å de résolution.



**Figure 48 : Cristaux du complexe DuplexeB/Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$**

*Les cristaux en A, B, C, D, et E ont été obtenus par criblage robotisé des conditions de cristallisation. Les cristaux en F ont été obtenus après plusieurs optimisations manuelles.*

## IV. Résolution de la structure

### 1. Traitement des données de diffraction

Ces étapes ont été réalisées avec le logiciel XDS (Kabsch 2010). La liste des groupes d'espace ainsi que les paramètres de mailles compatibles avec la position des taches de diffraction sont présentés dans le **tableau #1**.

Réseau	Pénalité	Paramètres de maille (Å)						Groupes d'espaces
		a	b	c	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	
Triclinique Primitif	0	75.3	99.6	99.8	81.8	67.9	67.9	P1
Monoclinique à bases centrées	1	75.3	184.9	99.6	90.0	112,1	90.0	C2
Monoclinique à bases centrées	1.2	75.3	184.5	99.8	90.0	112,1	89.9	C2
Monoclinique à bases centrées	1.2	184.5	75.3	184.5	90.0	134.9	89.9	C2
Orthorhombique à faces centrées	1.4	75.3	184.5	184.9	89.9	90.0	90.1	F222 F212121
Monoclinique à bases centrées	4.40	150.7	130.5	75.3	90.0	119.9	90.1	C2
Orthorhombique corps centré	5.30	75.3	130.5	130.7	89.9	89.9	90.0	I222
<b>Tétragonal à corps centré</b>	<b>5.50</b>	<b>130.7</b>	<b>130.7</b>	<b>75.5</b>	<b>90.0</b>	<b>90.0</b>	<b>90.1</b>	<b>I4 I41</b>

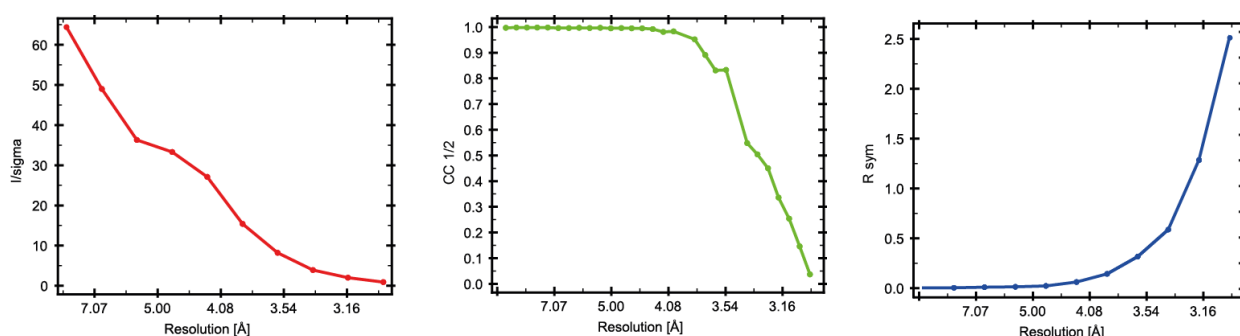
**Tableau 4 : Indexation du jeu de données du complexe duplexeB/Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$**

Les résultats de l'indexation des tâches pour un des cristaux obtenus sont classés en fonction du score de pénalité. Le réseau choisi est représenté en bleu.

Les cristaux du complexe DuplexeB/Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$  adoptent un réseau cristallin tétragonal à corps centré, et sont caractérisés par les paramètres de maille  $a=b=130.68\text{\AA}$ ,  $c=75.48\text{\AA}$ ,  $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ . L'inspection des axes du réseau réciproque n'a pas montré d'extinctions systématiques caractéristiques de la présence d'axes hélicoïdaux. Les données ont été intégrées en choisissant le groupe d'espace I4.

La mise à l'échelle et la moyennation des intensités ont été réalisées avec le logiciel XSCALE (Kabsch 2010). Les statistiques obtenues lors de ces étapes sont montrées dans la **figure 49**. J'ai choisi ici de couper la résolution à  $3,37\text{\AA}$ , en fonction de la valeur du coefficient de corrélation  $CC1/2 = 0,6$ . Le calcul du coefficient de Matthews prédit la présence d'une ou deux molécules dans l'unité asymétrique. Les valeurs de ce coefficient, les volumes de solvants associés, et les scores de confiance pour chaque solution sont montrés dans le **tableau 5**.





**Figure 49 : Statistiques de mise à l'échelle du jeu de données**

Ces graphiques représentent les valeurs de  $I/\Sigma$  (en rouge), de  $R_{SYM}$  (en bleu) et de  $CC1/2$  (en vert) en fonction de la résolution

Nombre de molécules dans l'unité assymétrique	Coefficient de Matthews (en Å <sup>3</sup> /Da)	Volume de solvant (en %)	Probabilité
1	3.5	67.7	0.92
2	1.75	35.5	0.08

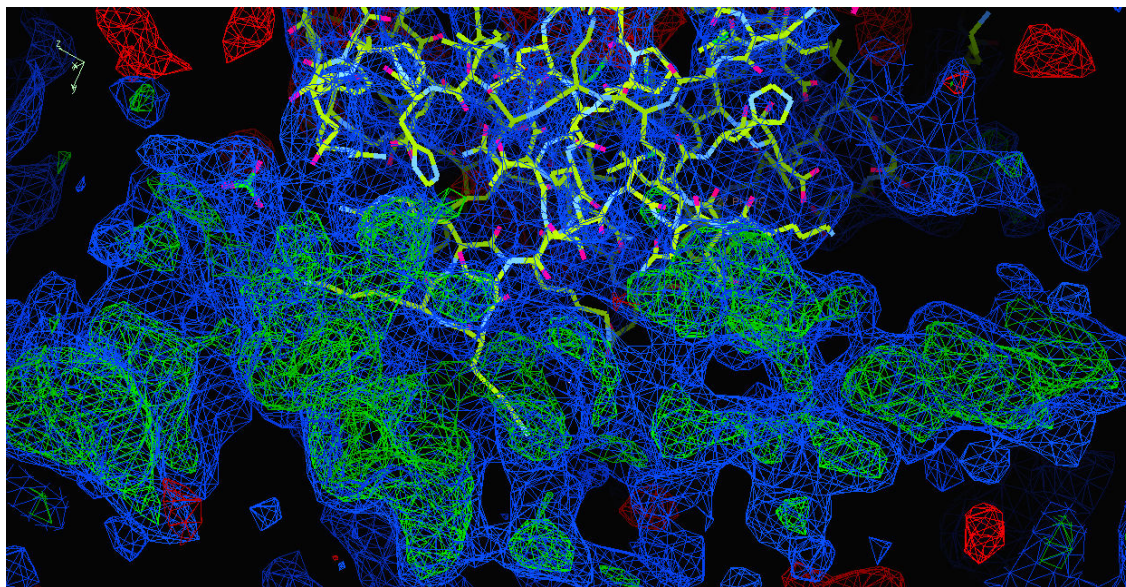
**Tableau 5 : Coefficient de Matthews pour les cristaux du duplexeB/Rpf2Δ/Rrs1Δ**

## 2. Phasage et construction du modèle

Le phasage a été effectué par remplacement moléculaire à l'aide du programme PHASER. Le modèle utilisé pour le remplacement moléculaire correspond à la structure du complexe Rpf2/Rrs1 trypsinolysée (code PDB : 5a53). La **figure 50** montre les cartes de densité électronique  $F_o-F_c$  et  $2F_o-F_c$  calculées après le remplacement moléculaire, et dans lesquelles le modèle du complexe Rpf2/Rrs1 a été placé. Dans la carte  $F_o-F_c$ , les pics positifs sont affichés en vert et correspondent à des régions ou des atomes (des électrons en réalité) sont absents, et doivent être ajoutés au modèle initial. Ces cartes montrent la présence d'une densité électronique résiduelle, située au niveau du site d'interaction entre Rpf2 et la boucle E de l'ARNr 5S (figure#). Le duplexe B est donc bien présent dans ces cristaux, et au bon endroit.

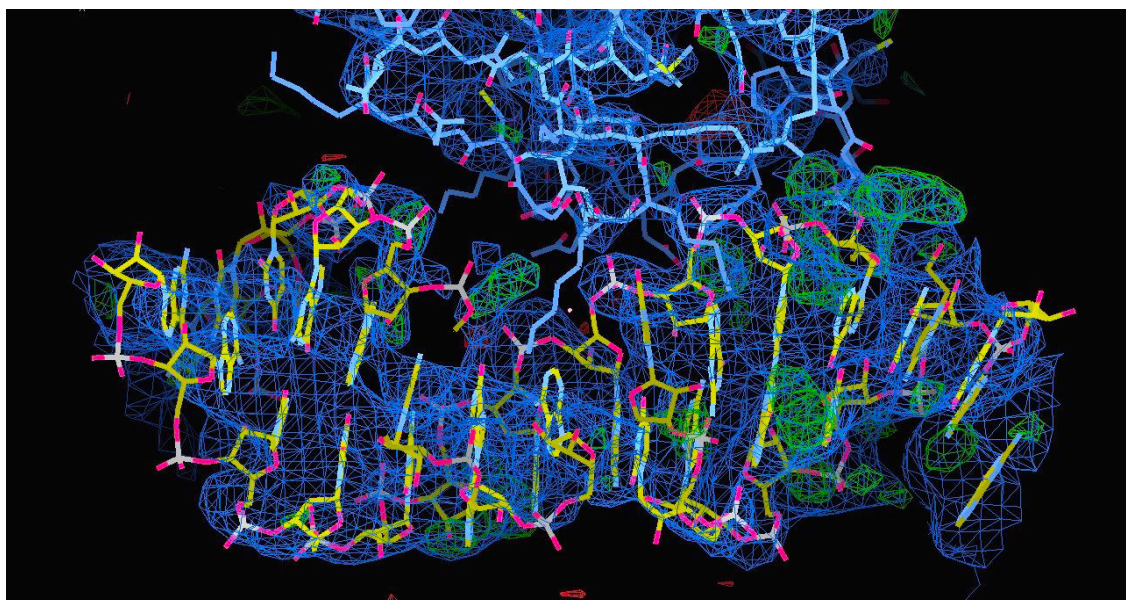
Afin de reconstruire la partie ARN manquante, j'ai placé dans cette région un modèle de la boucle E de l'ARNr 5S (tiré de la structure du ribosome mature, code PDB : AV7R). Les étapes d'affinement ont ensuite été réalisées avec les programmes PHENIX.REFINE (Adams et al. 2010 ; Afonine et al. 2012), REFMAC5 (Murshudov et al. 1997), PHENIX.ROSETTA (DiMaio et al. 2013) et LORESTR (Kovalevskiy et al. 2016). Même si ces étapes ont permis de considérablement abaisser les facteurs  $R_{WORK}$  et  $R_{FREE}$  (respectivement 0,32 et 0,36), je n'ai pas

réussi à reconstruire convenablement la partie ARN du modèle. En effet, la zone d'interaction protéine/ARN est très mal définie et discontinue (**Figure 51**). Les statistiques obtenues lors du traitement des données et de la construction du modèle sont résumées dans le **tableau 6**.



**Figure 50 : Carte de densité électronique calculée après remplacement moléculaire**

La carte  $2Fo-Fc$  est représentée en bleu. La carte  $Fo-Fc$  est représentée en vert (pics positifs) et en rouge (pics négatifs). Rpf2 est représenté en jaune.



**Figure 51 : Carte de densité électronique calculée après affinement**

La carte  $2Fo-Fc$  est représentée en bleu. La carte  $Fo-Fc$  est représentée en vert (pics positifs) et en rouge (pics négatifs). Rpf2 est représenté en bleu clair et le duplexe B est représenté en jaune.

## V.

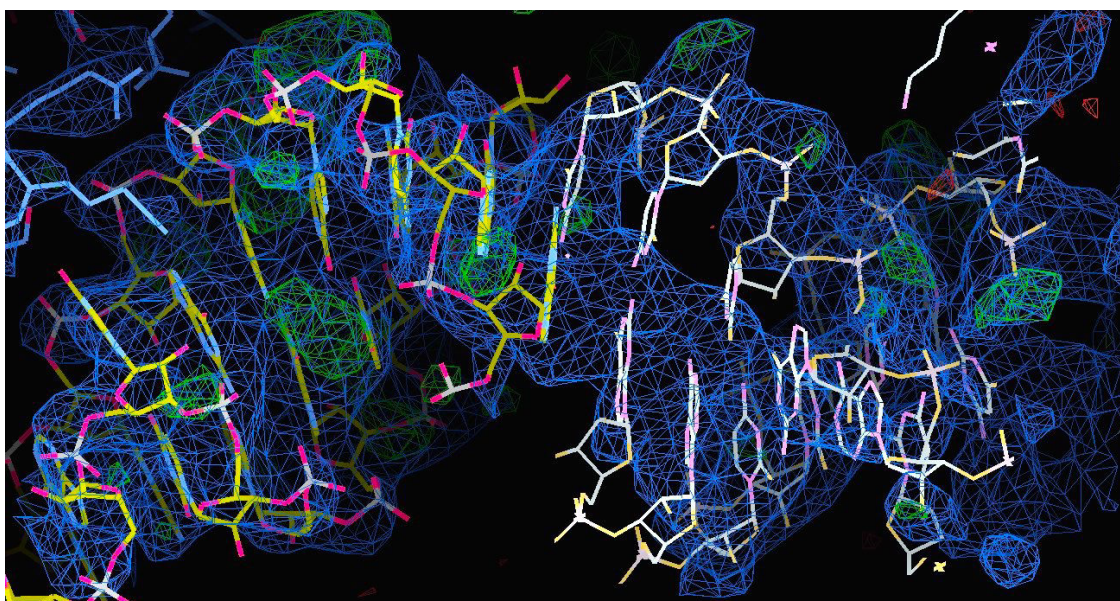
LONGUEUR D'ONDE (Å)	0,934 Å
RÉSOLUTION (Å)	50 - 3,37
GROUPE D'ESPACE	I 4
PARAMÈTRES DE MAILLE	130,68 130,68, 75,48
RÉFLECTIONS TOTALES	125372 (17449)
RÉFLECTIONS UNIQUES	12897 (1811)
MULTIPLICITÉ	9,7 (9,6)
COMPLÉTUDE	99,6% (97,9%)
I/σ(I)	17,1 (1,4)
FRACTION DE SOLVANT	69,8 %
R <sub>SYM</sub>	0,068(0,589)
CC1/2	0,999 (0,6)
CC*	1 (0,9)
R <sub>WORK</sub>	0,32(0,41)
R <sub>FREE</sub>	0,36 (0,38)

**Tableau 6 : Statistiques des traitements de données et d'affinement du modèle**

## VI. Discussion

Les données enregistrées au synchrotron pour les différents cristaux du complexe duplexeB/Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$  m'ont permis d'obtenir un modèle à basse résolution. Plus d'une centaine de ces cristaux obtenus ont été testés, mais seulement trois ont diffracté à une résolution inférieure à 4Å. L'optimisation des conditions de cristallogénèse est toujours en cours en jouant sur la température, l'utilisation de kits d'additifs et de différents cryo-protectants, ou encore en modifiant les conditions de pêche.

Dans notre cas, l'utilisation de duplexes synthétiques d'ARN à bouts cohésifs semble faciliter la cristallogénèse. En effet, aucun cristal n'a été obtenu avec le duplexe A à bouts francs. De plus, les cartes obtenues suggèrent que le duplexe B forme bien des concatémères à l'intérieur du cristal, en contactant les molécules d'ARN de l'unité asymétrique voisine (**Figure 52**).



**Figure 52 : Le duplexe B forme des concatémères dans le cristal**

*Les duplexes B de deux unités asymétriques voisines sont représentés en jaune et en blanc*



# Chapitre III : Rpf2 et Rrs1 dans la régulation de la transcription par l'ARN polymérase I

---

Durant ma dernière année de thèse, je me suis intéressé à un autre rôle du complexe Rpf2/Rrs1 dans la régulation de la biogenèse du ribosome. Outre leur fonction dans l'intégration de la particule 5S, ces deux facteurs influencent directement la transcription du pré-ARN 35S par l'ARN polymérase I. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe d'Anthony Henras au LBME de Toulouse.

Dans la première partie de ce chapitre, je décrirai les expériences qui ont permis à cette équipe de mettre en évidence le rôle du dimère Rpf2/Rrs1 dans la régulation de la transcription. Dans la seconde partie, je détaillerai les différents tests d'association entre Rpf2/Rrs1 et la polymérase que j'ai réalisés au laboratoire.

## I. Rpf2 et Rrs1 s'associent à la chromatine et stimulent la transcription des ARNr

Certains composants des particules pré-ribosomiques peuvent interagir avec la chromatine et l'ARN polymérase I pour coordonner la transcription et la maturation des ARNr. C'est notamment le cas du complexe Noc1/Noc2/Rrp5, un sous-complexe retrouvé dans les particules 90S et pré-60S. Ce complexe est capable d'interagir avec certaines sous-unités de l'ARN polymérase I (Rpa49 et Rpa43), avec certaines protéines impliquées dans la modification et l'organisation de la chromatine (Hmo1, Pwp1 et Frp4), et avec l'ADNr (Hierlmeier et al. 2013). L'hélicase Prp43, qui s'associe aux particules 90S dans les étapes précoces de la biogenèse du ribosome est également retrouvée associée à différentes sous-unités de l'ARN polymérase I (Rpa190, Rpa135, Rpa49, Rpa34, Rpc19) (Lebaron et al. 2005). La protéine Gno1, partenaire de Prp43 est également retrouvée associée en double hybride à la sous unité Rpa34 de l'ARN polymérase I (Beckouet et al. 2008).

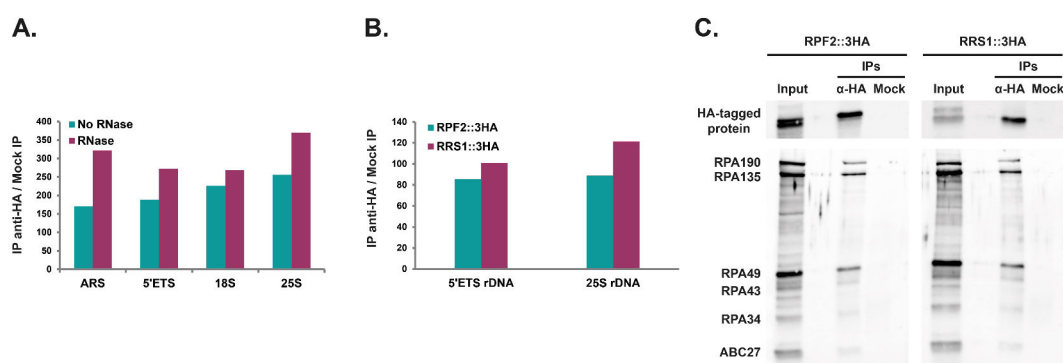
En 2006, une étude d'interaction à grande échelle utilisant la méthode de purification en tandem (*TAP-tag*) de 4562 protéines de *S. cerevisiae*, couplée à une analyse systématique en spectrométrie de masse, a permis de mettre en évidence des interactions entre Rpf2 et plusieurs facteurs associés à la chromatine (Krogan et al. 2006). Rpf2 est notamment retrouvé associé au facteur Chd1, impliqué dans le remodelage de la chromatine et dans la transcription par l'ARN polymérase I (Jones et al. 2007), et à la méthyl-transférase Set2, impliquée dans la modification d'histones.

Afin de caractériser le rôle de Rpf2 dans la régulation de la transcription, l'équipe d'A. Henras a réalisé une expérience de purification en tandem (*TAP-tag*) en utilisant un protocole spécialement conçu pour détecter des facteurs associés à la chromatine chez *S. cerevisiae*. En plus de nombreux composants des particules 90S et 60S, Rpf2 a été trouvé fortement associé à la sous-unité Rpa49 de l'ARN polymérase I, ainsi qu'à plusieurs facteurs impliqués dans le remodelage de la chromatine. Parmi ces facteurs, on trouve les protéines ORC2 et ORC6, composants des complexes ORC (pour *Origin Recognition Complex*) impliqués dans la reconnaissance des origines de réplication chez tous les eucaryotes. Ces protéines sont abondantes dans le nucléole de la levure, puisque les origines de réplication sont localisées entre chaque répétition d'ADNr. Rpf2 a également été trouvé spécifiquement associé à des protéines impliquées dans les modifications d'histone, comme Frp4 ou Set2.

Des expériences d'immunoprecipitation de chromatine (*ChIP*) ont également montré que Rpf2 et Rrs1 pouvaient interagir directement avec la chromatine *in vivo*. Rpf2 et Rrs1 sont en effet retrouvés associés à différentes régions de l'ADNr (5'ETS, 18S et 25S). D'autre part, ces

interactions ne semblent pas être médiées par des particules pré-ribosomiques, puisqu'elles persistent en cas de traitement à la RNase A (**Figure 53A et 53B**). Enfin, des expériences de co-immunoprécipitations de Rpf2 et Rrs1 en présence d'extraits de chromatine ont révélé la présence de différentes sous-unités de l'ARN polymérase I (**Figure 53C**). L'ensemble de ces données suggèrent donc que Rpf2 et Rrs1 sont capables de s'associer à la fois avec l'ADNr, mais également avec certaines sous-unités de l'ARN polymérase I. En revanche, ces expériences ne permettent pas de savoir si ces interactions sont directes, ou si elles sont médiées par différents facteurs associés à la chromatine.

Afin de visualiser l'effet de l'absence de Rpf2 sur l'organisation de l'ADNr, des expériences d'étalement de chromatine ont été réalisées au LBME par Isabelle Léger-Sylvestre (**Figure 54**). L'absence de Rpf2 dans des souches de Levure affecte drastiquement l'organisation des unités de transcription, qui apparaissent moins compactes que dans les conditions sauvages. Le nombre de polymérases fixées à l'ADNr est réduit tandis que l'espace qui les sépare est augmenté. Le nombre et la longueur des transcrits sont également diminués. Enfin, la formation des SSU processomes est également affectée dans certaines zones, suggérant une dé-régulation de l'assemblage co-transcriptionnel des sous-unités ribosomiques.



**Figure 53 : Experiences de ChIP et d'immunoprécipitation**

(A) L'expérience de ChIP a été réalisée en utilisant une souche de *S.cerevisiae* exprimant Rpf2 étiquetée 3-HA. La présence de séquences spécifiques d'ADNr à été révélée par qPCR, en amplifiant différentes régions : ARS (pour Autonomous Réplication Sequence, présente entre chaque répétition d'ADNr), 5'ETS, 18S et 25S. Cette expérience a été réalisée en présence (en bleu) et en absence de RNase A (en rouge). (B) la même expérience a été réalisée en utilisant une souche de *S.cerevisiae* exprimant Rrs1 étiquetée 3-HA. (C) Co-immunoprécipitation de sous-unités de l'ARN pol I avec Rpf2-3HA et Rrs1-3HA. Les extraits de chromatine ont été incubés sur des billes magnétiques conjuguées à un anticorps anti-HA ( $\alpha$ -HA) ou des billes seules (Mock). Après plusieurs lavages, la présence de sous-unités de l'ARN polymérase I a été révélée à l'aide d'un anticorps polyclonal.



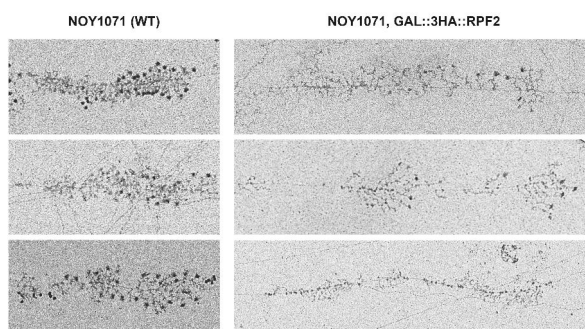
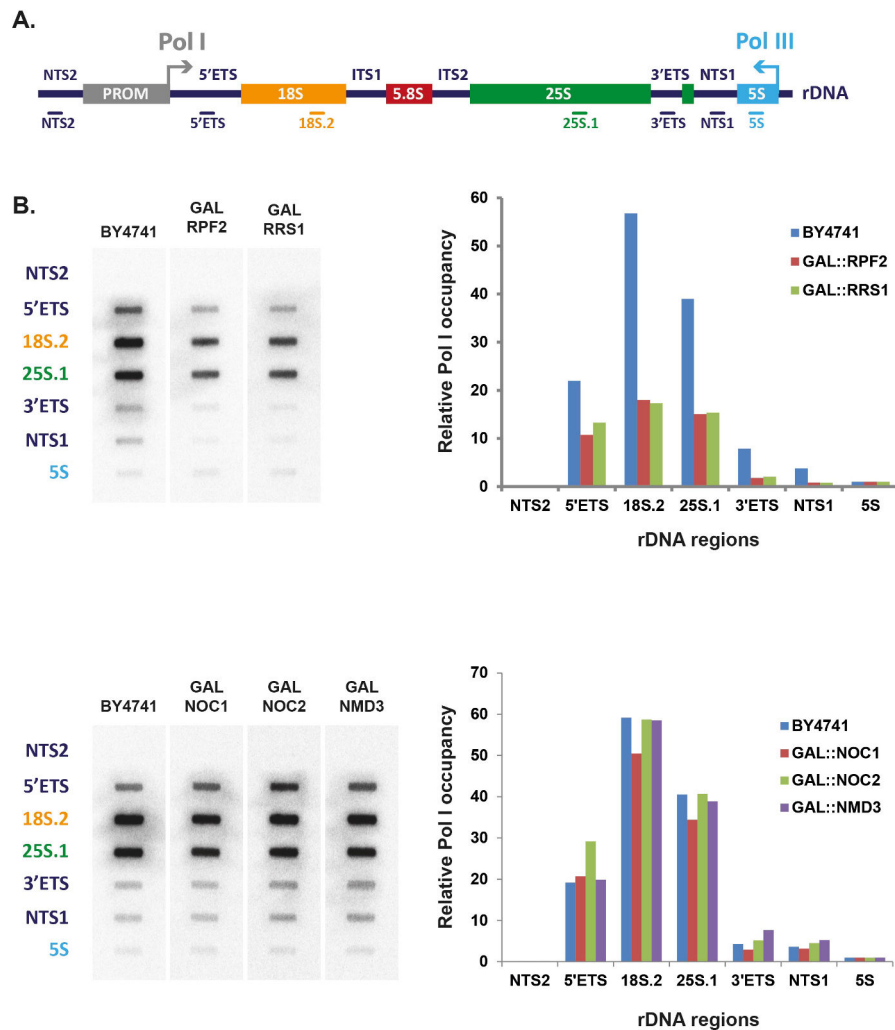


Figure 54 : Étalements de chromatines en l'absence de Rpf2

Pour mieux caractériser le rôle du complexe Rpf2/Rrs1 dans la régulation de l'ARN polymérase I, l'équipe d'A. Henras a réalisé des expériences de transcription en «run on», dont je rappellerai brièvement le principe ici. Pour ces expériences, des souches de *S. cerevisiae*, où l'expression de Rpf2 ou de Rrs1 a été inactivée, ont été incubées en présence d'un détergent qui perméabilise la membrane cellulaire, et bloque la transcription des ARNr. Les cellules ont ensuite été incubées en présence d'un tampon de transcription contenant de l'UTP  $\alpha$ -32P, qui provoque la reprise de l'élongation de la transcription. Les ARNr néo-transcrits ont ainsi été radio-marqués, puis détectés en utilisant des sondes d'ADN simple-brin, complémentaires de différentes régions de l'ARNr 25S (Wery et al. 2009). Dans les deux cas, l'inactivation de Rpf2 ou de Rrs1 conduit à une diminution de la quantité de transcrits Pol I, tandis que la transcription de l'ARNr 5S par l'ARN polymérase III ne semble pas affectée (Figure 55). Cette expérience a également été réalisée en utilisant des souches de levure où l'expression d'autres facteurs de maturation de la biogenèse des ribosomes ont été inactivés. L'inactivation de Noc1, de Noc2 ou de Nmd3 n'affecte pas la quantité d'ARNr transcrits par l'ARN polymérase I. Ces données suggèrent donc un rôle spécifique du dimère Rpf2/Rrs1 dans la stimulation de la transcription des ARNr.

## II. Caractérisation des interactions entre le dimère Rpf2/Rrs1 et l'ARN polymérase I

Afin de mieux définir le rôle du complexe Rpf2/Rrs1 dans la régulation de la transcription, j'ai mis en place au laboratoire une série de tests d'association *in vitro* visant à caractériser les interactions entre le dimère de facteurs d'assemblage et l'ARN polymérase I.

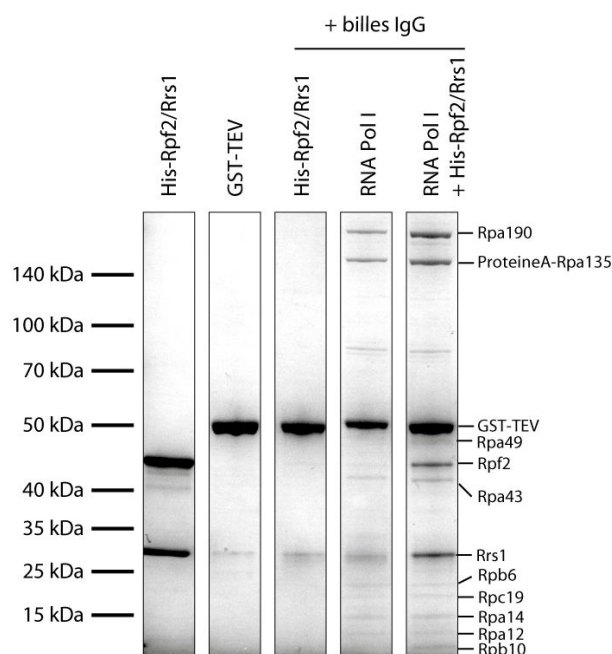


### Figure 55 : Expériences de Transcription en « run on »

(A) position des sondes ADN utilisées pour la détection des transcrits lors de l'expérience de transcription en « run on ». (B) Tests de transcription en « run on » en utilisant des souches de *S. cerevisiae* où les gènes codants pour *Rpf2*, *Rrs1*, *Noc1*, *Noc2* et *Nmd3* ont été placés sous le contrôle d'un promoteur GAL. Ces souches ont d'abord été cultivées dans un milieu contenant du glucose, puis dans un milieu contenant du galactose pendant 3 heures. La souche BY4741 a été utilisée comme contrôle. Après l'arrêt de la transcription, les cellules ont été incubées en présence d'UTP radioactif. Les transcrits radio-marqués ont été détectés en utilisant des sondes d'ADN simple brin (à gauche). La radioactivité détectée a été quantifiée et normalisée par rapport au signal détecté pour l'ARNr 5S (à droite).

## 1. Test d'association *in vitro* entre Rpf2/Rrs1 et l'ARN polymérase I

Dans le but de déterminer si le dimère Rpf2/Rrs1 est capable d'interagir avec l'ARN polymérase I, j'ai dans un premier temps mis en place une expérience de capture d'affinité *in vitro* (*pull-down*). Pour cela, l'ARN polymérase I a été purifiée en suivant un protocole développé par l'équipe d'Herbert Tschochner (Pils et al. 2016). Une souche de *S.cerevisiae* exprimant la sous-unité Rpa135 étiquetée par une étiquette Protéine A-TEV a été utilisée. Les conditions de culture et de lyse des cellules sont décrites dans le matériel et méthode. Les lysats ont été incubés sur des billes de sépharose couplées à des Immunoglobulines G (IgG) pendant une heure à 4°C. Après plusieurs lavages, les billes ont été incubées en présence de la protéase TEV, dans le but d'éluer la polymérase des billes en clivant l'étiquette. La fraction éluee a été analysée en SDS-PAGE (Figure 56). Même si le profil de migration montre la présence de plusieurs sous-unités, seules de très faibles quantités de polymérase I ont été obtenues. Cette purification doit être optimisée, en changeant par exemple les conditions de culture, le type de billes, ou encore la TEV.



**Figure 56 : Test d'interaction par capture d'affinité entre Rpf2/Rrs1 et l'ARN polymérase I**

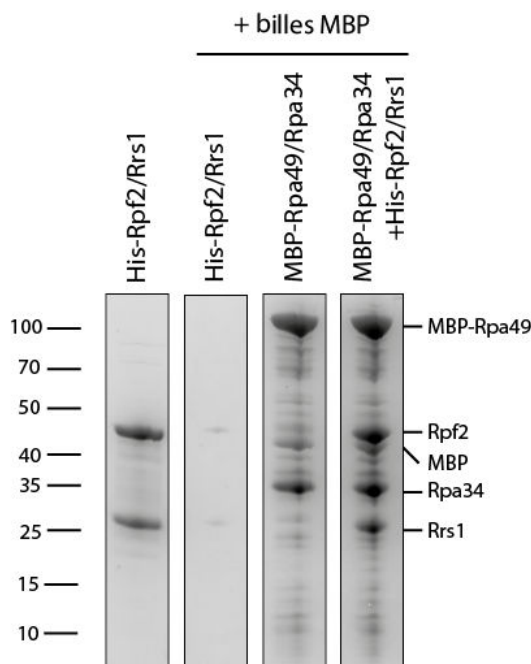
Des levures exprimant Rpa135 étiquetée ProtéineA-TEV ont été lysées. Les extraits solubles ont été incubés sur billes couplées à des Immunoglobulines G (IgG). Après plusieurs lavages, les billes ont été incubées en présence et en absence d'une solution de complexe His-Rpf2/Rrs1 pure. D'autres lavages ont ensuite été réalisés, et les billes ont été incubées en présence de TEV. Les différents éluats ont été déposés sur SDS-PAGE 4-12% .

Malgré les faibles quantités de polymérase obtenues, des tests d'association avec le complexe Rpf2/Rrs1 ont été réalisés. Pour ces tests, la polymérase a été purifiée de la même façon, mais cette fois-ci, les billes couplées à la polymérase I ont été incubées une heure à 4°C en présence d'une solution pure de dimère Rpf2/Rrs1. Différents lavages ont été effectués avant l'élution à la TEV et le dépôt des éluats sur SDS-PAGE. Ces résultats préliminaires sont présentés dans la **figure 56**. Le complexe Rpf2/Rrs1 est retenu sur les billes couplées à l'ARN polymérase I, alors qu'il ne l'est pas en présence de billes seules, ce qui semble démontrer une interaction spécifique entre ce complexe et l'ARN polymérase I. En revanche, dans les conditions de l'expérience, cette association n'est pas stoechiométrique. Ces différences de stoechiométrie pourraient être expliquées par l'état d'oligomérisation du complexe Rpf2/Rrs1 en solution. En effet, le volume d'élution de ce complexe en chromatographie d'exclusion stérique correspond à une masse moléculaire apparente de 170kDa, environ trois fois supérieure à la masse moléculaire du dimère. Trois dimères Rpf2/Rrs1 interagiraient alors avec une seule polymérase *in vitro*.

## 2. Test d'association *in vitro* entre Rpf2/Rrs1 et Rpa49/Rpa34

Les données de purification en tandem (TAP-Rpf2) ainsi que celles de co-immunoprécipitation en conditions de ChIP suggèrent des interactions entre Rpf2 et la sous-unité Rpa49 de l'ARN polymérase I. Chez tous les eucaryotes, Rpa49 forme un hétérodimère avec une autre sous-unité de l'ARN polymérase I, appelée Rpa34. Ce dimère possède de multiples fonctions. Il est par exemple requis pour une élongation efficace de la transcription, en établissant des contacts avec les polymérases adjacentes le long de l'ADNr (Albert et al. 2011). D'autre part, le domaine tWH de Rpa49 est impliqué dans la liaison à l'ADN. Enfin, le domaine de dimerisation (entre Rpa49 et Rpa34) stimule le clivage ARN responsable de l'activité *proof-reading* (Geiger et al. 2010).

Dans le but de tester l'association entre les dimères Rpf2/Rrs1 et Rpa49/Rpa34, les protéines de *S. cerevisiae* Rpa49 et Rpa34 ont été co-exprimées chez *E. coli*, en utilisant un plasmide polycistonique. Cette construction permet l'expression des deux protéines, où seul Rpa49 est étiqueté MBP. Les conditions de culture, d'expression et de lyse bactérienne sont décrites dans le matériel et méthode. Les lysats bactériens ont été incubés pendant une heure à 20°C sur bille d'amylose en présence de RNase. Après trois lavages avec une solution à haute concentration saline (500mM KCl), les billes ont été incubées une heure supplémentaire en présence et en absence d'une solution pure de complexe Rpf2/Rrs1. Après d'autres lavages, les billes ont été reprises dans une solution de bleu de Coomassie, et déposées sur SDS-PAGE (**Figure 57**).



**Figure 57 : Test d'interaction par capture d'affinité entre Rpf2/Rrs1 et Rpa49/Rpa34**

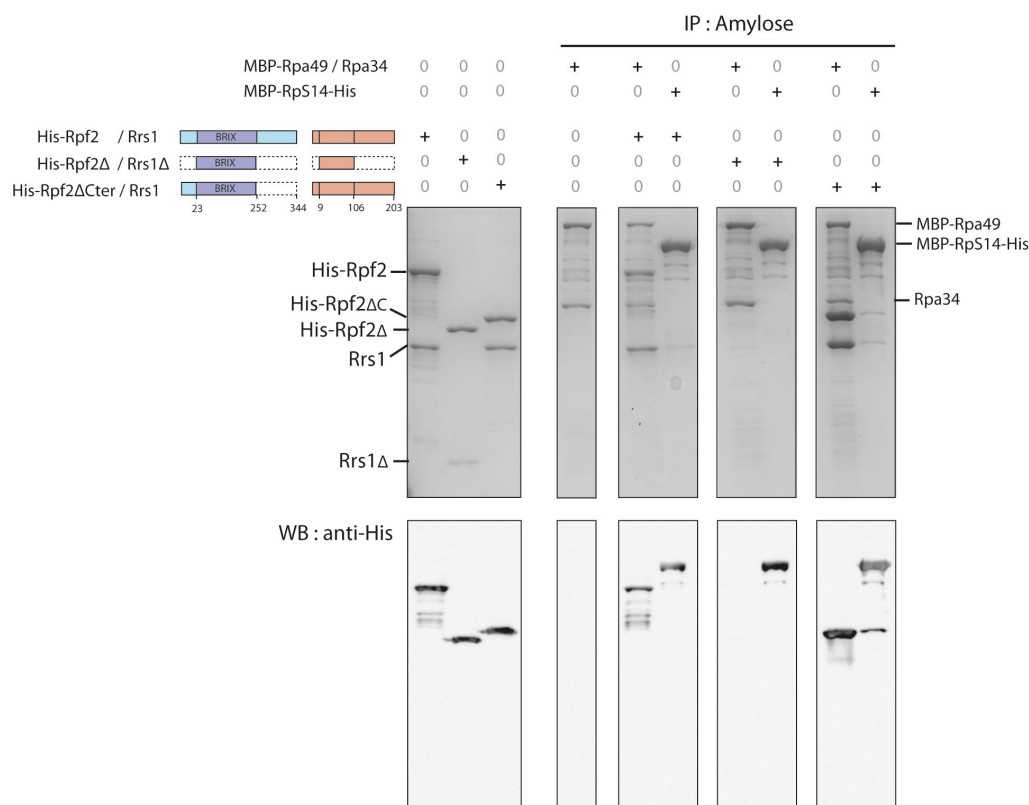
Les protéines MBP/Rpa49 et Rpa34 ont été immobilisées sur billes d'amylose puis incubées en présence et en absence d'une solution de complexe His-Rpf2/Rrs1 pure. Après lavages (500mM KCl, 20mM Tris 8), les billes ont été reprises dans une solution de bleu de Coomassie, puis déposées sur SDS-PAGE 4-12%.

Les protéines Rpa49 et Rpa34 sont bien retenues sur les billes d'amylose, mais l'analyse du profil de migration montre qu'elles sont dégradées dans les conditions de l'expérience. Le complexe Rpf2/Rrs1 est spécifiquement retenu sur les billes couplées au dimère Rpa49/Rpa34. De plus, cette interaction n'est pas due à la présence d'ARN contaminants, puisque la capture d'affinité a été réalisée en présence de RNase A.

### 3. Caractérisation des interactions au sein du complexe Rpf2/Rrs1/Rpa49/Rpa34

Afin de mieux caractériser les interactions au sein du complexe Rpf2/Rrs1/Rpa49/Rpa34, j'ai réalisé différents tests d'association en utilisant des formes tronquées du dimère Rpf2/Rrs1. Trois formes différentes ont été utilisées : une forme pleine taille, une forme tronquée correspondant à la structure que nous avons résolu (His-Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$ ) et une forme où l'extension C-terminale de Rpf2 est tronquée (His-Rpf2 $\Delta$ C/Rrs1). Ces complexes ont été incubés en présence de billes d'amylose sur lesquelles le complexe MBP-Rpa49/Rpa34 a été

immobilisé (même protocole que celui utilisé dans la partie II.2). Afin de tester la spécificité de cette liaison, une expérience contrôle a également été réalisée en présence de billes couplées à la protéine MBP-Rps14. Les résultats de ce test d'interaction sont présentés dans la **figure 58**. Parmi les trois formes de complexe Rpf2/Rrs1 utilisées, seule la forme His-Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$  (la forme dont la structure est connue) n'est pas capable d'interagir avec le dimère Rpa49/Rpa34. Le core structural du dimère Rpf2/Rrs1, qui contient notamment le domaine BRIX de Rpf2 n'est donc pas impliqué dans cette interaction. De plus, trois régions protéiques sont absentes de ce complexe par rapport aux autres formes : l'extension N-terminale de Rpf2 (1-23), l'extension N-terminale de Rrs1 (1-9) et l'extension C-terminale de Rrs1 (106-203). Un ou plusieurs de ces fragments sont donc responsables de l'interaction avec le dimère Rpa49/Rpa34. Je suis actuellement en train de cloner et de purifier d'autres formes tronquées du dimère Rpf2/Rrs1 pour déterminer la zone d'interaction avec précision : Rpf2 $\Delta$ Nter/Rrs1, Rpf2/Rrs1 $\Delta$ Cter et Rpf2/Rrs1 $\Delta$ Nter.

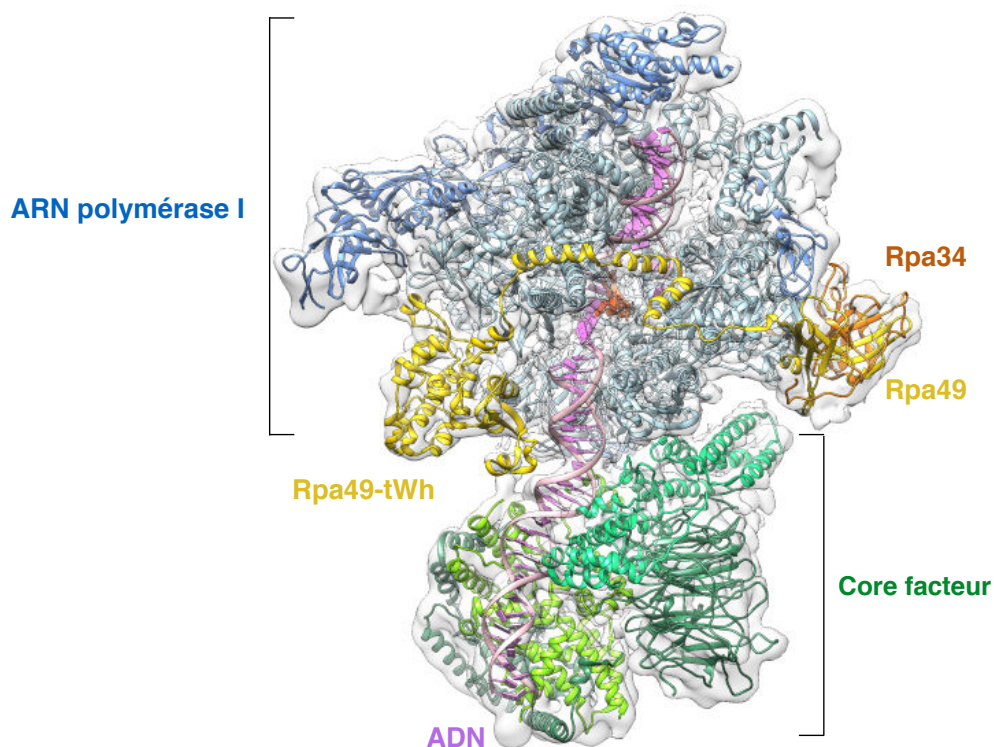


**Figure 58 : Détermination de la zone d'interaction entre les digères Rpa49/Rpa34 et Rpf2/Rrs1.**

Les protéines MBP/Rpa49 et Rpa34 ont été immobilisées sur billes d'amylose puis incubées en présence de différentes constructions de complexe His-Rpf2/Rrs1. La protéine MBP-Rps14 a été utilisée comme contrôle. Après lavages (500mM KCl, 20mM Tris 8), les billes ont été reprises dans une solution de bleu de Coomassie, puis analysées en SDS-PAGE 4-12%.

### III. Discussion et perspectives

Rpa49 et Rpa34 sont conservés de la levure à l'Homme, et sont impliqués dans l'initiation et l'élongation de la transcription. La structure cristallographique de ces deux protéines a été résolue en 2013 (Geiger et al. 2010). Rpa49 est composée de deux domaines différents : un domaine tWh, capable de lier directement l'ADNr et un domaine impliqué dans le clivage de l'ARN qui dimérise avec Rpa34. Ces deux domaines sont liés par un long linker de 70 acides aminés. Très récemment, trois structures du complexe d'initiation de l'ARN polymérase I (3 états différents) ont été résolues en microscopie électronique (Han et al. 2017). Dans ces structures, le linker de Rpa49 relie les deux « mâchoires » de l'ARN polymérase I en refermant le site actif (Figure 59). Par ailleurs, la position exacte du domaine tWh varie entre les 3 structures résolues. Ce domaine est extrêmement mobile, et occupe, dans un des 3 états, la même position que le facteur d'initiation Rrn7. Selon les auteurs, ce domaine serait responsable de la dissociation du facteur Rrn7, et permettrait l'ouverture du tunnel de sortie de l'ARN durant l'initiation de la transcription. Rpa49 et Rpa34 sont également nécessaires au recrutement et à la dissociation du



**Figure 59 : Structure du complexe d'initiation de l'ARN polymérase I**

L'ARN polymérase est représentée en bleu, l'ADN en rose, le core facteur en vert, Rpa49 en jaune et Rpa34 en orange (code PDB : 5w66).

facteur Rrn3 durant l'initiation de la transcription (Beckouet et al. 2008). En dehors de son rôle dans l'initiation de la transcription, le domaine tWh de Rpa49 joue également un rôle dans l'élongation, en assurant la processivité de la polymérase (Geiger et al 2010). Enfin, Rpa49 est impliqué dans l'organisation des unités de transcription, en assurant un pontage avec la sous-unité Rpa43 d'une polymérase voisine. Cette interaction participerait à la dissociation du complexe d'initiation, en favorisant le relargage du facteur Rrn3 de la sous-unité Rpa43 (Albert et al. 2011).

Afin de spécifier les détails moléculaires régissant l'interaction entre Rpf2/Rrs1 et le complexe Rpa49/Rpa34 nous projetons de cloner les différents domaines de Rpa49 et de Rpa34 séparément pour pouvoir tester leur association avec le complexe Rpf2/Rrs1. Une fois cette interaction caractérisée, il sera nécessaire de s'assurer si celle-ci est unique, ou si d'autres interactions entre l'ARN polymérase I et le complexe Rpf2/Rrs1 existent. Pour ce faire, nous testerons l'association entre le dimère Rpf2/Rrs1 et une polymérase purifiée sans Rpa49 et Rpa34. De telles polymérases peuvent être obtenues en utilisant une souche dépletée de Rpa49 : la déplétion de Rpa49 chez la levure n'est pas létale et mène également à l'absence de Rpa34 des polymérases (Beckouet et al. 2008).

Nous vérifierons ensuite l'influence de ces interactions entre l'ARN polymérase I et le complexe Rpf2/Rrs1 sur la transcription des ARNr en réalisant des *Run on* à partir de cellules exprimant des mutants de délétion. L'effet sur la transcription sera précisé en utilisant un système de transcription *in vitro*, développé par le laboratoire d'Herbert Tschochner (Pils et al. 2016). Il s'agit ici de reconstituer un système minimal de transcription en utilisant une matrice ADN contenant une séquence promotrice, les facteurs d'initiation de la transcription (core facteur et Rrn3) recombinants, exprimés chez *E. coli*, ainsi que l'ARN polymérase I purifiée chez *S. cerevisiae*. Les transcrits synthétisés *in vitro*, en présence de NTP radiomarqués peuvent alors être détectés et quantifiés sur gel polyacrylamide-urée. En utilisant cette méthode, on s'affranchit du biais induit par l'expérience de *Run on*, en s'assurant que l'effet de la déplétion de Rpf2 ou de Rrs1 sur la transcription des ARNr est bien direct.

Une fois l'interaction définie, il sera intéressant de comprendre comment le complexe Rpf2/Rrs1 peut influencer l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase I. Deux modes de régulation distincts peuvent être envisagés. Soit Rpf2/Rrs1 agit sur l'affinité de l'ARN polymérase I avec l'ADNr, en jouant, comme avec la particule 5S, le rôle d'adaptateur. Soit, Rpf2/Rrs1 agit sur l'organisation moléculaire de l'ARN polymérase I, favorisant ainsi son activité. Ces deux types de régulation ne sont d'ailleurs pas mutuellement exclusifs. La première hypothèse est supportée par la capacité de Rpf2 à lier directement l'ADN (Wehner et Baserga, 2002). Nos données indiquent également que le dimère Rpf2/Rrs1 est capable d'interagir avec certaines régions de l'ADNr. Pour déterminer si ces interactions sont spécifiques aux ADNr, il serait



intéressant de réaliser une expérience de ChIP-seq, qui permettra l'identification des séquences liées à Rpf2 ou à Rrs1. D'autre part, l'association entre ADNr et les facteurs Rpf2/Rrs1 pourrait être testée *in vitro* lors d'expérience de retard sur gel. Il serait d'ailleurs intéressant de tester la capacité du domaine BRIX de Rpf2 à lier l'ADNr. Enfin, l'affinité de l'ARN polymérase I avec l'ADNr pourra aussi être évaluée par des expériences de *filter binding* ou de retard sur gel, en présence ou en absence de Rpf2/Rrs1. Afin, de tester la seconde hypothèse, l'étude structurale en microscopie électronique de l'ARN polymérase I associée au dimère Rpf2/Rrs1 est envisagée.

# DISCUSSION

---



## 1. Les protéines à domaine BRIX et leurs partenaires

Le dimère Rpf2/Rrs1 est un adaptateur moléculaire, qui permet d'ancrer l'ARNr 5S à la surface de la protubérance centrale de la grande sous-unité. Dans notre modèle, Rpf2 et Rrs1 sont essentiels à la coordination des derniers événements nucléaires menant à l'exportation de la grande sous-unité, en prévenant l'association de l'ARNr 5S avec des ribosomes immatures, ou qui ne possèdent pas la bonne conformation de la protubérance centrale. Ce dimère bloque la rotation de la particule 5S, en interagissant avec les facteurs Rsa4 et Nog2, jusqu'au recrutement de l'ATPase Rea1.

En dépit du fait que le complexe Rpf2/Rrs1 soit capable d'interagir avec l'ARNr 5S en l'absence d'autres protéines *in vitro*, nos données ne montrent pas si le dimère Rpf2/Rrs1 est intégré dans les pré-ribosomes au même moment que la particule 5S, ou s'il est déjà associé à la protubérance centrale au moment de ce recrutement. L'observation d'étalement de chromatine réalisés à partir de souches de levures dans lesquelles Rpf2 a été inactivé montre que l'assemblage co-transcriptionnel des ribosomes est affecté en l'absence de Rpf2, ce qui indique une association précoce du dimère Rpf2/Rrs1 avec les pré-ribosomes. Cependant, aucune donnée à ce jour ne permet de réellement conclure sur ces hypothèses.

L'analyse de la structure du complexe Rpf2/Rrs1 a révélé un mode d'interaction protéine-protéine particulier, où les deux facteurs d'assemblage partagent des éléments de structure secondaire. Cette interaction est stabilisatrice *in vitro* (Zhang et al. 2007), et ces deux protéines co-localisent dans le noyau *in vivo* (Sloan et al. 2013), suggérant que ces facteurs doivent être liés pour assurer leurs fonctions. Ce mode d'interaction semble conservé entre l'autre protéine à domaine BRIX Imp4 et son partenaire Mpp10 (Sun et al. 2017, Chaker-Margot et al. 2017). Par ailleurs, le facteur Imp4 joue également un rôle d'adaptateur moléculaire, en ancrant le sous-complexe Imp3/Imp4/Mpp10 au snoRNA U3. Enfin, Brx1, une autre protéine à domaine BRIX, et son partenaire Ebp2 sont tous les deux nécessaires au recrutement de Pwp1 et de Nop12 au sein des sous-unités pré-60S. La structure du complexe Brx1/Ebp2 n'est cependant pas connue à ce jour, et aucun élément ne nous permet d'affirmer que le mode d'interaction entre ces deux partenaires est similaire à celui des protéines Rpf2 et Rrs1. Néanmoins, ces données suggèrent l'existence d'une famille de protéines partenaires des BRIX, partageant des caractéristiques structurales communes, et nécessaires à l'organisation des sous-unités ribosomiques. Certaines protéines partenaires des BRIX seraient également capables d'interagir ensemble : Rrs1 et Ebp2 sont par exemple impliquées dans le regroupement des télomères en phase S en interagissant avec la protéine d'enveloppe nucléaire Mps3 (Horigome et al 2011). L'ensemble de ces données indique que les protéines à domaine BRIX forment avec leur partenaire des complexes adaptateurs permettant d'associer la capacité à lier l'ARN, portée

par le BRIX, à d'autres domaines fonctionnels comme des domaines d'interaction protéines-protéines. Ces caractéristiques font de ces complexes des facteurs totalement adaptés à l'assemblage des RNPs.

## 2. La particule 5S et la régulation de la transcription des ARNr

La transcription du pré-ARN 35S par l'ARN polymérase I constitue la première étape limitante de la biogenèse du ribosome. La régulation de cette étape influence directement le taux de ribosomes et donc la capacité de la cellule à croître et à proliférer. L'assemblage des ribosomes se fait de manière co-transcriptionnelle. Il n'est donc pas étonnant que la transcription du pré-ARNr 35S soit influencée par la présence de facteurs d'assemblage impliqués dans les étapes précoces de la biogenèse des ribosomes. Différentes études ont suggéré un rôle de ces facteurs d'assemblage dans la régulation de la transcription des ARNr. Par exemple, le complexe Noc1/Noc2/Rrp5 est également retrouvé associé à l'ADNr et à certaines sous-unités de l'ARN polymérase I (Hierlmeier et al. 2013). La déplétion de protéines UTP, également impliquées dans les étapes précoces de la biogenèse du ribosome mène à une diminution de la quantité de pré-ARNr 35S transcrit chez la levure (Gallagher et al. 2004). Plus récemment, il a été montré que la méthyl-transférase Nop1 (fibrillarine chez l'Homme), impliquée dans la modification des ARNr, était également responsable de la méthylation spécifique des histones nucléolaires (Tessarz et al. 2014). La protéine kinase Rio1, qui est impliquée dans les étapes tardives de maturation des ribosomes, joue également un rôle dans la réorganisation de l'ADNr en anaphase. Rio1 agirait par deux mécanismes distincts : d'une part en catalysant la phosphorylation de la sous-unité Rpa43 provoquant la dissociation de la polymérase de l'ADNr, et d'autre part, en s'associant avec la dé-acétylase d'histone Sir2 (Iacovella et al. 2015). Enfin, l'hélicase à boîte DEAD DDX21, nécessaire à l'association de plusieurs snoRNP avec les sous-unités pré-40S, est retrouvée associée aux promoteurs des gènes ribosomiques transcrits par l'ARN polymérase I et II chez l'Homme (Calo et al. 2015). Cette hélicase est également capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase I en contactant directement la sous-unité RPA194 (Rpa190 chez la levure). Cette inhibition peut être levée suite à l'interaction de DDX21 avec un long ARN non codant appelé SLERT (Xing et al. 2017). Ces données mettent en exergue l'intégration des deux processus que sont la transcription de l'ADNr par l'ARN polymérase I et la biogenèse des ribosomes. Les complexes Rpf2/Rrs1 étudiés pendant ma thèse, apparaissent comme un nouvel acteur dans cette régulation.

Le dimère Rpf2/Rrs1 est un adaptateur moléculaire, qui facilite les interactions entre l'ARNr 5S et la sous-unité pré-60S. Ces deux facteurs sont également retrouvés associés à la chromatine, contactent directement l'ARN polymérase I, et stimulent la transcription des ARNr. Il est donc possible que le complexe Rpf2/Rrs1 joue là aussi un rôle d'adaptateur moléculaire, en

fixant l'ADNr, et en facilitant le recrutement de l'ARN polymérase I. Par ailleurs, la transcription de l'ARNr 5S est elle aussi régulée par une protéine capable d'interagir à la fois avec l'ARNr et l'ADNr. Ainsi, facteur de transcription TFIIIA fixe la région promotrice du gène codant pour l'ARNr 5S, mais également la boucle E de l'ARNr 5S. Les sites d'interactions de Rpf2 et de TFIIIA sur l'ARNr 5S sont les mêmes. Ces protéines partagent donc des capacités de fixation communes. Il a été proposé que l'interaction entre TFIIIA et l'ARNr 5S soit impliquée dans la régulation de la transcription de l'ARN polymérase III (Pelham et Brown 1980). L'ARNr 5S participerait donc à sa propre régulation, en séquestrant le facteur d'initiation nécessaire à sa transcription. De la même façon, l'interaction entre le dimère Rpf2/Rrs1 et l'ARNr 5S pourrait conduire à une diminution de l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase I. L'ARNr 5S jouerait donc ici un rôle dans la coordination de la transcription de l'ensemble des ARN ribosomiques.

### 3. Le complexe Rpf2/Rrs1 comme cible thérapeutique

Les cellules cancéreuses sont caractérisées par un taux de synthèse protéique élevé qui est assuré par un grand nombre de ribosomes. Dans ces cellules, la transcription des ARNr par l'ARN polymérase I est accélérée (Ruggero et al. 2012 ; Hannan et al. 2013), conduisant le plus souvent à la modification de la taille et du nombre de nucléole. L'observation des nucléoles en microscopie optique est d'ailleurs utilisée comme indicateur de sévérité clinique ou de réponse à la chimiothérapie (Montanaro et al. 2008). L'inhibition de la biogenèse des ribosomes pourrait donc constituer une stratégie novatrice en thérapie anti-cancéreuse, en menant d'une part à la diminution de la capacité de la cellule à synthétiser des protéines indispensables à la prolifération, et d'autre part en stabilisant p53. Par ailleurs, il a été proposé que de nombreuses drogues déjà utilisées en chimiothérapie exercent leur effet anti-tumoral en inhibant la biogenèse du ribosome (Burger et al. 2010).

L'inhibition de l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase I est aujourd'hui considérée comme une stratégie prometteuse en thérapie anti-cancéreuse. Plusieurs drogues ciblant l'ARN polymérase I sont aujourd'hui en développement. On peut notamment citer le BMH-21, un intercalant ADN qui lie les régions riches en GC particulièrement présentes dans les ADNr, et qui réprime la transcription par l'ARN polymérase I. Des résultats obtenus dans des lignées cellulaires cancéreuses humaines NCI60 montrent que cette drogue réprime la croissance tumorale par deux modes d'action différents : en inhibant directement la transcription des ARNr et en stimulant la dégradation par le protéasome de la sous-unité Rpa194 (Peltonen et al. 2014). Une autre molécule, le CX-5461, est le premier inhibiteur de l'ARN polymérase I à être testé en essais cliniques : phase I d'essais cliniques pour des hémopathies malignes (Peter MacCallum Cancer Center, Melbourne, Australie) et phase I/II pour des cancers du sein (Vancouver Cancer Center, Vancouver, Canada). Le CX-5461 inhibe la transcription de l'ARN

## DISCUSSION

polymérase I en empêchant l'interaction du facteur d'initiation SL-1 avec le promoteur de l'ADNr (Drygin et al. 2011). Dans ces conditions, le recrutement de l'ARN polymérase I sur l'ADNr n'a pas lieu. Des expériences réalisées dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses humaines ont montré que le CX-5461 induisait deux réponses pro-apoptiques différentes, en menant d'une part à la stabilisation de p53, et d'autre part en activant la voie ATM/ATR de réparation de l'ADN, indépendante de p53 (Quin et al. 2016). Un des éléments centraux de la réponse p53 dépendante est la voie p53/Mdm2/5S. L'accumulation de forme libre de particule 5S conduit alors à l'inhibition de Mdm2 et à l'activation de P53.

Les récentes avancées sur la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la synthèse des ribosomes procurent le fondement nécessaire au développement de nouvelles drogues anti-cancéreuses. Le dimère Rpf2/Rrs1 est impliqué dans deux mécanismes distincts nécessaires à la synthèse des sous-unités ribosomiques : d'une part, il est indispensable à l'intégration de la particule 5S au sein des ribosomes, et stimule, d'autre part, la transcription des ARNr. La compréhension de ces mécanismes pourra donner lieu à la conception de nouvelles stratégies anti-cancéreuses avec la conception d'inhibiteurs ciblant Rpf2 et Rrs1 et bloquant la biogenèse des ribosomes à deux niveaux différents.

# MATÉRIELS & METHODES

---





## I. Souches et plasmides

### 1. Souches bactériennes

Pour la préparation des plasmides :

*E. Coli* DH5 $\alpha$  : F<sup>-</sup>, 80 $\Delta$ /lacZ $\Delta$ M15,  $\Delta$ (lacZYA-argF) U169, recA1, hsdR17 (rk<sup>-</sup>mk<sup>+</sup>), phoA, supE44<sup>+</sup>, thi<sup>-</sup>1, gyrA96, relA1.

Pour l'expression des protéines recombinantes :

*E coli* Rosetta 2 (DE3) : F<sup>-</sup>, ompT, hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>), gal, dcm<sup>+</sup>, (DE3), pRARE2 (Cam<sup>R</sup>).

Le plasmide pRARE2 contient les gènes codant pour les 7 ARNt de codons rares chez *E. coli* (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA, CGG) ainsi qu'un gène codant pour la résistance au chloramphénicol.

### 2. Souches de levure

Pour la purification de l'ARNr 5S :

BY4741 : MATa his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 met15 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0

Pour la purification de l'ARN polymérase I :

BY2423 : MATa his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 met15 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0 rpa135::RPA135-TEV-ProtA-kanMX6

Cette souche de levure nous a été fournie par le laboratoire d'Herbert Tschochner ([Hierlmeier et al. 2013](#)).

### 3. Plasmides

Les ADN codant les protéines de *S. cerevisiae* Rrs1 et Rpf2 ont été synthétisés et clonés sous forme de polycistron par *GenScript* dans un plasmide pET21(a+) à sélection ampicilline pour obtenir le plasmide pET21(a+)-(His-Rpf2/Rrs1). La protéine Rpf2, codée par la première ORF du plasmide possède une étiquette 6-histidine placée à l'extrémité N-terminale.

Les ADN codant pour les formes tronquées de Rpf2(23-252) et de Rrs1(9-106), correspondants aux fragments cristallisés ont été synthétisés et clonés de la même façon, pour obtenir le plasmide pET21(a+)-(His-Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$ ).

Le plasmide permettant la co-expression des protéines Rpf2 $\Delta$ Cter ( $\Delta$ 251-344) et Rrs1 a été obtenu par mutagenèse dirigée. La méthode dite des amorces chevauchantes a été utilisée dans le but d'introduire un codon stop dans la séquence codant la protéine Rpf2, portée par le plasmide pET21(a+)-(His-Rpf2/Rrs1). Les oligodésoxynucléotides sens (5'-GAAGCTCACAAGAAGTAATAACAATTAGAAATGAAG-3') et antisens (5'-CTTCATTTCTAATTGTTACTTCTTGTGAGCTTC-3') ont été utilisés afin pour remplacer les

codons CCA (K251) et AAA (P252) par deux codons STOP TAA. La réaction de mutagenèse a été réalisée dans une solution de 50 $\mu$ L contenant 100ng de plasmide pET21(a+)-(Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$ ), 50pmol de chaque oligodésoxynucléotides, 10 nmol de dNTP, le tampon Phusion (*Thermo Fisher*), du DMSO (5%) et 0,5 unités de Phusion (*Thermo Fisher*), et selon le programme de PCR suivant : 5 min à 98°C, (30s à 98°C, 30s à 55°C, 3min à 72°C) x 20 cycles et 10min à 72 °C dans un thermocycleur (*Eppendorf*). La réaction d'amplification a été vérifiée en déposant les produits de PCR sur gel d'agarose 1%. La migration s'effectue dans du TBE 0,5X (Tris borate 44,5 mM pH 8,3 et EDTA 1mM). Lors de la seconde étape, les plasmides parentaux ont été éliminés par digestion par l'enzyme Dpn1 (*NEB*, 1U pour 10 $\mu$ L de produit de PCR et incubation 1H à 37°C). Les bactéries *E. coli* DH5 $\alpha$  rendues compétentes à la transformation par traitement au CaCl<sub>2</sub> (75mM) ont ensuite été transformées par choc thermique (45s à 42°C puis placées à 4°C) avec le plasmide possédant la séquence mutée pET21(a+)-(His-Rpf2 $\Delta$ C-ter/Rrs1). Les bactéries ont ensuite été sélectionnées sur milieu LB-Agar contenant de l'ampicilline (100 $\mu$ L/mL) (LBA-Agar) puisensemencées dans 10 mL de LBA liquide. L'ADN plasmidique des bactéries a ensuite été extrait par l'emploi du kit « *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* » (*Thermo Fisher*). La présence des mutations a ensuite été vérifiée par séquençage Sanger (*GATC*).

Les ADN codant les protéines de *S. cerevisiae* Rpa49 et Rpa34 ont été synthétisés et clonés sous forme de polycistron par GenScript dans un plasmide pETM40 à sélection kanamycine pour obtenir le plasmide pETM40(MBP-Rpa49/Rpa34). La protéine Rpa49, codée par la première ORF du plasmide est fusionnée à la protéine MBP au niveau de l'extrémité N-terminale.

Le plasmide pUC18-(5S $\Delta$ ) à sélection ampicilline utilisé pour la transcription *in vitro* de l'ARNr 5S $\Delta$  a été synthétisé par *GenScript*.

## II. Expression et purification des protéines recombinantes

### 1. Culture bactériennes

#### a. Rpf2/Rrs1 et formes tronquées

100  $\mu$ L de bactéries Rosetta2 (DE3) chimio-compétentes ont été transformées par choc thermique (45 s à 42°C puis 4°C) en présence de 100ng de plasmide (pET21(a+)-(His-Rpf2/Rrs1), pET21(a+)-(His-Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$ ) et pET21(a+)-(His-Rpf2 $\Delta$ C-ter/Rrs1). Les bactéries transformées ont ensuite été étalées sur boîte de Petri (LB-Agar), en présence de chloramphénicol et d'ampicilline, incubées une nuit dans une étuve à 37°C, avant d'être stockées à 4°C. Une pré-culture à saturation a ensuite été réalisée à partir de plusieurs colonies

dans 200mL de milieu LBAC liquide (ampicilline 100 µg/mL, chloramphénicol 50 µg/mL), à 37°C sur la nuit et sous agitation. Plusieurs cultures d'un litre de milieu LB ont ensuite été ensemencées à partir de la pré-culture, de manière à obtenir une densité optique (DO) à 600nm de 0,1. Ces cultures ont été placées sous agitation à 37°C jusqu'à ce que la DO atteigne 0,8. L'induction de l'expression a été effectuée par ajout d'IPTG (1mM final) et les cultures ont été placées sous agitation (4H à 37°C ou une nuit à 20°C). Les cellules ont ensuite été récoltées par centrifugation (30min 5000g) et stockées à -80°C.

#### **b. Rpa49/Rpa34**

Les pré-cultures et cultures des bactéries exprimant Rpa49 et Rpa34 ont été réalisées en milieu LBKC liquide (kanamycine 100µg/mL, chloramphénicol 50µg/mL). Le protocole est identique à celui utilisé pour le complexe Rpf2/Rrs1.

## **2. Purification du dimère Rpf2/Rrs1 et des formes tronquées**

#### **a. Lyse des cellules**

Chaque culot bactérien correspondant à 1 litre de culture a été repris dans 10mL de tampon A (NaCl 500mM ; Tris/HCl pH8 50mM ; Imidazole 20mM). Les cellules ont été lysées à l'aide d'un sonicateur pendant 6 minutes (1s de pulse, 1s de repos). Le lysat obtenu a ensuite été centrifugé à 27000g pendant 30 minutes : le surnageant a été récupéré et conservé à 4°C avant purification.

#### **b. Chromatographie d'affinité de type His-trap**

Les chromatographies d'affinité réalisées sur système HPLC (*High Pressure Liquid Chromatography*) sont de type IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*), et utilisent une colonne His-Trap (*GE Healthcare Life Science*). Pour chaque purification, l'extrait soluble des bactéries lysées a été placé dans une boucle d'injection reliée à la colonne His-Trap (5mL de résine Ni-NTA) via un appareil chromatographique Äkta-pure (*GE Healthcare Life Science*). Après injection, la colonne a été lavée avec 5 volumes de tampon A (NaCl 500mM ; Tris/HCl pH8 50mM ; Imidazole 20mM). L'élution a été réalisée par gradient croissant de concentration d'imidazole en mélangeant un tampon A avec un tampon B (NaCl 500mM ; Tris/HCl pH8 50mM ; Imidazole 500mM) sur 15 volumes colonne (75mL). L'absorbance UV (280nm) est enregistrée en sortie de colonne. Les fractions collectées correspondant aux pics d'absorbance ont été analysées en SDS-PAGE 12,5%. Les échantillons ont été préparés avant dépôt par ajout de bleu Laemmli (Tris/HCL 60mM pH 6.8, β-mercaptoéthanol 14,4 mM, bleu de bromophénol 0,1%, glycerol 25% et SDS 2%).

### c. Chromatographie d'exclusion stérique

Les chromatographies d'exclusion stérique ont été réalisées en utilisant des colonnes Superdex200 16-60 (pour la forme native du complexe) et Superdex75 16-60 (pour les formes tronquées) connectées à un appareil de chromatographie Äkta-pure. Dans les deux cas, la colonne a été chargée avec l'éluât concentré issu de la chromatographie d'affinité, puis les protéines de l'extrait ont été séparées dans un tampon C (150mM NaCl et 10mM Tris/HCl pH8) injecté à 1mL/min. Les fractions correspondant aux pics d'absorbance mesurée à 280nm ont ensuite été analysées en SDS-PAGE 12,5%. Les fractions correspondant aux protéines d'intérêt ont été regroupées et concentrées (*Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units : Merck Millipore*, seuil d'exclusion 30kDa). La concentration des protéines ainsi purifiées a été mesurée en analysant le spectre d'absorbance (260/280 nm) (*Nanodrop biospec shimazu*)

## III. Production et purification des ARN

### 1. Extraction d'ARNr endogène de levure

La souche sauvage de *S. cerevisiae* (BY4741) a été cultivée en milieu YPD à 25°C jusqu'à obtenir une  $DO_{600}$  de 10. Les cellules ont ensuite été récoltées par centrifugation (2000g, 5min), Chaque culot correspondant à 250mL de culture a été repris dans un mélange contenant 750µL d'une solution de thiocyanate de guanidinium (GTC) (100g GTC, 100mL H<sub>2</sub>O, 10,6mL 1M Tris/HCl pH8, 4,2mL 0,5M EDTA, 2,1mL β-mercaptoethanol, 21,2mL 20% Sarkozyl) 750µL de phénol et 1,5mL de billes de zirconium. Ce mélange a ensuite été vortexé 5 minutes à 4°C pour lyser les cellules. Les lysats obtenus ont été mélangés avec 6mL de thiocyanate de guanidinium et 6mL de phénol, incubés 10 minutes à 65°C puis 10 minutes à 4°C. 4mL d'une solution d'acetate de sodium à 100mM et 6mL de chloroforme ont ensuite été ajoutés. Les mélanges ont ensuite été centrifugés 30 minutes à 10 000g. La phase aqueuse a été récupérée et soumise à une précipitation à l'éthanol (2,5 volumes d'éthanol, 2H à -20°C). Après centrifugation (30 minutes à 5000g), les ARN précipités ont été lavés dans une solution d'éthanol 20%, et repris dans un tampon D (10mM Tris/HCl pH8, 400mM NaCl). Une chromatographie par échange d'ion a ensuite été réalisée sur colonne MonoQ HR 16/10 (*GE healthcare*) connectée à un appareil chromatographique Äkta-pure. L'éluion a été réalisée par gradient de NaCl en mélangeant les tampons D (10mM Tris/HCl pH8, 400mM NaCl) et E (10mM Tris/HCl pH8, 700mM NaCl). Les fractions éluées ont été déposées sur gel 5% polyacrylamide-urée 8M, et la présence d'ARN est révélée après marquage au SYBR safe (Life Technologies Corporation). Les échantillons ont été préparés avant dépôt par ajout de bleu de formamide 3X (80% formamide, 1 mg/mL bleu de bromophénol, 1mg/mL xylene cyanol, 10mM EDTA pH 8 glycerol 25%). Les

fractions correspondant aux ARNr 5S ont été regroupées, et précipitées à l'éthanol. Les ARN précipités ont alors été repris dans le tampon C (10 mM Tris/HCl at pH 8, 150 mM NaCl) et purifiés sur colonne Superdex75 16/60. Les fractions correspondant aux pics d'absorbance mesurée à 280nm ont été analysées sur gel 5% de polyacrylamide-urée 8M. La concentration des ARN ainsi purifiées a été mesurée en analysant le spectre d'absorbance (260/280nm).

## 2. Transcription *in vitro* de l'ARNr 5SΔ

### a. Préparation de l'ADN matrice

100 µL de bactéries *E. coli* DH5α chimio-compétentes ont été transformées par choc thermique (45 s à 42°C puis 4°C) en présence de 100ng de plasmide pUC18-(5SΔ). Les bactéries transformées ont ensuite été étalées sur boîte de Petri (LB-Agar) en présence d'ampicilline (ampicilline 100 µg/mL), incubées une nuit dans une étuve à 37°C, avant d'être stockées à 4°C. Une culture à saturation a ensuite été réalisée à partir de plusieurs colonies dans 1L de milieu LBA liquide (ampicilline 100 µg/mL), à 20°C sur la nuit et sous agitation. Les cellules ont été récoltées par centrifugation (30min à 5000g). L'ADN plasmidique a ensuite été extrait par l'emploi du kit « *Plasmid MidiPrep* » (QIAGEN). Comme l'ADN matrice ne contient pas de signal de terminaison de la transcription, le plasmide a été linéarisé par coupure endonucléolytique : le plasmide contient un site unique de coupure par l'endonucléase HindIII (NEB), placé en 3' de la séquence à transcrire. La réaction de clivage a été réalisée 30 minutes à 37°C en présence de 1U de HindIII pour 10µg d'ADN.

### b. Transcription *in vitro* et clivage des ribozymes

La réaction de transcription *in vitro* a été effectuée pendant 4H à 37°C dans un volume de 200µL, en présence de tampon θ (20mM Tris/HCl pH 7,5, 1mM spermidine, 10mM DTT, 8% PEG 8000, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5% Triton X100), 25mM de chaque NTP, 1µL de RNasine (*RiboLock RNase Inhibitor*, Fermentas, 40U/µL), 8µg d'ADN matriciel linéarisé et 10uL d'enzyme T7 RNA polymérase produite au laboratoire. Le clivage des ribozymes à tête de marteau et ribozymes delta a été réalisé en chauffant l'échantillon 10min à 80°C puis 4H à 55°C.

### c. Purification de l'ARNr 5SΔ sur gel

Un volume de 100uL de bleu de formamide 3X a été ajouté aux 200uL d'échantillon de transcription *in vitro*. Ce mélange a ensuite été chauffé 1 minute à 95°C, placés dans la glace, puis purifiés sur gel 5% de polyacrylamide-urée 8M. La migration électrophorétique a été effectuée dans un tampon TBE. Les fragments d'ARN ont ensuite été visualisés par ombrage sous UV, et les bandes de gel les contenant ont été découpées puis incubées une nuit à 4°C

dans un tampon d'éluion (10mM Tris/HCl pH 7,5, 300mM NaCl, 1mM EDTA, 1% SDS). Cette étape est suivie d'une extraction des ARN au phénol-chloroforme : pour 100µL d'échantillon, 400µL d'un mélange 50% phénol/50% chloroforme, 150µL de NaAc à 100mM, 200µL de GTC et 4µL de glycogène ont été ajoutés. Ce mélange a été chauffé 5min à 65°C, placé 5min dans la glace, et centrifugé 15min à 13 000g. La phase aqueuse a été récupérée et soumise à une précipitation à l'éthanol (2,5 volumes d'éthanol, 2H à -20°C). Après centrifugation (30 minutes à 5000g), les ARN précipités ont été lavés dans une solution d'éthanol 20%, et repris dans le tampon C (NaCl 150mM et Tris/Hcl pH8 50mM). La concentration des ARN ainsi purifiées a été mesurée en analysant le spectre d'absorbance (260/280nm)

## IV. Cristallogénèse

### 1. Cristallisation du complexe Rpf2/Rrs1

Dans le cas du complexe Rpf2/Rrs1 natif, les essais de cristallisation ont été menés par criblage des conditions de cristallisation en utilisant un robot *CYBIO Crystal-creator*. La méthode utilisée est la diffusion vapeur entre des gouttes assises de 2µL (1µL de complexe Rpf2/Rrs1 à 5, 7 et 13 mg/mL + 1µL de solution de réservoir) et 100µL de solutions de réservoir. Trois kits ont été testés : *Crystal Screen Formulation*, *INDEX formulation Hampton Research* et *JCAG Formulation*.

La protéolyse ménagée du complexe Rpf2/Rrs1 purifié a été réalisée en présence de Trypsine bovine (*Sigma*) à 1/1000 en masse. Les échantillons ont été incubés à 30°C pendant une heure. Les essais de cristallisation sont ensuite réalisés directement avec des solutions de complexe Rpf2/Rrs1 + Trypsine. Dans un premier temps, deux kits de cristallisation ont été testées (*Crystal Screen Formulation*, *INDEX formulation Hampton Research*) avec des concentrations en complexe Rpf2/Rrs1 de 6 et 16mg/mL. Les conditions dans lesquelles ont été obtenus les premiers cristaux (0,1M Tris pH8,5, 0,2M Lithium sulfate monohydrate, PEG 4000 30%, Rpf2/Rrs1 16 mg/mL) ont été répétées manuellement dans des boîtes 24 puits.

### 2. Cristallisation des complexes ARN/Rpf2/Rrs1

#### a. Reconstitution du complexe ARNr 5S/Rpf2/Rrs1 et essais de cristallisation

l'ARNr 5S purifié a été incubé sur roue pendant 30 minutes avec un excès de complexe Rpf2/Rrs1 (rapport 1:3) dans le tampon C (10 mM Tris/HCl at pH 8, 150 mM NaCl) en présence de MgCl<sub>2</sub> (5mM). Une chromatographie d'exclusion stérique sur colonne Superdex200 a ensuite été réalisée dans le même tampon. Les fractions contenant le complexe ARNr 5S/Rpf2/Rrs1 ont

été regroupées et concentrées (*Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units : Merck Millipore*, seuil d'exclusion 30kDa) jusqu'à des concentrations de 10 et 20mg/mL.

Les essais de cristallisation ont été menés par criblage des conditions de cristallisation en utilisant un robot *Mosquito Crystal (tp labtech)*. La méthode utilisée est la diffusion vapeur entre des gouttes assises de 0,2 $\mu$ L (0,1 $\mu$ L de complexe ARNr 5S/Rpf2/Rrs1 à 10 et 20 mg/mL + 0,1 $\mu$ L de solution de réservoir) et 100 $\mu$ L de solutions de réservoir. Trois kits ont été testés : *Crystal Screen Formulation, INDEX formulation Hampton Research et Nucleix Screen Formulation*.

#### **b. Reconstitution du complexe 5S $\Delta$ /Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$ et essais de cristallisation**

Avant l'association avec les protéines Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$ , l'ARNr 5S $\Delta$  a été soumis à une dénaturation (1min à 90°C) puis renaturation lente (dans le bain sec éteint, jusqu'à 20°C). Des quantités équimolaires d'ARN 5S $\Delta$  et de de complexe Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$  ont ensuite été incubées sur roue pendant 30 minutes à 20°C dans le tampon C (10 mM Tris/HCl at pH 8, 150 mM NaCl), en présence de MgCl<sub>2</sub> à 1mM Les essais de cristallisation ont été effectués directement à partir de ce mélange (à 10 et 20mg/mL), en utilisant les mêmes kits de cristallisation que pour le complexe ARNr 5S/Rpf2/Rrs1.

#### **c. Reconstitution des duplexes A et B, association avec le complexe Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$ et essais de cristallisation**

Le duplexe A a été reconstitué en mélangeant des quantités équimolaires (à 1 $\mu$ M) d'oligonucléotides A (5'-CCUGACCGAGUAGUGU-3') et B (5'-ACGCGAAACUCAGG-3') dans le tampon D (10mM Tris/HCl pH8, 400mM NaCl). L'échantillon a ensuite été soumis à une dénaturation (1min à 90°C) puis renaturation lente (dans le bain sec éteint, jusqu'à 20°C). Le duplexe B a été reconstitué de la même façon, en utilisant les oligonucléotides A et C (5'-GACGCGAAACUCAG-3').

L'association des duplexes A et B avec le complexe Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$  a été réalisée en mélangeant 40nmol de duplexe A ou B avec 30nmol de duplexe Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$  dans 2,5 mL de tampon D (10mM Tris/HCl pH8, 400mM NaCl). L'échantillon a ensuite été dialysé (Seuil d'exclusion 1kDa) une nuit à 4°C contre le tampon C (10mM Tris/HCl pH8, 150mM NaCl). L'échantillon a ensuite été concentré jusqu'à obtenir des concentrations de 10 et 20 mg/mL (Vivaspin 500 : Sartorius, Seuil d'exclusion 3kDa).

Les essais de cristallisation ont été effectués en utilisant les mêmes kits de cristallisation que pour le complexe ARNr 5S/Rpf2/Rrs1. Les conditions dans lesquelles ont été obtenus les premiers cristaux du complexe Duplexe B/Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$  (0,05M cacodylate de sodium pH6.5, 0,2M KCl, 0,1M MgAc, 10% PEG 8000, 10mg/mL et 20mg/mL de complexe Duplexe B/Rpf2 $\Delta$ /



Rrs1 $\Delta$ ) ont été répétées et optimisées manuellement dans des boîtes 24 puits. Les conditions de cristallisation ont été modifiées pour obtenir de plus grands cristaux (0,05M Tris/HCl pH8, 0,2M KCl, 0,1M MgAc, 12% PEG 8000, 10mg/mL et 20mg/mL de complexe Duplexe B/Rpf2 $\Delta$ /Rrs1 $\Delta$ ).

## V. Purification de l'ARN polymérase I et tests d'association avec le complexe Rpf2/Rrs1

### 1. Culture des levures et lyse des cellules

La souche de *S. cerevisiae* BY2423 a été cultivée en milieu YPD à 30°C jusqu'à obtenir une DO600 de 2. Les cellules ont ensuite été récoltées par centrifugation (5 minutes à 2000g) et lavées à l'eau 18 m $\Omega$  à 4°C. Chaque culot cellulaire correspondant à 1L de culture a ensuite été repris dans 5mL de tampon G (50mM Hepes/KOH pH7.8, 20% glycerol, 40mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3mM DTT et inhibiteur de protéases (Roche)). Les levures ont ensuite été lysées à 4°C par casse mécanique en utilisant un appareil *Cell-disruptor* (CellD). Le lysat obtenu a été clarifié par ultracentrifugation (Rotor T170, *Optima-L180XP Beckman*) à 100 000g pendant une heure à 4°C. Le surnageant a ensuite été récupéré, et la quantité de protéine a été dosée par la méthode de Bradford.

### 2. Purification sur billes d'IgG sépharose

Le surnageant a été transféré dans un tube contenant des billes IgG sépharose (GE Healthcare) (50 $\mu$ L de billes pour 20mg de protéines dans le surnageant) préalablement équilibrées avec 3x5volumes de tampon G. Le surnageant et les billes ont été incubées 2H sur roue à 4°C. Le lysat clarifié non retenu par les billes a ensuite été éliminé suite à une centrifugation (1min à 1000g à 4°C). Les billes ont ensuite été lavées 3 fois avec 10 volumes de tampon H (20mM Hepes/KOH pH7.8, 1500mM KOAc, 20% glycerol, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% NP-40 et inhibiteur de protéases (Roche)), puis 3 fois avec 10 volumes de Tampon I (20mM Hepes/KOH pH7.8, 200mM KOAc, 20% glycerol, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% NP-40 et inhibiteur de protéases (Roche)) afin d'éliminer les liaisons non spécifiques de complexes biologiques avec les billes IgG sépharose.

### 3. Association avec le complexe Rpf2/Rrs1

Les billes d'IgG sépharose couplées avec l'ARN polymérase I ont été transférées dans 2 tubes différents, incubées en absence et en présence d'une solution pure de complexe Rpf2/Rrs1 dans les proportions suivantes : 1,2 mL de billes pour 400µL de solution de complexe Rpf2/Rrs1 à 30µM purifiée dans le tampon C (NaCl 150mM et Tris/Hcl pH8 50mM), dans 20mL de tampon I. Les billes ont été incubées 1H sur roue à 4°C et le surnageant a été éliminé suite à une centrifugation (1min à 1000g à 4°C). Les billes ont ensuite été lavées 3 fois avec 10 volumes de tampon I sans inhibiteur de protéases.

### 4. Clivage à la TEV et analyse en SDS-PAGE

Le clivage de l'étiquette protéine A a été réalisé par la protéase TEV afin que l'ARN polymérase I soit séparée des billes. La coupure a été effectuée dans le tampon I, sans inhibiteur de protéases, dans un ratio volume tampon / volume billes de 1/1, en présence de 25µL d'une solution de His-TEV à 2mg/mL produite au laboratoire. Les billes ont ensuite été incubées 2H sur roue à 20°C. Les fractions éluées ont ensuite été collectées après centrifugation (1min à 1000g). Les éluats ont ensuite été analysés en SDS-PAGE 4-12%. Les échantillons pour les dépôts ont été préparés par ajout de bleu Laemmli (30µL d'éluat pour 10uL de bleu).

## VI. Tests d'association par capture d'affinité entre Rpf2/Rrs1 et Rpa49/

### Rpa34

Un culot bactérien correspondant à 1 litre de culture d'E. coli exprimant le dimère MBP-Rpa49/Rpa34 a été repris dans 10mL de tampon J (20mM HEPES/KOH pH7.8, 500mM KCl, 1mM EDTA, inhibiteur de protéases). Les cellules ont ensuite été lysées à l'aide d'un sonicateur pendant 6 minutes (1s de pulse, 1s de repos). Le lysat obtenu a ensuite été centrifugé à 27000g pendant 30 minutes. Le surnageant a été transféré dans un tube contenant 500µL de billes d'amylose, préalablement équilibrées trois fois avec 10mL de tampon J. Le surnageant et les billes ont été incubées 2H sur roue à 4°C. Le lysat clarifié non retenu par les billes a été éliminé suite à une centrifugation (1min à 1000g à 4°C). Les billes ont ensuite été lavées 3 fois avec 10mL de tampon J. Les billes d'amylose couplées à la protéine MBP-Rps14 utilisées comme contrôle négatif ont été préparées de la même façon.

Pour chaque interaction testée, 40µL de billes ont été incubées pendant 1H à 4°C en présence de 1mL de solutions pures de complexes His-Rpf2/Rrs1, His-Rpf2Δ/Rrs1Δ ou His-Rpf2ΔC-ter/Rrs1 (solutions à 2µM dans le tampon J). Le surnageant a été éliminé suite à une

centrifugation (1min à 1000g à 4°C). Les billes ont ensuite été lavées trois fois avec 1mL de tampon J. Après le dernier lavage, les billes ont été reprises dans 100uL de bleu Laemmli 1X. 5uL des différents échantillons ont ensuite été analysés sur SDS-PAGE 4-12%.

# BIBLIOGRAPHIE

---



Adams, P.D., Afonine, P.V., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Davis, I.W., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.-W., Kapral, G.J., Grosse-Kunstleve, R.W., et al. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 66, 213–221.

Afonine, P.V., Grosse-Kunstleve, R.W., Echols, N., Headd, J.J., Moriarty, N.W., Mustyakimov, M., Terwilliger, T.C., Urzhumtsev, A., Zwart, P.H., and Adams, P.D. (2012). Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 68, 352–367.

Albert, B., Léger-Silvestre, I., Normand, C., Ostermaier, M.K., Pérez-Fernández, J., Panov, K.I., Zomerdijk, J.C.B.M., Schultz, P., and Gadad, O. (2011). RNA polymerase I-specific subunits promote polymerase clustering to enhance the rRNA gene transcription cycle. *J. Cell Biol.* 192, 277–293.

Ammons, D., Rampersad, J., and Fox, G.E. (1999). 5S rRNA gene deletions cause an unexpectedly high fitness loss in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 27, 637–642.

Anczuków, O., Rosenberg, A.Z., Akerman, M., Das, S., Zhan, L., Karni, R., Muthuswamy, S.K., and Krainer, A.R. (2012). The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 220–228.

Appella, E., and Anderson, C.W. (2001). Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur. J. Biochem.* 268, 2764–2772.

Asano, N., Kato, K., Nakamura, A., Komoda, K., Tanaka, I., and Yao, M. (2015). Structural and functional analysis of the Rpf2-Rrs1 complex in ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res.* 43, 4746–4757.

Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* 289, 905–920.

Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., and Oren, M. (1993). mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.* 12, 461–468.

Barrio-Garcia, C., Thoms, M., Flemming, D., Kater, L., Berninghausen, O., Baßler, J., Beckmann, R., and Hurt, E. (2016). Architecture of the Rix1-Rea1 checkpoint machinery during pre-60S-ribosome remodeling. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 37–44.

Bassler, J., Grandi, P., Gadad, O., Lessmann, T., Petfalski, E., Tollervey, D., Lechner, J., and Hurt, E. (2001). Identification of a 60S preribosomal particle that is closely linked to nuclear export. *Mol. Cell* 8, 517–529.

Bassler, J., Kallas, M., Pertschy, B., Ulbrich, C., Thoms, M., and Hurt, E. (2010). The AAA-ATPase Rea1 drives removal of biogenesis factors during multiple stages of 60S ribosome assembly. *Mol. Cell* 38, 712–721.

Battye, T.G.G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H.R., and Leslie, A.G.W. (2011). iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67, 271–281.

Beckouet, F., Labarre-Mariotte, S., Albert, B., Imazawa, Y., Werner, M., Gadad, O., Nogi, Y., and Thuriaux, P. (2008). Two RNA polymerase I subunits control the binding and release of Rrn3 during transcription. *Mol. Cell Biol.* 28, 1596–1605.

Beltrame, M., and Tollervey, D. (1995). Base pairing between U3 and the pre-ribosomal RNA is required for 18S rRNA synthesis. *EMBO J.* 14, 4350–4356.

Ben-Shem, A., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2010). Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science* 330, 1203–1209.

- Betzl, C., Lorenz, S., Fürste, J.P., Bald, R., Zhang, M., Schneider, T.R., Wilson, K.S., and Erdmann, V.A. (1994). Crystal structure of domain A of *Thermus flavus* 5S rRNA and the contribution of water molecules to its structure. *FEBS Lett.* 351, 159–164.
- Bleichert, F., Granneman, S., Osheim, Y.N., Beyer, A.L., and Baserga, S.J. (2006). The PINc domain protein Utp24, a putative nuclease, is required for the early cleavage steps in 18S rRNA maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 9464–9469.
- Bohnsack, M.T., Kos, M., and Tollervey, D. (2008). Quantitative analysis of snoRNA association with pre-ribosomes and release of snR30 by Rok1 helicase. *EMBO Rep.* 9, 1230–1236.
- Bose, K.S., and Sarma, R.H. (1975). Delineation of the intimate details of the backbone conformation of pyridine nucleotide coenzymes in aqueous solution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 1173–1179.
- Burger, K., Mühl, B., Harasim, T., Rohrmoser, M., Malamoussi, A., Orban, M., Kellner, M., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., Hölzel, M., et al. (2010). Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels. *J. Biol. Chem.* 285, 12416–12425.
- Bursac, S., Brdovcak, M.C., Pfannkuchen, M., Orsolic, I., Golomb, L., Zhu, Y., Katz, C., Daftuar, L., Grabusic, K., Vukelic, I., et al. (2012). Mutual protection of ribosomal proteins L5 and L11 from degradation is essential for p53 activation upon ribosomal biogenesis stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 20467–20472.
- Calo, E., Flynn, R.A., Martin, L., Spitale, R.C., Chang, H.Y., and Wysocka, J. (2015). RNA helicase DDX21 coordinates transcription and ribosomal RNA processing. *Nature* 518, 249–253.
- Calviño, F.R., Kharde, S., Ori, A., Hendricks, A., Wild, K., Kressler, D., Bange, G., Hurt, E., Beck, M., and Sinning, I. (2015). Symportin 1 chaperones 5S RNP assembly during ribosome biogenesis by occupying an essential rRNA-binding site. *Nature Communications* 6, 6510.
- Cannon, M., and Richards, E.G. (1967). Electrophoresis in polyacrylamide gels of different “soluble” ribonucleic acid preparations from *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 103, 23C–25C.
- Chaker-Margot, M., Barandun, J., Hunziker, M., and Klinge, S. (2017). Architecture of the yeast small subunit processome. *Science* 355.
- Challice, J.M., and Segall, J. (1989). Transcription of the 5 S rRNA gene of *Saccharomyces cerevisiae* requires a promoter element at +1 and a 14-base pair internal control region. *J. Biol. Chem.* 264, 20060–20067.
- Chen, X., and Wolin, S.L. (2004). The Ro 60 kDa autoantigen: insights into cellular function and role in autoimmunity. *J. Mol. Med.* 82, 232–239.
- Chow, C.S., Hartmann, K.M., Rawlings, S.L., Huber, P.W., and Barton, J.K. (1992). Delineation of structural domains in eukaryotic 5S rRNA with a rhodium probe. *Biochemistry* 31, 3534–3542.
- Claude, A. (1943). The constitution of protoplasm. *Science* 97, 451–456.
- Clemens, K.R., Liao, X., Wolf, V., Wright, P.E., and Gottesfeld, J.M. (1992). Definition of the binding sites of individual zinc fingers in the transcription factor IIIA-5S RNA gene complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 10822–10826.
- Comb, D.G., and Sarkar, N. (1967). The binding of 5s ribosomal ribonucleic acid to ribosomal subunits. *J. Mol. Biol.* 25, 317–330.
- Comb, D.G., Sarkar, N., Devallet, J., and Pinzino, C.J. (1965). Properties of transfer-like RNA associated with ribosome. *J. Mol. Biol.* 12, 509–513.
- Cowtan, K. (2006). The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 62, 1002–1011.

- Cowtan, K. (2010). Recent developments in classical density modification. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 470–478.
- Dai, M.-S., and Lu, H. (2004). Inhibition of MDM2-mediated p53 Ubiquitination and Degradation by Ribosomal Protein L5. *Journal of Biological Chemistry* 279, 44475–44482.
- Dammann, R., Lucchini, R., Koller, T., and Sogo, J.M. (1993). Chromatin structures and transcription of rDNA in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 21, 2331–2338.
- Das, S., Anczuków, O., Akerman, M., and Krainer, A.R. (2012). Oncogenic splicing factor SRSF1 is a critical transcriptional target of MYC. *Cell Rep* 1, 110–117.
- Del Rio, S., Menezes, S.R., and Setzer, D.R. (1993). The function of individual zinc fingers in sequence-specific DNA recognition by transcription factor IIIA. *J. Mol. Biol.* 233, 567–579.
- DiMaio, F., Echols, N., Headd, J.J., Terwilliger, T.C., Adams, P.D., and Baker, D. (2013). Improved low-resolution crystallographic refinement with Phenix and Rosetta. *Nat. Methods* 10, 1102–1104.
- Dohme, F., and Nierhaus, K.H. (1976). Role of 5S RNA in assembly and function of the 50S subunit from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 2221–2225.
- Donati, G., Peddigari, S., Mercer, C., and Thomas, G. (2013). 5S Ribosomal RNA Is an Essential Component of a Nascent Ribosomal Precursor Complex that Regulates the Hdm2-p53 Checkpoint. *Cell Reports* 4, 87–98.
- Drygin, D., Lin, A., Bliesath, J., Ho, C.B., O'Brien, S.E., Proffitt, C., Omori, M., Haddach, M., Schwaebe, M.K., Siddiqui-Jain, A., et al. (2011). Targeting RNA polymerase I with an oral small molecule CX-5461 inhibits ribosomal RNA synthesis and solid tumor growth. *Cancer Res.* 71, 1418–1430.
- Elson, D. (1961). A ribonucleic acid particle released from ribosomes by salt. *Biochim. Biophys. Acta* 53, 232–234.
- Engel, C., Plitzko, J., and Cramer, P. (2016). RNA polymerase I-Rrn3 complex at 4.8 Å resolution. *Nat Commun* 7, 12129.
- Engelke, D.R., and Gottesfeld, J.M. (1990). Chromosomal footprinting of transcriptionally active and inactive oocyte-type 5S RNA genes of *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Res.* 18, 6031–6037.
- Faber, A.W., Van Dijk, M., Raué, H.A., and Vos, J.C. (2002). Ngl2p is a Ccr4p-like RNA nuclease essential for the final step in 3'-end processing of 5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 8, 1095–1101.
- Fatica, A., Oeffinger, M., Dlakić, M., and Tollervey, D. (2003). Nob1p is required for cleavage of the 3' end of 18S rRNA. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1798–1807.
- Felton-Edkins, Z.A., Fairley, J.A., Graham, E.L., Johnston, I.M., White, R.J., and Scott, P.H. (2003). The mitogen-activated protein (MAP) kinase ERK induces tRNA synthesis by phosphorylating TFIIB. *EMBO J.* 22, 2422–2432.
- Forget, B.G., and Weissman, S.M. (1967). Nucleotide sequence of KB cell 5S RNA. *Science* 158, 1695–1699.
- Fregoso, O.I., Das, S., Akerman, M., and Krainer, A.R. (2013). Splicing-factor oncoprotein SRSF1 stabilizes p53 via RPL5 and induces cellular senescence. *Mol. Cell* 50, 56–66.
- French, S., and Wilson, K. (1978). On the treatment of negative intensity observations. *Acta Crystallographica Section A* 34, 517–525.



- Fuentes, J.L., Datta, K., Sullivan, S.M., Walker, A., and Maddock, J.R. (2007). In vivo functional characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* 60S biogenesis GTPase Nog1. *Mol. Genet. Genomics* 278, 105–123.
- Fumagalli, S., Ivanenkov, V.V., Teng, T., and Thomas, G. (2012). Suprainduction of p53 by disruption of 40S and 60S ribosome biogenesis leads to the activation of a novel G2/M checkpoint. *Genes & Development* 26, 1028–1040.
- Gadal, O., Strauss, D., Kessler, J., Trumpower, B., Tollervey, D., and Hurt, E. (2001). Nuclear export of 60s ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3405–3415.
- Galani, K., Nissan, T.A., Petfalski, E., Tollervey, D., and Hurt, E. (2004). Rea1, a dynein-related nuclear AAA-ATPase, is involved in late rRNA processing and nuclear export of 60 S subunits. *J. Biol. Chem.* 279, 55411–55418.
- Gartmann, M., Blau, M., Armache, J.-P., Mielke, T., Topf, M., and Beckmann, R. (2010). Mechanism of eIF6-mediated inhibition of ribosomal subunit joining. *J. Biol. Chem.* 285, 14848–14851.
- Geerlings, T.H., Vos, J.C., and Raué, H.A. (2000). The final step in the formation of 25S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae* is performed by 5'→3' exonucleases. *RNA* 6, 1698–1703.
- Geiger, S.R., Lorenzen, K., Schrieck, A., Hanecker, P., Kostrewa, D., Heck, A.J.R., and Cramer, P. (2010). RNA Polymerase I Contains a TFIIIF-Related DNA-Binding Subcomplex. *Molecular Cell* 39, 583–594.
- Gérczei, T., and Correll, C.C. (2004). Imp3p and Imp4p mediate formation of essential U3-precursor rRNA (pre-rRNA) duplexes, possibly to recruit the small subunit processome to the pre-rRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 15301–15306.
- Gérczei, T., Shah, B.N., Manzo, A.J., Walter, N.G., and Correll, C.C. (2009). RNA chaperones stimulate formation and yield of the U3 snoRNA-Pre-rRNA duplexes needed for eukaryotic ribosome biogenesis. *J. Mol. Biol.* 390, 991–1006.
- Gomez-Roman, N., Felton-Edkins, Z.A., Kenneth, N.S., Goodfellow, S.J., Athineos, D., Zhang, J., Ramsbottom, B.A., Innes, F., Kantidakis, T., Kerr, E.R., et al. (2006). Activation by c-Myc of transcription by RNA polymerases I, II and III. *Biochem. Soc. Symp.* 141–154.
- Granneman, S., Gallagher, J.E.G., Vogelzangs, J., Horstman, W., van Venrooij, W.J., Baserga, S.J., and Pruijn, G.J.M. (2003). The human Imp3 and Imp4 proteins form a ternary complex with hMpp10, which only interacts with the U3 snoRNA in 60-80S ribonucleoprotein complexes. *Nucleic Acids Res.* 31, 1877–1887.
- Grummt, I. (2010). Wisely chosen paths--regulation of rRNA synthesis: delivered on 30 June 2010 at the 35th FEBS Congress in Gothenburg, Sweden. *FEBS J.* 277, 4626–4639.
- Han, Y., Yan, C., Nguyen, T.H.D., Jackobel, A.J., Ivanov, I., Knutson, B.A., and He, Y. (2017). Structural mechanism of ATP-independent transcription initiation by RNA polymerase I. *eLife* 6.
- Hannan, K.M., Hannan, R.D., Smith, S.D., Jefferson, L.S., Lun, M., and Rothblum, L.I. (2000). Rb and p130 regulate RNA polymerase I transcription: Rb disrupts the interaction between UBF and SL-1. *Oncogene* 19, 4988–4999.
- Hannan, K.M., Brandenburger, Y., Jenkins, A., Sharkey, K., Cavanaugh, A., Rothblum, L., Moss, T., Poortinga, G., McArthur, G.A., Pearson, R.B., et al. (2003). mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8862–8877.

- Hannan, R.D., Drygin, D., and Pearson, R.B. (2013). Targeting RNA polymerase I transcription and the nucleolus for cancer therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* 17, 873–878.
- Havel, J.J., Li, Z., Cheng, D., Peng, J., and Fu, H. (2015). Nuclear PRAS40 couples the Akt/mTORC1 signaling axis to the RPL11-HDM2-p53 nucleolar stress response pathway. *Oncogene* 34, 1487–1498.
- Hayes, J., Tullius, T.D., and Wolffe, A.P. (1989). A protein-protein interaction is essential for stable complex formation on a 5 S RNA gene. *J. Biol. Chem.* 264, 6009–6012.
- Held, W.A., Mizushima, S., and Nomura, M. (1973). Reconstitution of *Escherichia coli* 30 S ribosomal subunits from purified molecular components. *J. Biol. Chem.* 248, 5720–5730.
- Helm, M., Brulé, H., Giegé, R., and Florentz, C. (1999). More mistakes by T7 RNA polymerase at the 5' ends of in vitro-transcribed RNAs. *RNA* 5, 618–621.
- Henras, A.K., Soudet, J., Gêrus, M., Lebaron, S., Caizergues-Ferrer, M., Mougín, A., and Henry, Y. (2008). The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2334–2359.
- Henras, A.K., Plisson-Chastang, C., O'Donohue, M.-F., Chakraborty, A., and Gleizes, P.-E. (2015). An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 6, 225–242.
- Henry, Y., Wood, H., Morrissey, J.P., Petfalski, E., Kearsey, S., and Tollervey, D. (1994). The 5' end of yeast 5.8S rRNA is generated by exonucleases from an upstream cleavage site. *EMBO J.* 13, 2452–2463.
- Hiermeier, T., Merl, J., Sauert, M., Perez-Fernandez, J., Schultz, P., Bruckmann, A., Hamperl, S., Ohmayer, U., Rachel, R., Jacob, A., et al. (2013). Rrp5p, Noc1p and Noc2p form a protein module which is part of early large ribosomal subunit precursors in *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* 41, 1191–1210.
- Hiraishi, N., Ishida, Y., and Nagahama, M. (2015). AAA-ATPase NVL2 acts on MTR4-exosome complex to dissociate the nucleolar protein WDR74. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 467, 534–540.
- Ho, J.H., Kallstrom, G., and Johnson, A.W. (2000). Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *J. Cell Biol.* 151, 1057–1066.
- Honda, B.M., and Roeder, R.G. (1980). Association of a 5S gene transcription factor with 5S RNA and altered levels of the factor during cell differentiation. *Cell* 22, 119–126.
- Honda, R., and Yasuda, H. (2000). Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. *Oncogene* 19, 1473–1476.
- Horigome, C., Okada, T., Shimazu, K., Gasser, S.M., and Mizuta, K. (2011). Ribosome biogenesis factors bind a nuclear envelope SUN domain protein to cluster yeast telomeres. *The EMBO Journal* 30, 3799–3811.
- Horn, H.F., and Vousden, K.H. (2008). Cooperation between the ribosomal proteins L5 and L11 in the p53 pathway. *Oncogene* 27, 5774–5784.
- Horn, D.M., Mason, S.L., and Karbstein, K. (2011). Rcl1 protein, a novel nuclease for 18 S ribosomal RNA production. *J. Biol. Chem.* 286, 34082–34087.
- Howell, L., and Smith, D. (1992). Normal probability analysis. *Journal of Applied Crystallography* 25, 81–86.
- Huber, P.W., Rife, J.P., and Moore, P.B. (2001). The structure of helix III in *Xenopus* oocyte 5 S rRNA: an RNA stem containing a two-nucleotide bulge. *J. Mol. Biol.* 312, 823–832.

- Hunziker, M., Barandun, J., Petfalski, E., Tan, D., Delan-Forino, C., Molloy, K.R., Kim, K.H., Dunn-Davies, H., Shi, Y., Chaker-Margot, M., et al. (2016). UtpA and UtpB chaperone nascent pre-ribosomal RNA and U3 snoRNA to initiate eukaryotic ribosome assembly. *Nat Commun* 7, 12090.
- Iacovella, M.G., Golfieri, C., Massari, L.F., Busnelli, S., Pagliuca, C., Dal Maschio, M., Infantino, V., Visintin, R., Mechtler, K., Ferreira-Cerca, S., et al. (2015). Rio1 promotes rDNA stability and downregulates RNA polymerase I to ensure rDNA segregation. *Nat Commun* 6, 6643.
- Iadevaia, V., Liu, R., and Proud, C.G. (2014). mTORC1 signaling controls multiple steps in ribosome biogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 36, 113–120.
- Jackson, M.W., and Berberich, S.J. (2000). MdmX protects p53 from Mdm2-mediated degradation. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1001–1007.
- Jones, H.S., Kawauchi, J., Braglia, P., Alen, C.M., Kent, N.A., and Proudfoot, N.J. (2007). RNA polymerase I in yeast transcribes dynamic nucleosomal rDNA. *Nature Structural & Molecular Biology* 14, 123–130.
- Kabsch, W. (2010). XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 125–132.
- Kappel, L., Loibl, M., Zisser, G., Klein, I., Fruhmann, G., Gruber, C., Unterweger, S., Rechberger, G., Pertschy, B., and Bergler, H. (2012). Rlp24 activates the AAA-ATPase Drg1 to initiate cytoplasmic pre-60S maturation. *J. Cell Biol.* 199, 771–782.
- Karplus, P.A., and Diederichs, K. (2012). Linking Crystallographic Model and Data Quality. *Science* 336, 1030–1033.
- Kasahara, K., Ohya, Y., and Kokubo, T. (2011). Hmo1 directs pre-initiation complex assembly to an appropriate site on its target gene promoters by masking a nucleosome-free region. *Nucleic Acids Res.* 39, 4136–4150.
- Keller, E.B., Zamecnik, P.C., and Lofffield, R.B. (1954). The role of microsomes in the incorporation of amino acids into proteins. *J. Histochem. Cytochem.* 2, 378–386.
- Kharde, S., Calviño, F.R., Gumiero, A., Wild, K., and Sinning, I. (2015). The structure of Rpf2-Rrs1 explains its role in ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Res.* 43, 7083–7095.
- Kholod, N., Vassilenko, K., Shlyapnikov, M., Ksenzenko, V., and Kisselev, L. (1998). Preparation of active tRNA gene transcripts devoid of 3'-extended products and dimers. *Nucleic Acids Res.* 26, 2500–2501.
- Kishore, S., and Stamm, S. (2006). The snoRNA HBII-52 regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C. *Science* 311, 230–232.
- Kobayashi, T., Heck, D.J., Nomura, M., and Horiuchi, T. (1998). Expansion and contraction of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement of replication fork blocking (Fob1) protein and the role of RNA polymerase I. *Genes Dev.* 12, 3821–3830.
- Korepanov, A.P., Gongadze, G.M., Garber, M.B., Court, D.L., and Bubunencko, M.G. (2007). Importance of the 5 S rRNA-binding ribosomal proteins for cell viability and translation in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 366, 1199–1208.
- Kos, M., and Tollervey, D. (2010). Yeast pre-rRNA processing and modification occur cotranscriptionally. *Mol. Cell* 37, 809–820.
- Kovacina, K.S., Park, G.Y., Bae, S.S., Guzzetta, A.W., Schaefer, E., Birnbaum, M.J., and Roth, R.A. (2003). Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner. *J. Biol. Chem.* 278, 10189–10194.

- Kovalevskiy, O., Nicholls, R.A., and Murshudov, G.N. (2016). Automated refinement of macromolecular structures at low resolution using prior information. *Acta Crystallographica Section D Structural Biology* 72, 1149–1161.
- Kressler, D., Roser, D., Pertschy, B., and Hurt, E. (2008). The AAA ATPase Rix7 powers progression of ribosome biogenesis by stripping Nsa1 from pre-60S particles. *J. Cell Biol.* 181, 935–944.
- Kressler, D., Bange, G., Ogawa, Y., Stjepanovic, G., Bradatsch, B., Pratte, D., Amlacher, S., Strauß, D., Yoneda, Y., Katahira, J., et al. (2012). Synchronizing nuclear import of ribosomal proteins with ribosome assembly. *Science* 338, 666–671.
- Krogan, N.J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A.P., et al. (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 440, 637–643.
- Kuhn, C.-D., Geiger, S.R., Baumli, S., Gartmann, M., Gerber, J., Jennebach, S., Mielke, T., Tschochner, H., Beckmann, R., and Cramer, P. (2007). Functional architecture of RNA polymerase I. *Cell* 131, 1260–1272.
- Lafontaine, D., Vandenhoute, J., and Tollervey, D. (1995). The 18S rRNA dimethylase Dim1p is required for pre-ribosomal RNA processing in yeast. *Genes Dev.* 9, 2470–2481.
- Lam, Y.W., Lamond, A.I., Mann, M., and Andersen, J.S. (2007). Analysis of Nucleolar Protein Dynamics Reveals the Nuclear Degradation of Ribosomal Proteins. *Current Biology* 17, 749–760.
- Lapik, Y.R., Misra, J.M., Lau, L.F., and Pestov, D.G. (2007). Restricting conformational flexibility of the switch II region creates a dominant-inhibitory phenotype in Obg GTPase Nog1. *Mol. Cell Biol.* 27, 7735–7744.
- Lebaron, S., Froment, C., Fromont-Racine, M., Rain, J.-C., Monsarrat, B., Caizergues-Ferrer, M., and Henry, Y. (2005). The Splicing ATPase Prp43p Is a Component of Multiple Preribosomal Particles. *Molecular and Cellular Biology* 25, 9269–9282.
- Lebaron, S., Schneider, C., van Nues, R.W., Swiatkowska, A., Walsh, D., Böttcher, B., Granneman, S., Watkins, N.J., and Tollervey, D. (2012). Proofreading of pre-40S ribosome maturation by a translation initiation factor and 60S subunits. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 744–753.
- Lebaron, S., Segerstolpe, Å., French, S.L., Dudnakova, T., de Lima Alves, F., Granneman, S., Rappsilber, J., Beyer, A.L., Wieslander, L., and Tollervey, D. (2013). Rrp5 Binding at Multiple Sites Coordinates Pre-rRNA Processing and Assembly. *Molecular Cell* 52, 707–719.
- Leidig, C., Thoms, M., Holdermann, I., Bradatsch, B., Berninghausen, O., Bange, G., Sinning, I., Hurt, E., and Beckmann, R. (2014). 60S ribosome biogenesis requires rotation of the 5S ribonucleoprotein particle. *Nat Commun* 5, 3491.
- Li, M., and Gu, W. (2011). A critical role for noncoding 5S rRNA in regulating Mdmx stability. *Mol. Cell* 43, 1023–1032.
- Liang, X.-H., Liu, Q., and Fournier, M.J. (2009). Loss of rRNA modifications in the decoding center of the ribosome impairs translation and strongly delays pre-rRNA processing. *RNA* 15, 1716–1728.
- Lindahl, L., Archer, R.H., and Zengel, J.M. (1992). A new rRNA processing mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 20, 295–301.
- Lohrum, M.A., Ludwig, R.L., Kubbutat, M.H., Hanlon, M., and Vousden, K.H. (2003). Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell* 3, 577–587.

- Long, J.C., and Cáceres, J.F. (2009). The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem. J.* 417, 15–27.
- Lorenz, S., Perbandt, M., Lippmann, C., Moore, K., DeLucas, L.J., Betzel, C., and Erdmann, V.A. (2000). Crystallization of engineered *Thermus flavus* 5S rRNA under earth and microgravity conditions. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 56, 498–500.
- Lu, D., Searles, M.A., and Klug, A. (2003). Crystal structure of a zinc-finger-RNA complex reveals two modes of molecular recognition. *Nature* 426, 96–100.
- Luehrsens, K.R., and Fox, G.E. (1981). Secondary structure of eukaryotic cytoplasmic 5S ribosomal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 2150–2154.
- Manikas, R.-G., Thomson, E., Thoms, M., and Hurt, E. (2016). The K<sup>+</sup>-dependent GTPase Nug1 is implicated in the association of the helicase Dbp10 to the immature peptidyl transferase centre during ribosome maturation. *Nucleic Acids Res.* 44, 1800–1812.
- Maraia, R.J., and Intine, R.V. (2001). Recognition of nascent RNA by the human La antigen: conserved and divergent features of structure and function. *Mol. Cell. Biol.* 21, 367–379.
- Marechal, V., Elenbaas, B., Piette, J., Nicolas, J.-C., and Levine, A.J. (1994). The ribosomal L5 protein is associated with mdm-2 and mdm-2-p53 complexes. *Molecular and Cellular Biology* 14, 7414–7420.
- Marniemi, J., and Parkki, M.G. (1975). Radiochemical assay of glutathione S-epoxide transferase and its enhancement by phenobarbital in rat liver in vivo. *Biochem. Pharmacol.* 24, 1569–1572.
- Matsuo, Y., Granneman, S., Thoms, M., Manikas, R.-G., Tollervey, D., and Hurt, E. (2014). Coupled GTPase and remodelling ATPase activities form a checkpoint for ribosome export. *Nature* 505, 112–116.
- Mayer, C., and Grummt, I. (2006). Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene* 25, 6384–6391.
- Mayer, C., Zhao, J., Yuan, X., and Grummt, I. (2004). mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev.* 18, 423–434.
- McCoy, A.J. (2007). Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 63, 32–41.
- Merz, K., Hondele, M., Goetze, H., Gmelch, K., Stoeckl, U., and Griesenbeck, J. (2008). Actively transcribed rRNA genes in *S. cerevisiae* are organized in a specialized chromatin associated with the high-mobility group protein Hmo1 and are largely devoid of histone molecules. *Genes Dev.* 22, 1190–1204.
- Michel, C.I., Holley, C.L., Scruggs, B.S., Sidhu, R., Brookheart, R.T., Listenberger, L.L., Behlke, M.A., Ory, D.S., and Schaffer, J.E. (2011). Small Nucleolar RNAs U32a, U33, and U35a Are Critical Mediators of Metabolic Stress. *Cell Metabolism* 14, 33–44.
- Michlewski, G., Sanford, J.R., and Cáceres, J.F. (2008). The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1. *Mol. Cell* 30, 179–189.
- Milkereit, P., and Tschochner, H. (1998). A specialized form of RNA polymerase I, essential for initiation and growth-dependent regulation of rRNA synthesis, is disrupted during transcription. *EMBO J.* 17, 3692–3703.
- Miller, O.L., and Beatty, B.R. (1969). Visualization of nucleolar genes. *Science* 164, 955–957.
- Milligan, J.F., Groebe, D.R., Witherell, G.W., and Uhlenbeck, O.C. (1987). Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res.* 15, 8783–8798.

- Miyazaki, M. (1974). Studies on the nucleotide sequence of pseudouridine-containing 5S RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.* 75, 1407–1410.
- Montanaro, L., Treré, D., and Derenzini, M. (2008). Nucleolus, ribosomes, and cancer. *Am. J. Pathol.* 173, 301–310.
- Moradi, H., Simoff, I., Bartish, G., and Nygård, O. (2008). Functional features of the C-terminal region of yeast ribosomal protein L5. *Mol. Genet. Genomics* 280, 337–350.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A., and Dodson, E.J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 53, 240–255.
- Nagahama, M., Yamazoe, T., Hara, Y., Tani, K., Tsuji, A., and Tagaya, M. (2006). The AAA-ATPase NVL2 is a component of pre-ribosomal particles that interacts with the DExD/H-box RNA helicase DOB1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346, 1075–1082.
- Narla, A., and Ebert, B.L. (2010). Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood* 115, 3196–3205.
- Ng, C.L., Waterman, D., Koonin, E.V., Antson, A.A., and Ortiz-Lombardía, M. (2005). Crystal structure of Mif (Mth680): internal duplication and similarity between the Imp4/Brix domain and the anticodon-binding domain of class IIa aminoacyl-tRNA synthetases. *EMBO Reports* 6, 140–146.
- Nolte, R.T., Conlin, R.M., Harrison, S.C., and Brown, R.S. (1998). Differing roles for zinc fingers in DNA recognition: structure of a six-finger transcription factor IIIA complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 2938–2943.
- O'Brien, C.A., and Wolin, S.L. (1994). A possible role for the 60-kD Ro autoantigen in a discard pathway for defective 5S rRNA precursors. *Genes Dev.* 8, 2891–2903.
- Oeffinger, M., Zenklusen, D., Ferguson, A., Wei, K.E., El Hage, A., Tollervey, D., Chait, B.T., Singer, R.H., and Rout, M.P. (2009). Rrp17p is a eukaryotic exonuclease required for 5' end processing of Pre-60S ribosomal RNA. *Mol. Cell* 36, 768–781.
- Ogawara, Y., Kishishita, S., Obata, T., Isazawa, Y., Suzuki, T., Tanaka, K., Masuyama, N., and Gotoh, Y. (2002). Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *J. Biol. Chem.* 277, 21843–21850.
- Ogilvie, M.K., and Hanas, J.S. (1997). Molecular biology of vertebrate transcription factor IIIA: cloning and characterization of TFIIIA from channel catfish oocytes. *Gene* 203, 103–112.
- Ono, M., Yamada, K., Avolio, F., Scott, M.S., van Koningsbruggen, S., Barton, G.J., and Lamond, A.I. (2010). Analysis of human small nucleolar RNAs (snoRNA) and the development of snoRNA modulator of gene expression vectors. *Mol. Biol. Cell* 21, 1569–1584.
- Palade, G.E. (1955). A small particulate component of the cytoplasm. *J Biophys Biochem Cytol* 1, 59–68.
- Pelham, H.R., and Brown, D.D. (1980). A specific transcription factor that can bind either the 5S RNA gene or 5S RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 4170–4174.
- Peltonen, K., Colis, L., Liu, H., Jäämaa, S., Zhang, Z., Af Hällström, T., Moore, H.M., Sirajuddin, P., and Laiho, M. (2014). Small molecule BMH-compounds that inhibit RNA polymerase I and cause nucleolar stress. *Mol. Cancer Ther.* 13, 2537–2546.
- Pertschy, B., Saveanu, C., Zisser, G., Lebreton, A., Tengg, M., Jacquier, A., Liebminger, E., Nobis, B., Kappel, L., van der Klei, I., et al. (2007). Cytoplasmic recycling of 60S preribosomal factors depends on the AAA protein Drg1. *Mol. Cell. Biol.* 27, 6581–6592.

- Pertschy, B., Schneider, C., Gnädig, M., Schäfer, T., Tollervey, D., and Hurt, E. (2009). RNA helicase Prp43 and its co-factor Pfa1 promote 20 to 18 S rRNA processing catalyzed by the endonuclease Nob1. *J. Biol. Chem.* 284, 35079–35091.
- Pieler, T., Digweed, M., Bartsch, M., and Erdmann, V.A. (1983). Comparative structural analysis of cytoplasmic and chloroplastic 5S rRNA from spinach. *Nucleic Acids Res.* 11, 591–604.
- Pieler, T., Digweed, M., and Erdmann, V.A. (1985). RNA structural dynamics: pre-melting and melting transitions in *E. coli* 5S rRNA. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 3, 495–514.
- Pieler, T., Hamm, J., and Roeder, R.G. (1987). The 5S gene internal control region is composed of three distinct sequence elements, organized as two functional domains with variable spacing. *Cell* 48, 91–100.
- Piisl, M., Crucifix, C., Papai, G., Krupp, F., Steinbauer, R., Griesenbeck, J., Milkereit, P., Tschochner, H., and Schultz, P. (2016). Structure of the initiation-competent RNA polymerase I and its implication for transcription. *Nature Communications* 7, 12126.
- Pittman, R.H., Andrews, M.T., and Setzer, D.R. (1999). A feedback loop coupling 5 S rRNA synthesis to accumulation of a ribosomal protein. *J. Biol. Chem.* 274, 33198–33201.
- Pleiss, J.A., Derrick, M.L., and Uhlenbeck, O.C. (1998). T7 RNA polymerase produces 5' end heterogeneity during *in vitro* transcription from certain templates. *RNA* 4, 1313–1317.
- Quin, J., Chan, K.T., Devlin, J.R., Cameron, D.P., Diesch, J., Cullinane, C., Ahern, J., Khot, A., Hein, N., George, A.J., et al. (2016). Inhibition of RNA polymerase I transcription initiation by CX-5461 activates non-canonical ATM/ATR signaling. *Oncotarget* 7, 49800–49818.
- van Riggelen, J., Yetil, A., and Felsher, D.W. (2010). MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nat. Rev. Cancer* 10, 301–309.
- Rodríguez-Mateos, M., García-Gómez, J.J., Francisco-Velilla, R., Remacha, M., de la Cruz, J., and Ballesta, J.P.G. (2009). Role and dynamics of the ribosomal protein P0 and its related trans-acting factor Mrt4 during ribosome assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 37, 7519–7532.
- Rosset, R., and Monier, R. (1963). A propos de la présence d'acide ribonucléique de faible poids moléculaire dans les ribosomes d'*Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Nucleic Acids and Related Subjects* 68, 653–656.
- Rout, M.P., Blobel, G., and Aitchison, J.D. (1997). A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins. *Cell* 89, 715–725.
- Rudra, D., and Warner, J.R. (2004). What better measure than ribosome synthesis? *Genes Dev.* 18, 2431–2436.
- Ruggero, D. (2012). Revisiting the nucleolus: from marker to dynamic integrator of cancer signaling. *Sci Signal* 5, pe38.
- Sarkar, A., Pech, M., Thoms, M., Beckmann, R., and Hurt, E. (2016). Ribosome-stalk biogenesis is coupled with recruitment of nuclear-export factor to the nascent 60S subunit. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 1074–1082.
- Sasaki, M., Kawahara, K., Nishio, M., Mimori, K., Kogo, R., Hamada, K., Itoh, B., Wang, J., Komatsu, Y., Yang, Y.R., et al. (2011). Regulation of the MDM2-P53 pathway and tumor growth by PICT1 via nucleolar RPL11. *Nat. Med.* 17, 944–951.
- Saveanu, C., Namane, A., Gleizes, P.-E., Lebreton, A., Rousselle, J.-C., Noillac-Depeyre, J., Gas, N., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M. (2003). Sequential Protein Association with Nascent 60S Ribosomal Particles. *Molecular and Cellular Biology* 23, 4449–4460.

- Schillewaert, S., Wacheul, L., Lhomme, F., and Lafontaine, D.L.J. (2012). The evolutionarily conserved protein Las1 is required for pre-rRNA processing at both ends of ITS2. *Mol. Cell. Biol.* 32, 430–444.
- Schmitt, M.E., and Clayton, D.A. (1993). Nuclear RNase MRP is required for correct processing of pre-5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 13, 7935–7941.
- Schmoltdt, A., Benthe, H.F., and Haberland, G. (1975). Digitoxin metabolism by rat liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 24, 1639–1641.
- Schuwirth, B.S., Borovinskaya, M.A., Hau, C.W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J.M., and Cate, J.H.D. (2005). Structures of the bacterial ribosome at 3.5 Å resolution. *Science* 310, 827–834.
- Share, J.B. (1976). Review of drug treatment for Down's syndrome persons. *Am J Ment Defic* 80, 388–393.
- Sloan, K., Bohnsack, M., and Watkins, N. (2013). The 5S RNP Couples p53 Homeostasis to Ribosome Biogenesis and Nucleolar Stress. *Cell Reports* 5, 237–247.
- Smith, K.C. (1962). Studies on the amino acid acceptor RNA in washed liver microsomes. *Biochemistry* 1, 866–874.
- Sneath, B., Vary, C., Pavlakis, G., and Vournakis, J. (1986). Secondary structure of *Tetrahymena thermophila* 5S ribosomal RNA as revealed by enzymatic digestion and microdensitometric analysis. *Nucleic Acids Res.* 14, 1365–1378.
- Spahn, C.M.T., Gomez-Lorenzo, M.G., Grassucci, R.A., Jørgensen, R., Andersen, G.R., Beckmann, R., Penczek, P.A., Ballesta, J.P.G., and Frank, J. (2004). Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. *EMBO J.* 23, 1008–1019.
- Srivastava, L., Lapik, Y.R., Wang, M., and Pestov, D.G. (2010). Mammalian DEAD box protein Ddx51 acts in 3' end maturation of 28S rRNA by promoting the release of U8 snoRNA. *Mol. Cell. Biol.* 30, 2947–2956.
- Stefano, J.E. (1984). Purified lupus antigen La recognizes an oligouridylate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts. *Cell* 36, 145–154.
- Stefanovsky, V.Y., Pelletier, G., Hannan, R., Gagnon-Kugler, T., Rothblum, L.I., and Moss, T. (2001). An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Mol. Cell* 8, 1063–1073.
- Stefanovsky, V.Y., Langlois, F., Bazett-Jones, D., Pelletier, G., and Moss, T. (2006). ERK modulates DNA bending and enhancesome structure by phosphorylating HMG1-boxes 1 and 2 of the RNA polymerase I transcription factor UBF. *Biochemistry* 45, 3626–3634.
- Steitz, J.A., Berg, C., Hendrick, J.P., La Branche-Chabot, H., Metspalu, A., Rinke, J., and Yario, T. (1988). A 5S rRNA/L5 complex is a precursor to ribosome assembly in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 106, 545–556.
- Strunk, B.S., Novak, M.N., Young, C.L., and Karbstein, K. (2012). A translation-like cycle is a quality control checkpoint for maturing 40S ribosome subunits. *Cell* 150, 111–121.
- Stults, D.M., Killen, M.W., Pierce, H.H., and Pierce, A.J. (2008). Genomic architecture and inheritance of human ribosomal RNA gene clusters. *Genome Res.* 18, 13–18.
- Sun, Q., Zhu, X., Qi, J., An, W., Lan, P., Tan, D., Chen, R., Wang, B., Zheng, S., Zhang, C., et al. (2017). Molecular architecture of the 90S small subunit pre-ribosome. *Elife* 6.
- Tafforeau, L., Zorbas, C., Langhendries, J.-L., Mullineux, S.-T., Stamatopoulou, V., Mullier, R., Wacheul, L., and Lafontaine, D.L.J. (2013). The complexity of human ribosome biogenesis



revealed by systematic nucleolar screening of Pre-rRNA processing factors. *Mol. Cell* 51, 539–551.

Talkish, J., Zhang, J., Jakovljevic, J., Horsey, E.W., and Woolford, J.L. (2012). Hierarchical recruitment into nascent ribosomes of assembly factors required for 27SB pre-rRNA processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* 40, 8646–8661.

Tessarz, P., Santos-Rosa, H., Robson, S.C., Sylvestersen, K.B., Nelson, C.J., Nielsen, M.L., and Kouzarides, T. (2014). Glutamine methylation in histone H2A is an RNA-polymerase-I-dedicated modification. *Nature* 505, 564–568.

Thiry, M., and Lafontaine, D.L.J. (2005). Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol.* 15, 194–199.

Thoms, M., Thomson, E., Baßler, J., Gnädig, M., Griesel, S., and Hurt, E. (2015). The Exosome Is Recruited to RNA Substrates through Specific Adaptor Proteins. *Cell* 162, 1029–1038.

Thomson, E., and Tollervey, D. (2005). Nop53p is required for late 60S ribosome subunit maturation and nuclear export in yeast. *RNA* 11, 1215–1224.

Thomson, E., and Tollervey, D. (2010). The final step in 5.8S rRNA processing is cytoplasmic in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 30, 976–984.

de Toledo, S.M., Azzam, E.I., Dahlberg, W.K., Gooding, T.B., and Little, J.B. (2000). ATM complexes with HDM2 and promotes its rapid phosphorylation in a p53-independent manner in normal and tumor human cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* 19, 6185–6193.

Toussaint, M., Levasseur, G., Tremblay, M., Paquette, M., and Conconi, A. (2005). Psoralen photocrosslinking, a tool to study the chromatin structure of RNA polymerase I-transcribed ribosomal genes. *Biochem. Cell Biol.* 83, 449–459.

Trapman, J., Retèl, J., and Planta, R.J. (1975). Ribosomal precursor particles from yeast. *Exp. Cell Res.* 90, 95–104.

Udem, S.A., and Warner, J.R. (1973). The cytoplasmic maturation of a ribosomal precursor ribonucleic acid in yeast. *J. Biol. Chem.* 248, 1412–1416.

Ulbrich, C., Diepholz, M., Bassler, J., Kressler, D., Pertschy, B., Galani, K., Böttcher, B., and Hurt, E. (2009). Mechanochemical removal of ribosome biogenesis factors from nascent 60S ribosomal subunits. *Cell* 138, 911–922.

Venema, J., and Tollervey, D. (1995). Processing of pre-ribosomal RNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11, 1629–1650.

Vonrhein, C., Blanc, E., Roversi, P., and Bricogne, G. (2007). Automated structure solution with autoSHARP. *Methods Mol. Biol.* 364, 215–230.

Van Hoof, A., Lennertz, P., and Parker, R. (2000). Three conserved members of the RNase D family have unique and overlapping functions in the processing of 5S, 5.8S, U4, U5, RNase MRP and RNase P RNAs in yeast. *EMBO J.* 19, 1357–1365.

Wai, H.H., Vu, L., Oakes, M., and Nomura, M. (2000). Complete deletion of yeast chromosomal rDNA repeats and integration of a new rDNA repeat: use of rDNA deletion strains for functional analysis of rDNA promoter elements in vivo. *Nucleic Acids Res.* 28, 3524–3534.

Wan, K., Yabuki, Y., and Mizuta, K. (2015). Roles of Ebp2 and ribosomal protein L36 in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* 61, 31–41.

Warner, J.R. (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem. Sci.* 24, 437–440.

- Weaver, P.L., Sun, C., and Chang, T.H. (1997). Dbp3p, a putative RNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for efficient pre-rRNA processing predominantly at site A3. *Mol. Cell. Biol.* 17, 1354–1365.
- Wehner, K.A., and Baserga, S.J. (2002). The sigma(70)-like motif: a eukaryotic RNA binding domain unique to a superfamily of proteins required for ribosome biogenesis. *Mol. Cell* 9, 329–339.
- Wells, G.R., Weichmann, F., Colvin, D., Sloan, K.E., Kudla, G., Tollervey, D., Watkins, N.J., and Schneider, C. (2016). The PIN domain endonuclease Utp24 cleaves pre-ribosomal RNA at two coupled sites in yeast and humans. *Nucleic Acids Res.* 44, 5399–5409.
- Winn, M.D., Ballard, C.C., Cowtan, K.D., Dodson, E.J., Emsley, P., Evans, P.R., Keegan, R.M., Krissinel, E.B., Leslie, A.G.W., McCoy, A., et al. (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67, 235–242.
- Woolford, J.L., and Baserga, S.J. (2013). Ribosome Biogenesis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 195, 643–681.
- Wu, S., Tutuncuoglu, B., Yan, K., Brown, H., Zhang, Y., Tan, D., Gamalinda, M., Yuan, Y., Li, Z., Jakovljevic, J., et al. (2016). Diverse roles of assembly factors revealed by structures of late nuclear pre-60S ribosomes. *Nature* 534, 133–137.
- Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D., and Levine, A.J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* 7, 1126–1132.
- Xing, Y.-H., Yao, R.-W., Zhang, Y., Guo, C.-J., Jiang, S., Xu, G., Dong, R., Yang, L., and Chen, L.-L. (2017). SLERT Regulates DDX21 Rings Associated with Pol I Transcription. *Cell* 169, 664–678.e16.
- Xiong, Y., and Sundaralingam, M. (2000). Two crystal forms of helix II of *Xenopus laevis* 5S rRNA with a cytosine bulge. *RNA* 6, 1316–1324.
- Yao, W., Roser, D., Köhler, A., Bradatsch, B., Bassler, J., and Hurt, E. (2007). Nuclear export of ribosomal 60S subunits by the general mRNA export receptor Mex67-Mtr2. *Mol. Cell* 26, 51–62.
- Yao, W., Lutzmann, M., and Hurt, E. (2008). A versatile interaction platform on the Mex67-Mtr2 receptor creates an overlap between mRNA and ribosome export. *EMBO J.* 27, 6–16.
- Yoshikatsu, Y., Ishida, Y., Sudo, H., Yuasa, K., Tsuji, A., and Nagahama, M. (2015). NVL2, a nucleolar AAA-ATPase, is associated with the nuclear exosome and is involved in pre-rRNA processing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 464, 780–786.
- Yu, Y.T., and Nilsen, T.W. (1992). Sequence requirements for maturation of the 5' terminus of human 18 S rRNA in vitro. *J. Biol. Chem.* 267, 9264–9268.
- Zhai, W., and Comai, L. (2000). Repression of RNA polymerase I transcription by the tumor suppressor p53. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5930–5938.
- Zhang, J., Harnpicharnchai, P., Jakovljevic, J., Tang, L., Guo, Y., Oeffinger, M., Rout, M.P., Hiley, S.L., Hughes, T., and Woolford, J.L. (2007). Assembly factors Rpf2 and Rrs1 recruit 5S rRNA and ribosomal proteins rpL5 and rpL11 into nascent ribosomes. *Genes & Development* 21, 2580–2592.
- Zheng, J., Lang, Y., Zhang, Q., Cui, D., Sun, H., Jiang, L., Chen, Z., Zhang, R., Gao, Y., Tian, W., et al. (2015). Structure of human MDM2 complexed with RPL11 reveals the molecular basis of p53 activation. *Genes & Development* 29, 1524–1534.
- Zorbias, C., Nicolas, E., Wacheul, L., Huvelle, E., Heurgué-Hamard, V., and Lafontaine, D.L.J. (2015). The human 18S rRNA base methyltransferases DIMT1L and WBSCR22-TRMT112 but not rRNA modification are required for ribosome biogenesis. *Mol. Biol. Cell* 26, 2080–2095.





## RÉSUMÉ

La biogenèse des ribosomes est un processus complexe qui implique la production et l'assemblage de 4 ARN et d'environ 80 protéines. Chez l'Homme, la production des deux sous-unités ribosomiques débute dans le nucléole par la synthèse par l'ARN polymérase I d'un long transcrite contenant les séquences des ARN ribosomiques 5.8S, 18S et 25S, qui s'associe de manière co-transcriptionnelle à des protéines ribosomiques et à des facteurs d'assemblage. Le quatrième ARN ribosomique, l'ARNr 5S est transcrit séparément par l'ARN polymérase III, et s'associe avec les protéines ribosomiques Rpl5 et Rpl11 en dehors du ribosome. Ce sous-complexe, appelé particule 5S, est ensuite intégré au sein de la grande sous-unité. La particule 5S est également impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire. En effet, en cas de dé-régulation de la biogenèse du ribosome, la particule 5S s'accumule dans le nucléoplasme et interagit directement avec l'ubiquitine-ligase MDM2, provoquant la stabilisation du suppresseur de tumeur p53.

L'objectif principal de ma thèse est d'étudier le rôle des facteurs d'assemblage Rpf2 et Rrs1 dans la biogenèse du ribosome. Ces protéines assurent deux fonctions distinctes : elles sont requises pour l'association de la particule 5S avec la sous-unité pré-60S, et stimulent la transcription des ARNr par l'ARN polymérase I. Elles sont donc impliquées dans deux événements fondamentaux qui conditionnent les capacités de prolifération cellulaire.

La combinaison d'études structurales par cristallographie aux rayons X, et d'études d'interactions protéine-ARN *in vitro* et *in vivo*, m'ont permis de mieux appréhender le rôle du complexe Rpf2/Rrs1 dans l'intégration de la particule 5S et dans la maturation de la grande sous-unité. J'ai également étudié le rôle du complexe Rpf2/Rrs1 dans la régulation de la transcription des ARNr, en caractérisant ses interactions avec la polymérase I.

## ABSTRACT

Ribosome Biogenesis is a complex process that requires the production and the correct assembly of the 4 rRNA with more than 80 proteins. Ribosome biogenesis starts by the transcription of a pre-rRNA precursor in the nucleolus. Three of the four ribosomal RNAs —the 5.8S, 18S, and 25S rRNAs— are cotranscribed as a single 35S precursor by polymerase I. This precursor is cotranscriptionally modified, folded, cleaved, and assembled with both ribosomal proteins and non-ribosomal factors to generate the mature ribosomes. The fourth rRNA, the 5S rRNA, is transcribed by RNA polymerase III and is assembled into the 5S particle, containing ribosomal proteins Rpl5 and Rpl11, prior to its incorporation into preribosomes. In mammals, the 5S RNP is also a central regulator of the homeostasis of the tumor suppressor p53

The main objective of my thesis was to understand the precise roles of the two assembly factors Rpf2 and Rrs1 in ribosome biogenesis. These proteins have two distinctive functions : Rpf2 and Rrs1 are required for the 5S particle incorporation into the large subunit, and stimulate the rRNA transcription by polymerase I.

Using a combination of structural studies by X-Ray crystallography and biochemical approaches *in vitro* and *in vivo* methods to study proteins-RNA interactions, I was able to uncover the function of the Rpf2/Rrs1 dimer in the maturation of the large subunit through the recruitment of the 5S particle. I also studied the function of Rpf2 and Rrs1 in the rRNA transcription regulation, by characterizing physical connection with polymerase I subunits.