

Université de Montréal

**Étude des interactions fonctionnelles de la tétraboucle 900
de l'ARN ribosomique 16S dans le ribosome bactérien.**

par
François Bélanger

Département de Biochimie
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Ph. D.
en Biochimie

Avril 2005

© François Bélanger, 2005



W

4

U58

2005

V. 165



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**Étude des interactions fonctionnelles de la tétraboucle 900
de l'ARN ribosomique 16S dans le ribosome bactérien.**

présentée par :
François Bélanger

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Pascale Legault, président-rapporteur
Dr. Léa Brakier-Gingras, directeur de recherche
Dr. Pascal Chartrand, membre du jury
Dr. J. Stephen Lodmell, examinateur externe

Résumé

Le ribosome est une énorme particule ribonucléoprotéique responsable de la traduction des ARN messagers (ARNm) en protéines. Nous nous sommes intéressés à la tétraboucle 900, qui coiffe l'hélice 27 de l'ARN ribosomique (ARNr) 16S de la petite sous-unité ribosomique. Cette tétraboucle 900 est localisée près du centre de décodage, la région du ribosome impliquée dans la sélection des ARN de transfert aminoacylés (aa-ARNt). L'analyse de la structure cristallographique du ribosome a montré que la tétraboucle 900 interagit avec un récepteur, dans la région 768-769/809-811 à la base de l'hélice 24 de l'ARNr 16S. Elle est aussi impliquée dans un contact avec l'ARNr 23S de la grande sous-unité ribosomique, formant ainsi un des ponts reliant les sous-unités ribosomiques. Nous avons étudié le rôle de la tétraboucle 900 en utilisant une technique dite d'évolution instantanée, qui consiste à remplacer les quatre positions de la tétraboucle par une séquence aléatoire, de manière à créer une librairie de toutes les séquences possibles. Les mutants fonctionnels ont été sélectionnés *in vivo* en utilisant l'expression d'un gène rapporteur codant pour la chloramphénicol acétyltransférase (CAT), qui confère la résistance au chloramphénicol. Nous avons ainsi obtenu 15 mutants différents, altérés dans la tétraboucle 900. Par des études fonctionnelles, nous avons montré que les mutations de la tétraboucle 900 diminuent l'activité ribosomique, perturbant l'association entre les sous-unités ribosomiques et diminuant la fidélité de traduction. Par modélisation moléculaire, nous avons observé que les mutations de la tétraboucle 900 perturbent son interaction avec son récepteur.

Nous avons ensuite utilisé une approche de complémentation génétique pour étudier l'interaction entre la tétraboucle 900 et son récepteur dans l'hélice 24. Nous avons utilisé la mutation A900G, une mutation de la tétraboucle 900 qui inhibe fortement l'activité ribosomique. Par la méthode d'évolution instantanée, nous avons sélectionné des mutations secondaires dans l'hélice 24 qui compensent l'effet délétère de la mutation A900G. Deux

mutations différentes dans l'hélice 24 ont ainsi été isolées. Des études fonctionnelles ont montré que ces mutations secondaires corrigent les défauts d'association et de fidélité causés par la mutation A900G. Par modélisation moléculaire, nous avons montré que ces mutations dans l'hélice 24 permettent de restaurer l'interaction entre la tétraboucle 900 et son récepteur. Ces résultats démontrent directement l'importance fonctionnelle de l'interaction entre la tétraboucle 900 et son récepteur pour l'association entre les sous-unités et la fidélité de traduction.

Le ribosome alterne entre différentes conformations au cours de la traduction et il est possible que la tétraboucle 900 participe à d'autres interactions qui ne seraient pas observées dans la structure cristalline. Afin d'identifier de telles interactions, nous avons introduit des mutations aléatoires dans la séquence de l'ARNr 16S et nous avons sélectionné les mutations qui complémentent la mutation A900G de la tétraboucle 900. Nous avons ainsi identifié deux mutations complémentaires, localisées dans l'hélice 1 de l'ARNr 16S. Bien que l'hélice 1 soit proche de l'hélice 27 dans la structure cristalline, il est très peu probable qu'elle interagisse directement avec la tétraboucle 900, et la relation fonctionnelle entre ces deux régions est donc sûrement indirecte. L'hélice 1 et l'hélice 27 sont connectées par une structure complexe appelée le pseudonoeud central de l'ARNr 16S. Nous proposons que les mutations complémentaires dans l'hélice 1 augmentent la flexibilité de l'hélice 27 via une déstabilisation de ce pseudonoeud et facilitent ainsi l'interaction de la tétraboucle 900 mutante avec son récepteur. Ces études soulignent l'importance de la coopération entre les régions de l'ARNr pour le fonctionnement du ribosome. Notre approche expérimentale pourra être utilisée afin de caractériser les relations fonctionnelles entre les différentes régions de l'ARNr. Une compréhension approfondie du fonctionnement du ribosome pourra contribuer au développement de nouveaux antibiotiques ciblant le ribosome.

Mots-clés : Traduction, ribosome bactérien, ARN ribosomique, interactions tétraboucle/récepteur, fidélité de traduction, association des sous-unités ribosomiques.

Abstract

The ribosome is a large ribonucleoprotein that translates the information contained in the messenger RNAs (mRNA) into proteins. Our research focused on the 900 tetraloop, which caps helix 27 of the 16S ribosomal RNA (rRNA) of the small ribosomal subunit. This 900 tetraloop is located near the decoding centre, the region of the ribosome involved in the selection of aminoacyl transfer RNAs (tRNA). The crystal structure of the ribosome showed that the 900 tetraloop interacts with a receptor in the 768-770/809-811 region of helix 24 of 16S rRNA. It also contacts the 23S rRNA of the large subunit, forming one of the intersubunit bridges. We studied the 900 tetraloop, using a technique called instant evolution. The four positions of the 900 tetraloop were randomized, so as to generate a pool of all the possible sequences. Functional mutants were selected *in vivo*, using a chloramphenicol acetyltransferase (CAT) reporter gene that confers resistance to chloramphenicol. We obtained 15 different mutants, altered in the 900 tetraloop. Functional studies showed that mutations in the 900 tetraloop decrease ribosomal activity, impairing subunit association and decreasing translational accuracy. Computer modeling showed that mutations in the 900 tetraloop perturb its interaction with its receptor.

We then investigated the interaction between the 900 tetraloop and helix 24, using genetic complementation studies. We used mutation A900G in the 900 tetraloop, a mutation that severely perturbs the activity of the ribosome. With the instant evolution technique, we selected secondary mutations in helix 24 that corrected the defects caused by the A900G mutation. Two different mutations in helix 24 were isolated. Functional studies showed that these secondary mutations correct the subunit association and translational fidelity defects caused by mutation A900G. Computer modeling studies revealed that the mutations in helix 24 restore the interaction between the mutated 900 tetraloop and helix 24. These results directly demonstrate the importance of the interaction between the 900

tetra-loop and its receptor for subunit association and for the control of translational accuracy.

The ribosome alternates between different conformations during protein synthesis, and the 900 tetra-loop could be involved in other interactions not observed in the crystal structure. To identify such interactions, we introduced random mutations in the whole 16S rRNA and selected mutations that can complement mutation A900G. Two complementary mutations were identified in helix 1 of the 16S rRNA. Although helix 1 is near the 900 tetra-loop in the crystal structure of the ribosome, it is very unlikely that these two regions directly interact and the functional relationship between these two regions is most probably indirect. Helix 1 and helix 27 are connected by a complex structure called the central pseudoknot. We propose that the complementary mutations in helix 1 increase the flexibility of helix 27 *via* a destabilization of the central pseudoknot, thus facilitating the interaction between the mutant 900 tetra-loop and its receptor. These studies stress the importance of cooperativity between different rRNA regions for the function of the ribosome. Our experimental approach could be applied to various sites of rRNA, so as to understand the complex cross-talk between the different rRNA regions. A deeper understanding of the ribosome function will lead to the development of novel antibiotics targeting the ribosome.

Keywords : Translation, bacterial ribosome, ribosomal RNA, tetra-loop/receptor interactions, translational fidelity, subunit association.

Remerciements

Mes premiers remerciements vont au Dr Léa Brakier-Gingras, pour la formation exceptionnelle que j'ai reçue dans son laboratoire. Ce fut un privilège de travailler sous la supervision d'une personne qui allie si bien les qualités de scientifique et d'enseignante. J'ai appris énormément au cours de ces années et je termine mes études avec la confiance d'être bien préparé pour le futur.

Je veux aussi remercier tous les membres du laboratoire que j'ai eu la chance de connaître tout au long de mes études: Catherine Spickler, Catherine Payant, Pierre Melançon, Alexandre Montpetit, Francis Robert, Marie-Noëlle Brunelle, Dominic Dulude, Martin Baril et Sacha Sidani, avec une mention spéciale à Mélissa Léger et Karine Gendron que j'ai le plus côtoyées, pour le meilleur et pour le mieux. J'ajoute un merci supplémentaire à Mélissa pour sa participation à mon projet. Merci également aux stagiaires que j'ai eu le plaisir de superviser : Laurent Chatel-Chaix, Mélissa Léger, Laura Frascarelli et Gabriel Théberge-Julien.

Je tiens également à remercier le Dr Phil Cunningham pour sa collaboration et pour m'avoir permis de faire plusieurs séjours enrichissants dans son laboratoire à la Wayne State University, à Détroit. Un merci aussi à son équipe pour leur hospitalité, particulièrement à Ashesh et à Élita. Il me faut aussi remercier le Dr Sergey Steinberg et Matthieu Gagnon de notre département de Biochimie, qui ont également collaboré de façon importante à mon projet.

Finalement, ces années extraordinaires ne seraient rien sans la présence de parents extraordinaires. Je tiens à remercier mes parents, Gervais et Louissette, pour leur soutien constant depuis le début.

*À mes parents,
Gervais et Louise*

Table des matières

Liste des tableaux.....	xi
Liste des figures	xii
Liste des abréviations.....	xv
Chapitre I - Introduction	1
1.1. Le ribosome et ses constituants.....	4
1.1.1. Les ARN ribosomiques.....	6
1.1.1.1. La structure secondaire des ARN ribosomiques.....	7
1.1.1.2. La structure tertiaire des ARN ribosomiques.....	11
1.1.2. Les protéines ribosomiques.....	14
1.1.3. L'évolution du ribosome à partir d'un monde à ARN.....	16
1.2. La structure du ribosome bactérien à haute résolution	18
1.2.1. La microscopie cryo-électronique.....	18
1.2.2. La cristallographie aux rayons X du ribosome et de ses sous-unités.....	25
1.2.2.1. Les structures cristallographiques de la sous-unité 50S	26
1.2.2.2. Les structures cristallographiques de la sous-unité 30S	30
1.2.2.3. Les structures cristallographiques du ribosome bactérien 70S	38
1.3. Les motifs structuraux des ARN.....	44
1.3.1. Les motifs de structure secondaire des ARN.....	44
1.3.2. Les motifs d'interactions tertiaires.....	49
1.3.3. Les tétraboucles GNRA	54
1.4. Les étapes de la synthèse protéique	60
1.4.1. L'initiation de la synthèse protéique.....	60
1.4.1.1. Le rôle des facteurs d'initiation	61
1.4.1.2. La liaison de l'ARNm au ribosome et la sélection du site d'initiation.....	63
1.4.1.3. La formation des ponts entre les sous-unités ribosomiques.....	66
1.4.2. Le cycle d'élongation.....	68
1.4.2.1. La sélection des aa-ARNt	68

1.4.2.1.1. Les étapes de la sélection des aa-ARNt.....	70
1.4.2.1.2. Les bases structurales du contrôle de la fidélité de traduction.....	74
1.4.2.2. La catalyse du lien peptidique.....	83
1.4.2.3. La translocation.....	89
1.4.3. La terminaison de la traduction et le recyclage des sous-unités ribosomiques.....	95
1.5. L'hélice 27 de l'ARNr 16S.....	97
1.6. Description du projet de recherche.....	101
Chapitre II - Functional studies of the 900 tetraloop capping helix 27 of 16S ribosomal RNA.....	105
Chapitre III - Study of the functional interaction of the 900 tetraloop of 16S ribosomal RNA with helix 24 within the bacterial ribosome.....	137
Chapitre IV - A functional relationship between helix 1 and the 900 tetraloop of 16S ribosomal RNA within the bacterial ribosome.....	169
Chapitre V - Discussion.....	196
5.1. Justification de l'approche expérimentale.....	197
5.2. Une interaction fonctionnelle entre la tétraboucle 900 et l'hélice 24 de l'ARNr 16S.....	200
5.3. Une interaction fonctionnelle indirecte entre la tétraboucle 900 et l'hélice 1 de l'ARNr 16S.....	204
5.4. Perspectives à court terme.....	208
5.5. Perspectives à long terme.....	212
Bibliographie.....	215

Liste des tableaux

	page
Tableau 1-1 : Détails des ponts entre les sous-unités ribosomiques.....	42
Tableau 1-2 : Détails des interactions entre le ribosome et les ARNt.....	43
Tableau 2-1 : Nucleotide distribution in the 900 tetraloop in prokaryotes and eukaryotes.....	129
Tableau 2-2 : Sequence and GFP activities of functional mutants of the 900 tetraloop.....	130
Tableau 2-3 : Distribution of plasmid-encoded 16S rRNA in 30S subunits, 70S ribosomes and polysomes.....	131
Tableau 2-4 : Effect of 900 tetraloop mutations on translational fidelity.....	132
Tableau 3-1 : Distribution of plasmid-encoded 16S rRNA in 30S subunits, 70S ribosomes and polysomes.....	162
Tableau 3-2 : Effect of mutations in the 900 tetraloop and in helix 24 on subunit association.....	163
Tableau 3-3 : Effect of mutations in the 900 tetraloop and in helix 24 on translational fidelity.....	164
Tableau 4-1 : Effect of mutations in helix 1 of 16S rRNA on ribosome activity in the presence and absence of the A900G mutation.....	191

Liste des figures

	page
Figure 1-1 : Structure à faible résolution du ribosome.....	5
Figure 1-2 : Modèles de structures secondaires des ARNr d' <i>Eschérichia coli</i> , déterminés par analyse phylogénétique.....	9
Figure 1-3 : Modèles de structures secondaires d'ARNr eucaryotes et mitochondriaux, déterminés par analyse phylogénétique.....	10
Figure 1-4 : Exemples de modèles de la structure tertiaire de l'ARNr 16S de la sous-unité 30S.....	13
Figure 1-5 : Carte d'assemblage de la sous-unité 30S, montrant l'ordre de liaison des protéines ribosomiques à l'ARNr 16S.....	15
Figure 1-6 : Étude du ribosome par microscopie cryo-électronique.....	20
Figure 1-7 : Ponts entre les sous-unités ribosomiques, visualisés par cryo-EM.....	23
Figure 1-8 : Structure de la sous-unité 50S déterminée par cristallographie aux rayons X.....	27
Figure 1-9 : Exemples de structures de protéines ribosomiques de la sous-unité 50S d' <i>Haloarcula marismortui</i>	29
Figure 1-10 : Localisation des domaines de l'ARNr 23S et de l'ARNr 5S dans la sous-unité 50S.....	31
Figure 1-11 : Structure de la sous-unité 30S de <i>Thermus thermophilus</i> déterminée par cristallographie aux rayons X.....	33
Figure 1-12 : Localisation des domaines de l'ARNr 16S dans la sous-unité 30S de <i>Thermus thermophilus</i>	34
Figure 1-13 : Structure du ribosome 70S de <i>Thermus thermophilus</i> déterminée par cristallographie aux rayons X.....	39

Figure 1-14 :	Ponts entre les sous-unités observés dans la structure cristallographique du ribosome 70S de <i>Thermus thermophilus</i> ...	41
Figure 1-15 :	Exemples de boucles coiffantes.....	46
Figure 1-16 :	Exemples de motifs de structure secondaire des ARN.....	48
Figure 1-17 :	Motif d'interaction A-mineur.....	51
Figure 1-18 :	Différents types d'empilement entre des hélices d'ARN.....	53
Figure 1-19 :	Interactions entre les tétraboucles GNRA et leurs récepteurs.....	57
Figure 1-20 :	Positionnement de l'ARN messager au niveau du cou de la sous-unité 30S, tel qu'observé dans la structure cristallographique du ribosome 70S.....	64
Figure 1-21 :	Conservation des ponts entre les sous-unités.....	69
Figure 1-22 :	Étapes de la sélection des aa-ARNt.....	72
Figure 1-23 :	Changement conformationnel du centre de décodage induit par un ARNt correct ou par la paromomycine.....	76
Figure 1-24 :	Détails des interactions entre le ribosome et les paires de bases du duplex codon-anticodon.....	77
Figure 1-25 :	Changement de conformation de la sous-unité 30S lors de la sélection des aa-ARNt.....	79
Figure 1-26 :	Changement conformationnel de l'aa-ARNt lors de la sélection initiale.....	82
Figure 1-27 :	Détails du centre peptidyltransférase de la sous-unité 50S de <i>Haloarcula marismortui</i>	85
Figure 1-28 :	Détails du centre peptidyltransférase dans la structure cristallographique de la sous-unité 50S de <i>Deinococcus radiodurans</i>	87
Figure 1-29 :	Modèle des états hybrides lors de la translocation.....	91
Figure 1-30 :	Réarrangement de l'hélice 27 de l'ARNr 16S proposé par Lodmell et Dahlberg.....	98

Figure 2-1 :	Location of the 900 tetraloop.....	133
Figure 2-2 :	Details of the 900 tetraloop structure and its interactions with its receptor and with position A1513, as seen in the crystal structure of the 30S subunit.....	134
Figure 2-3 :	Modeled structures of the 900 tetraloop with mutations at position C899 and A900.....	135
Figure 2-4 :	Modeled structures of the 900 tetraloop with double mutations of the G898-A901 base pair.....	136
Figure 3-1 :	Interaction between helix 24 and the 900 tetraloop of <i>E. coli</i> 16S rRNA.....	165
Figure 3-2 :	Second-site mutations in helix 24 that compensate for the A900G mutation and activities of the mutated ribosomes.....	167
Figure 3-3 :	Computer modeling of the 900 tetraloop/receptor mutations.....	168
Figure 4-1 :	Central portion of the secondary structure of <i>E. coli</i> 16S rRNA.	192
Figure 4-2 :	Effect of mutations in helix 1 and in the 900 tetraloop on subunit association.....	193
Figure 4-3 :	Effect of mutations in helix 1 and in the 900 tetraloop on translational fidelity.....	194
Figure 4-4 :	Structure of helix 27 and neighboring regions in the crystal structure of the <i>T. thermophilus</i> 30S subunit.....	195
Figure 5-1 :	Structure des bases triples du pseudonoeud central impliquant les nucléotides U12 et U13 de l'hélice 1 de l'ARNr 16S.....	206

Liste des abréviations

A	Adénine
aa-ARNt	ARN de transfert aminoacylé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
C	Cytidine
CAT	Chloramphénicol acétyltransférase
CMCT	1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoéthyl) carbodiimide métho- <i>p</i> -toluènesulfonate
CPT	Centre peptidyltransférase
Cryo-EM	Microscopie cryo-électronique
DB	<i>Downstream box</i>
DMS	Diméthylsulfate
EDTA	Acide éthylènediamine tétra-acétique

EF-G	Facteur d'élongation G
EF-Tu	Facteur d'élongation Tu
fMet-ARNt ^{fMet}	ARN de transfert initiateur chargé de méthionine formylée
FRET	Transfert d'énergie de fluorescence par résonance (<i>fluorescence resonance energy transfer</i>)
G	Guanine
GAC	Centre associé à la GTPase (<i>GTPase associated center</i>)
GDP	Guanosine diphosphate
GFP	Protéine fluorescente verte (<i>green fluorescent protein</i>)
GTP	Guanosine triphosphate
IF	Facteur d'initiation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
IRES	Site d'initiation interne de la traduction (<i>internal ribosome entry site</i>)
kDa	Kilodalton
kéthoxal	β -éthoxy- α -cétobutyraldéhyde
kJ	Kilojoule
MDa	Mégadalton
pept-ARNt	ARN de transfert peptidyle

Pi	Phosphate inorganique
ppGpp	guanosine-5'-diphosphate-3'-diphosphate
<i>Ram</i>	<i>Ribosomal ambiguity</i>
RF	Facteur de terminaison (<i>release factor</i>)
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RRF	Facteur de recyclage des ribosomes (<i>ribosome recycling factor</i>)
S	Svedberg
smFRET	Transfert d'énergie de fluorescence par résonance sur des molécules individuelles (<i>single-molecule fluorescence resonance energy transfer</i>)
U	Uracile

Chapitre I

Introduction

Les ribosomes sont les organites cellulaires responsables de la synthèse protéique chez tous les êtres vivants. Ils ont d'abord été identifiés comme des granules présents en grand nombre dans le cytoplasme, libres ou associés aux membranes. Ils furent nommés ribosomes à cause de leur forte concentration en acide ribonucléique (ARN). Peu après, il fut démontré que les ribosomes décodent l'information contenue dans les ARN messagers (ARNm) pour synthétiser les protéines dont la cellule a besoin. La synthèse protéique est aussi appelée traduction et c'est le rôle des ribosomes de traduire l'information contenue dans la séquence des ARNm pour produire le polypeptide correspondant. Le langage des acides nucléiques est formé d'un alphabet de quatre nucléotides différents, tandis qu'il existe 21 acides aminés pouvant être utilisés lors de la synthèse protéique. Chaque acide aminé est codé par un triplet de bases appelé codon. Puisqu'il y a 64 possibilités de triplets, différents codons peuvent coder pour un même acide aminé, en plus de trois codons de terminaison (UAA, UAG et UGA) qui signalent la fin de la traduction. Les ribosomes procèdent à la synthèse protéique en se déplaçant le long de l'ARNm et en traduisant successivement les codons rencontrés. Les ARN de transfert (ARNt) font le lien entre le langage des acides nucléiques et le langage des acides aminés lors de la traduction. Chaque ARNt possède une boucle contenant un triplet complémentaire de l'un des codons du code génétique : c'est l'anticodon. Lors de la traduction, les ARNt alternent entre trois formes : l'ARNt aminoacylé (aa-ARNt) qui est chargé d'un acide aminé, l'ARNt peptidyle (pept-ARNt) qui porte la chaîne polypeptidique en croissance, et l'ARNt désacylé qui est un ARNt ayant achevé sa mission. Le ribosome comporte trois sites de liaison des ARNt, un pour chacune des trois formes d'ARNt : un site A (pour aminoacylé), un site P (pour peptidyle) et un site E (pour *exit*). Lorsque l'aa-ARNt correspondant au codon au site A a été sélectionné et accepté, le ribosome catalyse la réaction de transpeptidation, qui consiste à transférer la chaîne polypeptidique en croissance portée par le pept-ARNt au site P sur l'acide aminé de l'aa-ARNt au site A. Vient ensuite l'étape de translocation où l'ARNt nouvellement désacylé est déplacé du site P vers le site E, alors que le nouveau pept-ARNt est déplacé du site A vers le site P. Ce déplacement des ARNt entraîne aussi l'ARNm, ce

qui amène le codon suivant au site A. Le cycle peut alors recommencer, jusqu'à ce que le ribosome rencontre un des trois codons de terminaison qui signalent la fin de la traduction.

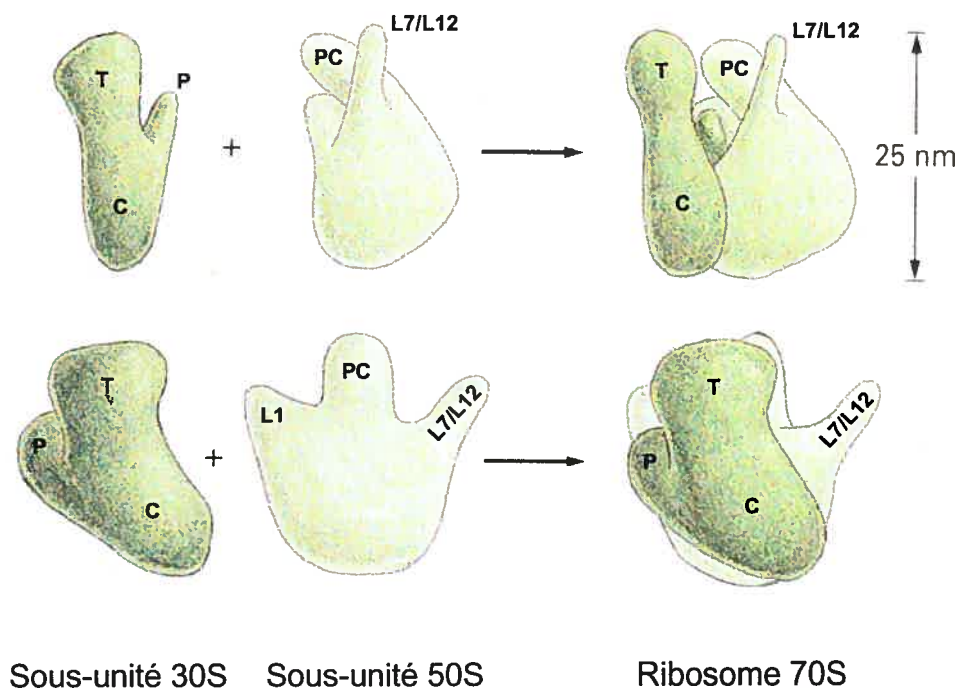
Les grandes lignes de la synthèse protéique décrites ci-dessus sont connues depuis longtemps, mais il reste encore beaucoup à découvrir sur le fonctionnement du ribosome. Depuis de nombreuses décennies, l'étude du ribosome a été menée sur deux fronts : les études fonctionnelles et les études structurales. Pendant longtemps, de nombreux chercheurs se sont efforcés de caractériser les étapes de la synthèse protéique, alors que d'autres ont travaillé à élucider la structure du ribosome et de ses constituants. Ces deux volets se rejoignent maintenant, principalement grâce aux récents progrès dans les techniques de microscopie électronique et de cristallographie aux rayons X. Il devient maintenant possible d'expliquer les données fonctionnelles en relation avec les données structurales, tandis que les structures à haute résolution du ribosome nous donnent de nouvelles indications sur le fonctionnement du ribosome. L'introduction de cette thèse présente l'état actuel des connaissances sur le ribosome. Il sera surtout question du ribosome bactérien, puisque celui-ci est le mieux caractérisé, mais le ribosome est très conservé et les données obtenues avec le ribosome bactérien peuvent souvent être extrapolées au ribosome eucaryote. Le travail présenté dans cette thèse porte sur le rôle de la tétraboucle 900, une structure importante de l'ARNr, et l'emphase sera mise sur les aspects structuraux de la synthèse protéique. Les premières sections présentent une description générale du ribosome et de ses constituants. Les sections suivantes présentent les détails des structures à haute résolution du ribosome qui ont été obtenues récemment. Les dernières sections décrivent les étapes de la synthèse protéique, en expliquant les études fonctionnelles et structurales qui ont permis de mieux comprendre chacune de ces étapes.

1.1. Le ribosome et ses constituants

Le ribosome bactérien est un gigantesque complexe macromoléculaire d'environ 2,5 MDa. Il est formé de deux sous-unités différentes : une petite sous-unité, qui a une constante de sédimentation de 30S, et une grande sous-unité, qui a une constante de sédimentation de 50S. Les deux sous-unités s'associent pour former le ribosome, qui a une constante de sédimentation de 70S. Chacune des sous-unités est formée par l'assemblage d'ARN ribosomiques (ARNr) et de protéines, où l'ARNr compte pour les deux-tiers de la masse. La sous-unité 30S comprend un ARNr 16S et 21 protéines différentes (nommées S1 à S21), alors que la sous-unité 50S comprend deux ARNr, 23S et 5S, et une trentaine de protéines différentes (nommées L1 à L34). La microscopie électronique, qui a mené à la découverte du ribosome, a aussi permis de déterminer sa structure à faible résolution. À partir de photographies du ribosome vu sous divers angles, il a été possible d'en déterminer une structure en trois dimensions. Ces premières études structurales du ribosome ont permis d'obtenir des images à une résolution d'environ 100 Å, la taille du ribosome étant approximativement 250 Å (25 nm). Ces images révélèrent que le ribosome est une particule asymétrique, formée de deux sous-unités, chacune ayant des caractéristiques morphologiques particulières (Figure 1-1). La petite sous-unité est formée d'un corps, surmonté d'une tête, avec une plate-forme qui prolonge le haut du corps. La grande sous-unité a la forme d'un fauteuil, avec une protubérance centrale flanquée de deux saillies, appelées tige L1 et tige L7/L12 d'après les protéines ribosomiques qu'elles contiennent.

Avant les années 80, les propriétés catalytiques des ARN n'étaient pas connues et il était présumé que les ARNr forment la charpente sur laquelle viennent se placer les protéines ribosomiques. Ces dernières étaient alors considérées comme les éléments actifs du ribosome. Cependant tous les efforts pour isoler des protéines ribosomiques capables de catalyser la réaction de transpeptidation furent vains. Quand des ARN catalytiques comme l'intron autocatalytique de groupe I de *Tetrahymena* et la RNase P furent

Figure 1-1 : Structure à faible résolution du ribosome bactérien (adapté de Lake, 1985). Les principales caractéristiques structurales de la sous-unité 30S sont la tête (T), le corps (C) et la plate-forme (P). Dans la sous-unité 50S, on distingue une protubérance centrale (PC) flanquée de deux saillies, appelées tige L1 et tige L7/L12.



découverts (Kruger et al., 1982; Guerrier-Takada et al., 1983), il fut proposé que les fonctions du ribosome sont assurées par les ARNr plutôt que par les protéines (Noller, 1991a). Les faits en faveur de cette hypothèse s'accumulèrent rapidement. Des sous-unités 50S dont presque toutes les protéines ont été enlevées conservent la capacité de catalyser la réaction de transpeptidation (Noller et al., 1992). Les antibiotiques qui inhibent le ribosome agissent presque tous en se liant aux ARNr (Cundliffe, 1990) et de nombreuses expériences de mutagenèse démontrent l'importance des ARNr pour le fonctionnement du ribosome (revues par Triman et al., 1998; Brakier-Gingras et al., 2003). Finalement, les récentes études cristallographiques ont montré que le centre actif du ribosome est formé principalement d'ARN (voir section 1.2.2.) Le rôle des protéines ribosomiques serait principalement de stabiliser la structure des ARNr et de moduler leurs changements de conformations, bien que certaines protéines puissent participer directement à certains aspects de la synthèse protéique. Les sections suivantes traitent des ARNr et des protéines ribosomiques, en présentant leurs propriétés générales et leurs rôles, ainsi que les méthodes qui furent utilisées pour les étudier avant l'avènement des structures à haute résolution.

1.1.1. Les ARN ribosomiques

Le ribosome bactérien contient trois molécules différentes d'ARN. La sous-unité 30S d'*Escherichia coli* contient un ARNr 16S de 1542 nucléotides, tandis que la sous-unité 50S contient un ARNr 23S de 2904 nucléotides et un ARNr 5S de 120 nucléotides. Les ARNr contiennent plusieurs bases modifiées de façon post-transcriptionnelle (Rozenki et al., 1999; Ofengand, 2002). L'ARNr 16S en contient une dizaine et l'ARNr 23S plus d'une vingtaine, mais l'ARNr 5S n'en a aucune. Le rôle de ces modifications n'est pas clair, mais il est proposé qu'elles stabilisent des conformations particulières de l'ARNr. Des portions complémentaires dans la séquence des ARNr s'apparient pour former des hélices. C'est ce que l'on appelle la structure secondaire des ARNr. Divers éléments de la structure

secondaire interagissent entre eux pour former la structure tertiaire. La structure tertiaire des ARNr est stabilisée par leurs interactions avec les protéines ribosomiques, c'est la structure quaternaire.

1.1.1.1. La structure secondaire des ARN ribosomiques

La structure secondaire des ARNr fut relativement facile à déduire à partir de leurs séquences. Les différents organismes ont des séquences d'ARNr parfois très différentes, mais il fut suggéré que les structures secondaires soient semblables. Les modèles de structures secondaires ont été construits en étudiant la co-variation des bases, avec l'hypothèse que les variations maintiennent la complémentarité Watson-Crick des brins appariés (revue par Gutell et al., 2002). Deux brins appariés doivent évoluer de façon à conserver leur complémentarité. Les premiers modèles de structures secondaires des ARNr ont été raffinés à mesure que le nombre de séquences connues augmentait et à mesure que se perfectionnaient les méthodes d'analyses et les algorithmes de prédiction. Les modèles actuels incluent en outre certaines paires de bases non Watson-Crick, notamment des paires U•U qui co-varient avec des paires C•C ou G•G, et des paires A•A qui co-varient avec des paires G•G (Camione et al., 2002; Leontis et al., 2002). Quelques interactions tertiaires ont aussi été prédites par l'analyse phylogénétique, comme des triplets de bases et des pseudonoeuds, où une boucle coiffant une hélice s'apparie avec une région complémentaire distante dans la structure secondaire. Les modèles de structures secondaires ont été confirmés et perfectionnés par diverses expériences permettant de sonder la structure des ARN, comme des expériences d'attaques avec des agents chimiques ou enzymatiques (Noller & Woese, 1981; Ehresmann et al., 1987). En effet, des agents comme le kéthoxal, le diméthylsulfate (DMS) ou le 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoéthyl) carbodiimide métho-*p*-toluènesulfonate (CMCT) réagissent spécifiquement avec certains groupes fonctionnels des bases des acides nucléiques. Quand ces groupements sont impliqués dans des appariements

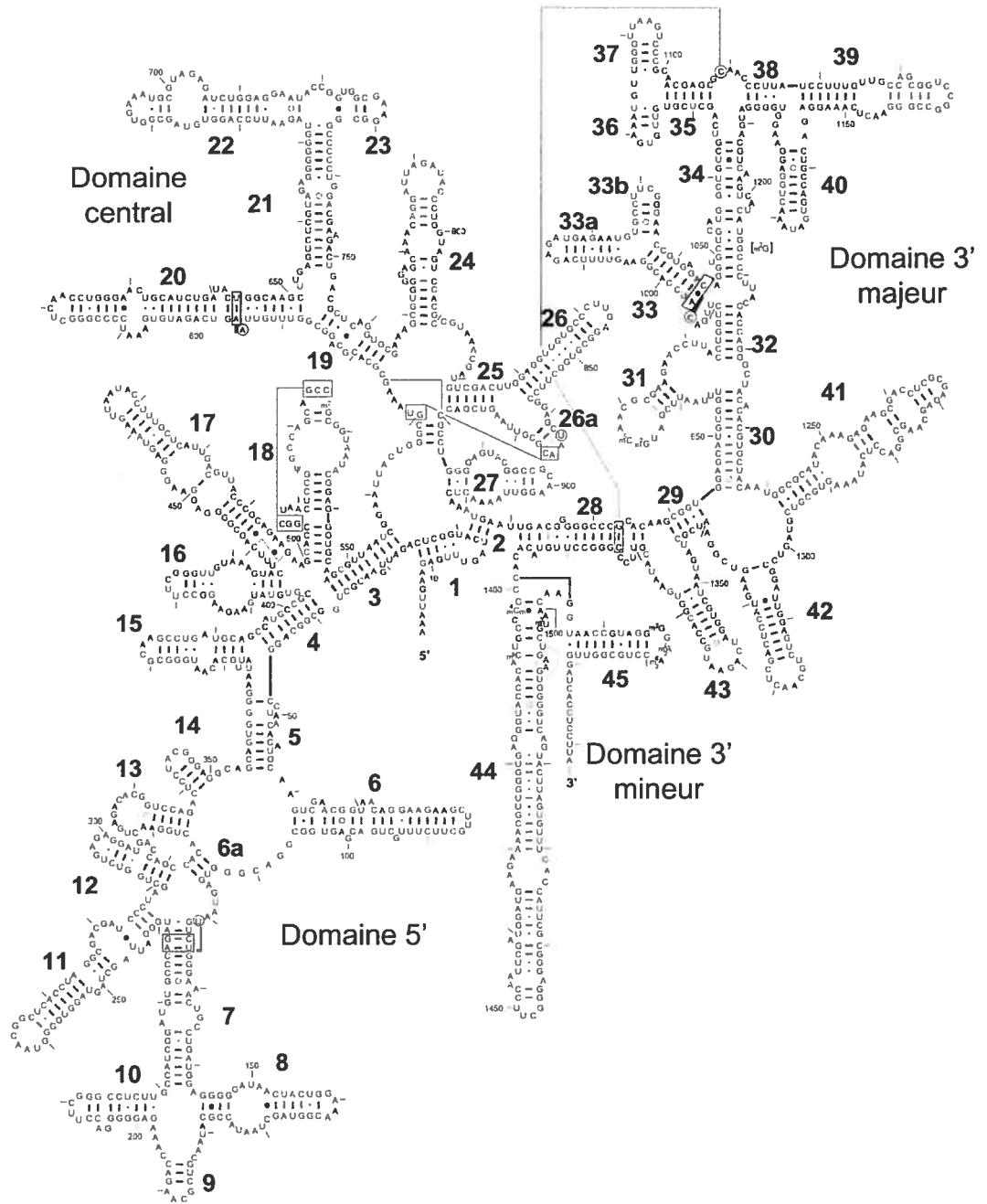
Watson-Crick, ils ne sont pas attaqués par ces agents chimiques. Les nucléotides modifiés par ces réactifs peuvent être identifiés par extension d'une amorce liée à l'ARNr, car l'élongation de l'amorce est inhibée au niveau des bases modifiées. Certaines enzymes qui clivent spécifiquement l'ARNr double brin (RNase V1) ou simple brin (RNase T1) ont aussi été utilisées pour déterminer quelles régions des ARNr sont appariées. La position des sites de clivage est également détectée par extension d'amorce. La mutagenèse dirigée a aussi été largement utilisée pour mettre à l'épreuve ces modèles de structures secondaires (revue par Triman, 1995).

La Figure 1-2A présente la structure secondaire de l'ARNr 16S. Cet ARN se replie en 45 hélices, connectées par des boucles. Ces boucles ne sont pas nécessairement des régions non appariées, mais sont souvent des hélices irrégulières formées par des appariements non Watson-Crick qui ne peuvent pas être prédits par les analyses phylogénétiques. L'ARNr 16S se divise en trois domaines : le domaine 5', le domaine central et le domaine 3'. Le domaine 3' peut également être sub-divisé en domaines 3' majeur et mineur. La structure secondaire de l'ARNr 23S est présentée à la Figure 1-2B. Cet ARN contient six domaines, numérotés I à VI, connectés par une boucle centrale. Le petit ARNr 5S, présenté à la Figure 1-2C, est formé de cinq hélices. La taille des ARNr varie d'un organisme à l'autre (Mears et al., 2002). Les ARNr eucaryotes sont sensiblement plus gros que les ARNr procaryotes. La Figure 1-3A présente comme exemple la structure secondaire de l'ARNr 18S d'*Homo sapiens*, qui correspond à l'ARNr 16S bactérien. À l'autre extrême, les ARN des ribosomes mitochondriaux sont beaucoup plus petits. La Figure 1-3B présente la structure secondaire de l'ARNr 12S mitochondrial de *Caenorhabditis elegans*, qui correspond également à l'ARNr 16S bactérien. En contrepartie, les ribosomes mitochondriaux contiennent plus de protéines que les ribosomes cytoplasmiques et il est suggéré que ces protéines additionnelles remplacent la fonction des portions manquantes des ARNr mitochondriaux (Pietromonaco et al., 1991; O'Brien, 2002).

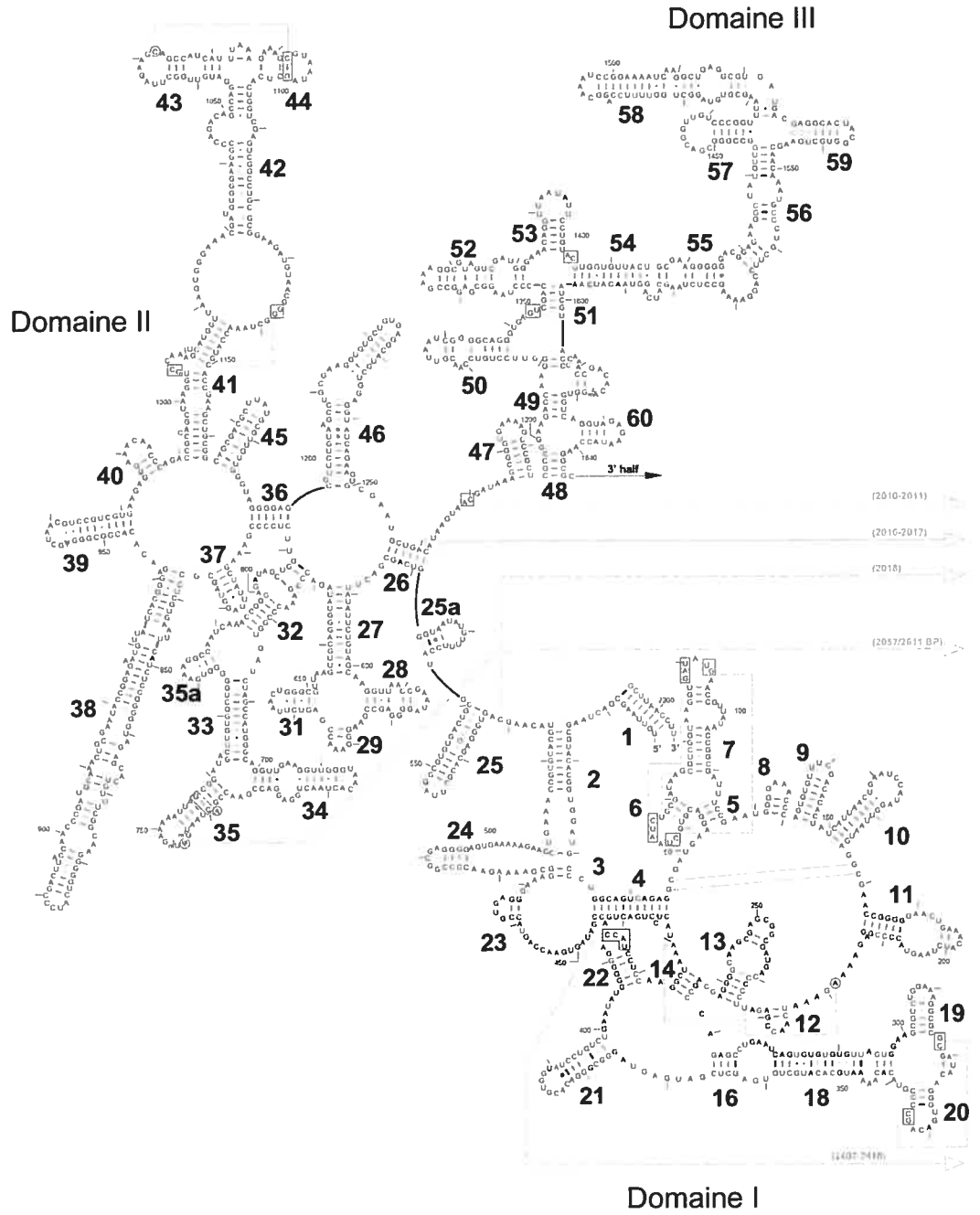
Figure 1-2 : Modèles de structures secondaires des ARNr d'*Escherichia coli*, déterminés par analyse phylogénétique (<http://www.rna.icmb.utexas.edu>). Les hélices sont numérotées consécutivement, à partir de l'extrémité 5' (Brimacombe, 1991).

- A. Structure secondaire de l'ARNr 16S. Le domaine 5', le domaine central et les domaines 3' majeur et 3' mineur sont indiqués. Les interactions tertiaires prédites par analyse phylogénétique sont aussi indiquées par des lignes fines.
- B. Structure secondaire de l'ARNr 23S. Les six domaines, numérotés I à VI sont indiqués. Les interactions tertiaires prédites par analyse phylogénétique sont aussi indiquées par des lignes fines.
- C. Structure secondaire de l'ARNr 5S. Les cinq boucles sont désignées A à E.

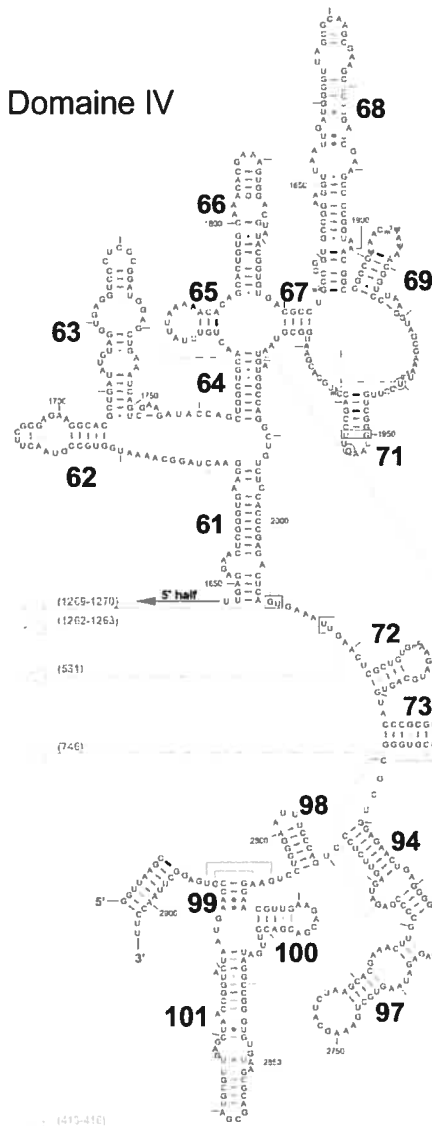
A



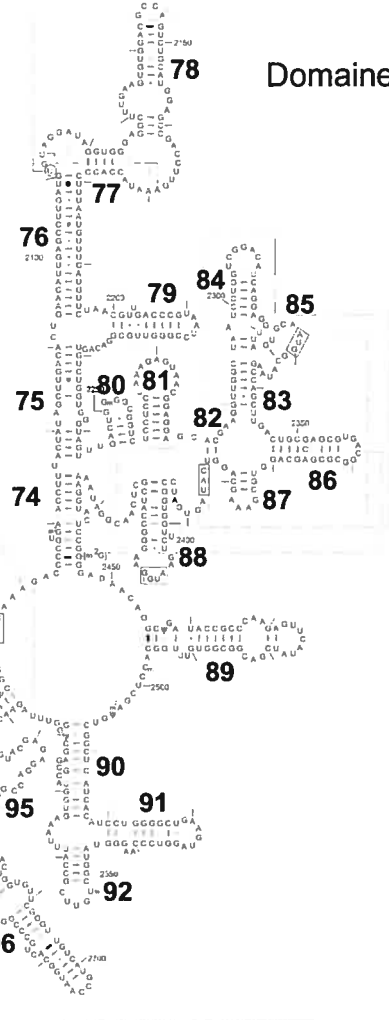
B



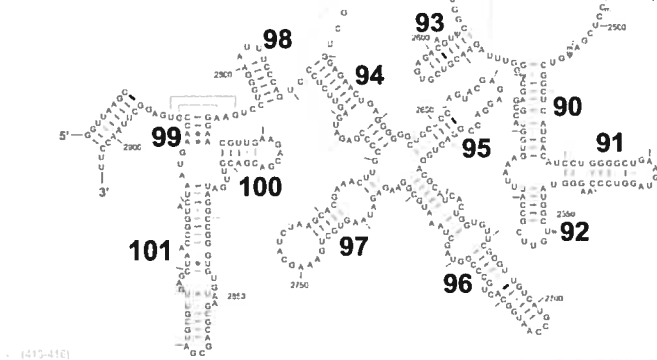
Domaine IV



Domaine V



Domaine VI



C

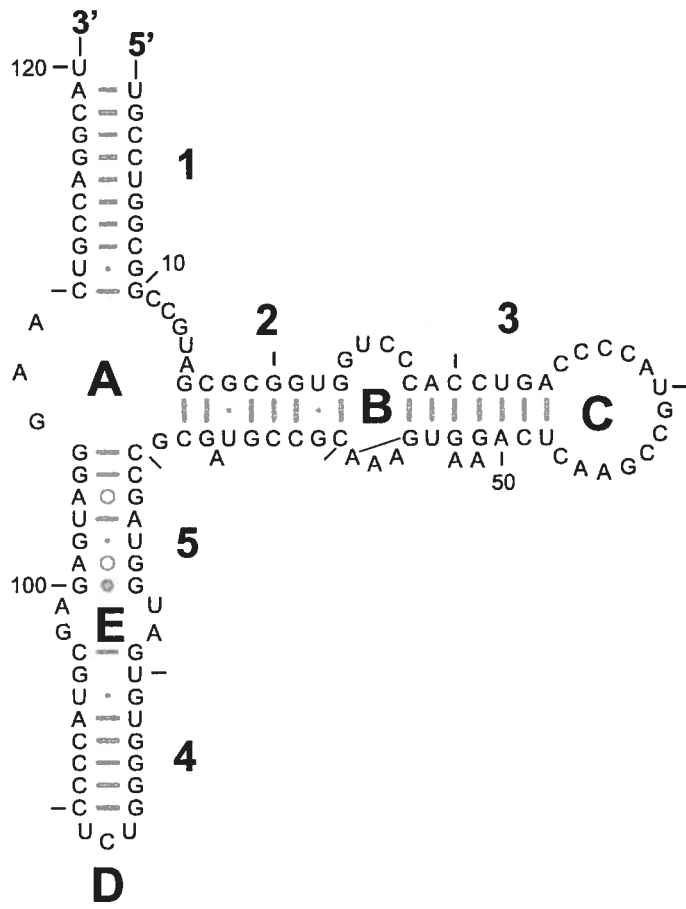
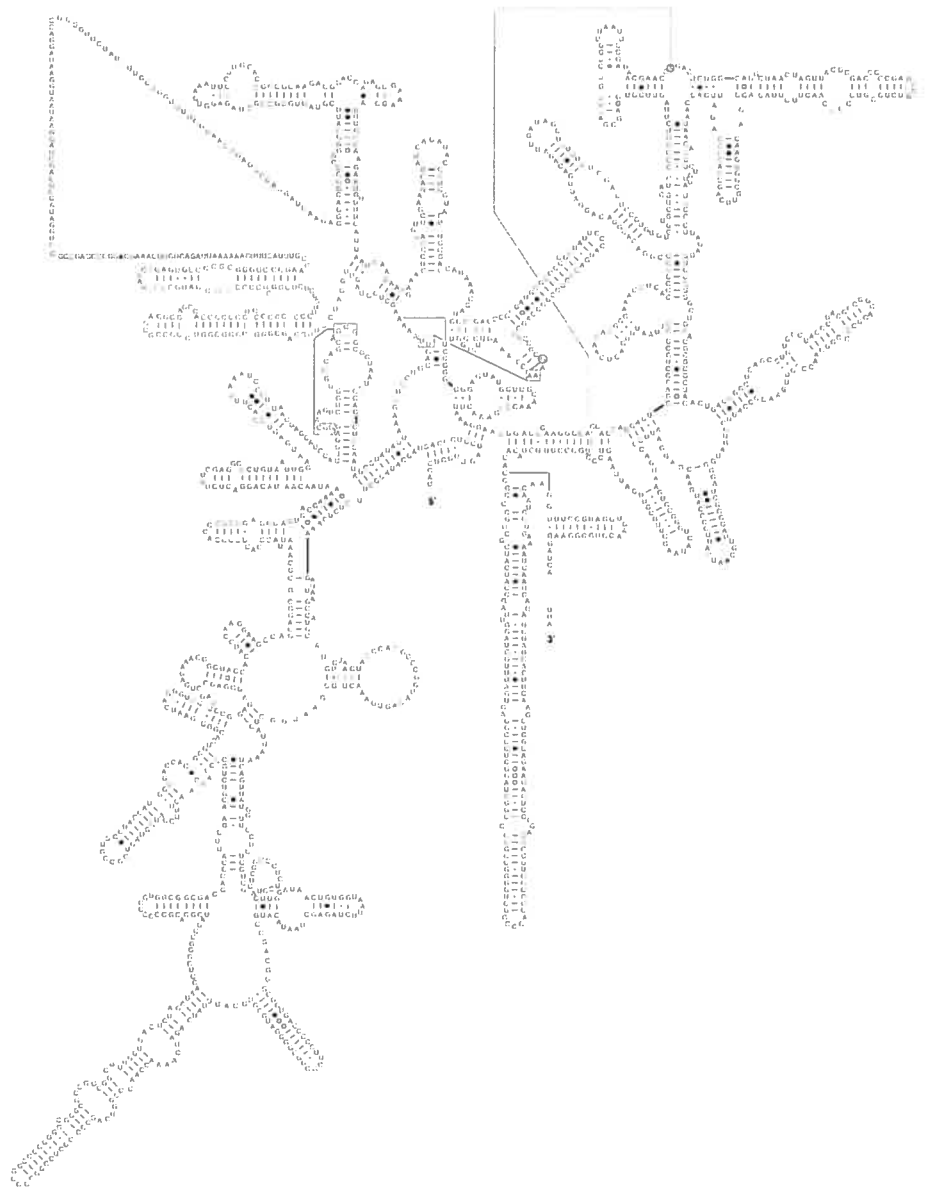


Figure 1-3 : Modèles de structures secondaires d'ARNr eucaryotes et mitochondriaux, déterminés par analyse phylogénétique (<http://www.rna.icmb.utexas.edu>). Les interactions tertiaires prédites par analyse phylogénétique sont indiquées par des lignes fines.

A. Structure secondaire de l'ARNr 18S d'*Homo sapiens*.

B. Structure secondaire de l'ARNr 12S mitochondrial de *Caenorhabditis elegans*.

A



1.1.1.2. La structure tertiaire des ARN ribosomiques

La microscopie électronique avait révélé la forme générale du ribosome, mais il fallait aussi savoir comment les ARNr se replient dans cet espace. Avant que la structure du ribosome ne soit déterminée à haute résolution, la cristallographie aux rayons X et la résonance magnétique nucléaire (RMN) avaient été utilisées pour déterminer la structure des petites portions isolées des ARNr comme des fragments de l'ARNr 5S (White et al., 1992; Wimberly et al., 1993; Correll et al., 1997), la tige-boucle sarcine-ricine de l'ARNr 23S (Szewczak et al., 1993; Szewczak & Moore, 1995; Correll et al., 1998) et le centre de décodage de l'hélice 44 de l'ARNr 16S (Fourmy et al., 1996; 1998). Cependant, notre connaissance de la structure tridimensionnelle des ARNr était alors principalement basée sur des expériences de pontages et d'attaques par des agents chimiques. Les expériences de pontages ont été très utiles pour déterminer des relations de voisinage entre des nucléotides qui sont distants dans la structure secondaire, mais proches dans la structure tertiaire. Un grand nombre de méthodes de pontages aléatoires ou dirigés ont été développées. Les pontages aléatoires étaient obtenus par irradiation des ribosomes aux rayons UV, ou avec divers agents pontants bifonctionnels, tel le *bis*-(2-chloroéthyl)-méthylamine, communément appelé moutarde à l'azote (Brimacombe et al., 1990; Mitchell et al., 1992). L'identification des sites de pontages s'effectuait soit par extension d'amorce, soit par l'analyse de patron de digestions dirigées à la RNase H. Plusieurs méthodes ingénieuses ont aussi été mises au point pour obtenir des pontages dirigés, afin de sonder le voisinage de régions spécifiques. Le principe consistait à introduire un agent réactif, généralement photoactivable, à une position donnée dans un ARNr. L'agent réactif était souvent une base modifiée, comme la 4-thiouridine ou la 6-thioguanosine (Dontsova et al., 1992; Rinke-Appel et al., 1993; Juzumiene et al., 1995; Sergiev et al., 1997; Nanda & Wollenzien, 2004). En outre, un groupement réactif photoactivable comme le bromure de *p*-azidophénacyle pouvait être attaché à une base modifiée (Montpetit et al., 1998;

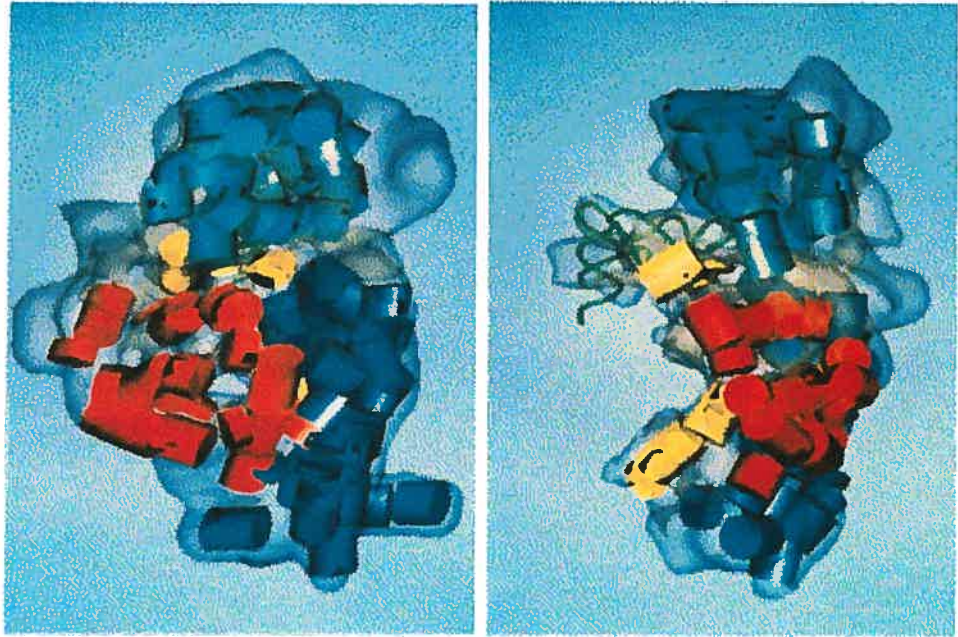
Bukhtiyarov et al., 1999; Osswald & Brimacombe, 1999). Des expériences ont également été menées avec des agents qui produisent des radicaux libres lorsqu'ils sont activés. Les radicaux libres sont très réactifs et clivent les riboses de l'ARN dans leur environnement immédiat. Les plus utilisés de ces agents sont le Fe(II)-EDTA et le Cu(II)-iodoacétamido-1,10-orthophénantroline (revues par Noller et al., 2000; Bowen et al., 2001; Muth & Hill, 2001). Ces agents peuvent être utilisés soit sous forme libre, soit liés à une base modifiée, ou attachés à l'extrémité 5' d'un oligonucléotide s'hybridant à une section non appariée d'un ARNr. Tous les résultats de pontages et d'attaques chimiques ont permis de définir un grand nombre de contraintes structurales régissant le repliement tertiaire des ARNr, et aussi leurs interactions avec les protéines ribosomiques, les ARN de transfert et les divers facteurs protéiques participant à la traduction. Ces informations ont été utilisées pour construire des modèles du repliement des ARNr. La Figure 1-4A présente un exemple de modèle élaboré par le groupe de Brimacombe, principalement à partir des données de pontages (Mueller & Brimacombe, 1997), tandis que la Figure 1-4B présente un exemple de modèle construit par le groupe de Noller, principalement à partir des données d'attaques chimiques combinées aux données de positionnement des protéines ribosomiques (voir section suivante) (Noller, 1999). La publication des structures cristallographiques du ribosome a permis d'évaluer la fiabilité de ces modèles (Sergiev et al., 2001). La fiabilité des données utilisées pour construire ces modèles est parfois inégale. Assez paradoxalement, les méthodes plus anciennes ont fourni des résultats plus exacts que les méthodes plus modernes et plus sophistiquées. Il faut toutefois être conscients que les différences entre les modèles théoriques et les structures cristallographiques peuvent être dues en partie à la flexibilité conformationnelle du ribosome (Gabashvili et al., 2003).

Figure 1-4 : Exemples de modèles de la structure tertiaire de l'ARNr 16S de la sous-unité 30S.

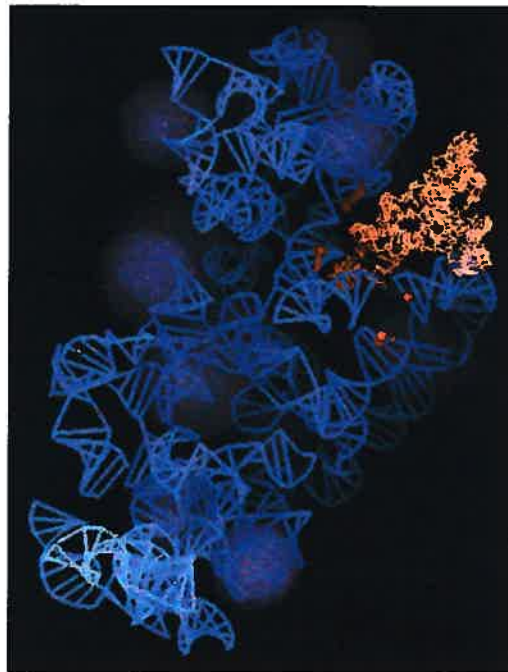
A. Modèle du groupe de Brimacombe, élaboré à partir des données de pontages (adapté de Mueller & Brimacombe, 1997). L'ARNr 16S est modélisé à l'intérieur d'une structure de la sous-unité 30S à une résolution de 20 Å, obtenue par microscopie cryo-électronique. Les hélices de l'ARNr 16S sont représentées par des cylindres bleus foncés pour le domaine 5', rouges pour le domaine central, bleus pâles pour le domaine 3' majeur et jaunes pour le domaine 3' mineur. La sous-unité est présentée vue du côté du solvant (à gauche) et vue du côté de la plate-forme (à droite). Un ARNt positionné au site P est représenté par un ruban vert.

B. Modèle du groupe de Noller, élaboré à partir des données de protection des protéines ribosomiques et des ARNt, et des données de positionnement des protéines ribosomiques (adapté de Noller, 1999). L'ARNr 16S est représenté en bleu et les protéines ribosomiques sont représentées par des sphères de couleur magenta. Les positions de l'ARNr 16S protégées par l'ARNt au site P sont représentées par des boules rouges. L'ARNt au site P est coloré en rose.

A



B



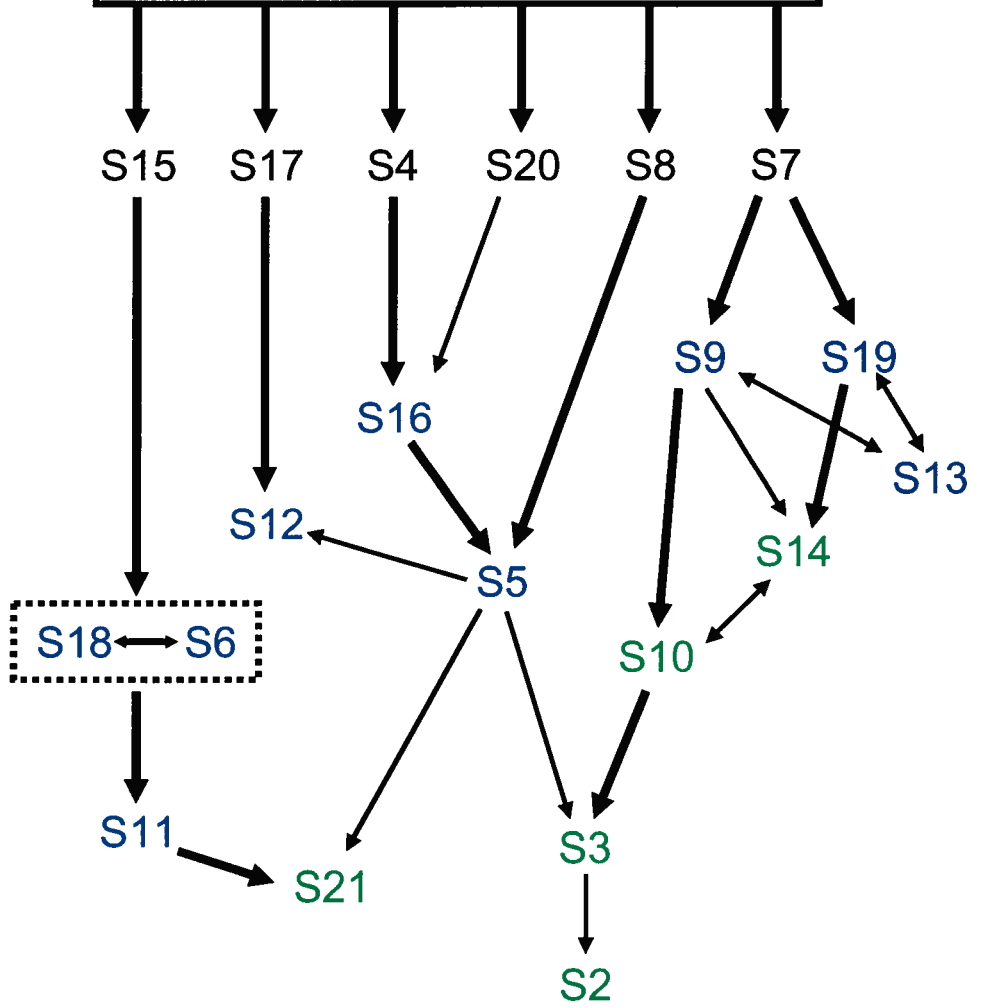
1.1.2. Les protéines ribosomiques

Le ribosome d'*E. coli* contient plus de 50 protéines ribosomiques. Les protéines ribosomiques sont riches en résidus basiques et sont relativement petites, avec des masses allant de 4 à 24 kDa, sauf la protéine S1, qui a une masse de 68 kDa. Lors de l'assemblage des sous-unités, les protéines ribosomiques viennent se lier aux ARNr d'une façon ordonnée et hiérarchique (Held et al., 1974; revues par Culver, 2003; Williamson, 2003). Les protéines ribosomiques sont classées en trois catégories, en fonction de cette hiérarchie. Les protéines primaires se lient directement à l'ARNr, indépendamment des autres protéines. Les protéines secondaires nécessitent la liaison d'une ou plusieurs protéines primaires pour se lier à l'ARN. Finalement, la liaison des protéines tertiaires requiert la liaison de protéines secondaires et primaires. La Figure 1-5 présente un schéma d'assemblage de la sous-unité 30S. L'ordre de liaison des protéines à l'ARNr 16S et la coopérativité entre les protéines ont été déterminés par des expériences d'assemblage *in vitro* à partir des composantes isolées (Held et al., 1974; revue par Culver, 2003).

Les sites de liaison des protéines ribosomiques sur les ARNr ont été déterminés en identifiant les régions protégées par ces protéines contre l'attaque d'agents chimiques, comme le kéthoxal, DMS et CMCT dont nous avons parlé dans la section précédente (Powers et al., 1988a; 1988b; Stern et al., 1988a; 1988b; Svensson et al., 1988; Powers & Noller, 1995). Les sites de liaison des protéines ribosomiques sur l'ARNr ont aussi été caractérisés en étudiant les fragments minimaux d'ARNr permettant la liaison de ces protéines (Spierer & Zimmermann, 1976; Stark et al., 1984; Gregory & Zimmermann, 1986; Dragon et al., 1994). Diverses méthodes ont également été employées pour positionner les protéines ribosomiques dans la structure du ribosome. En employant des anticorps spécifiques pour ces protéines ribosomiques, il a été possible de former des dimères de ribosomes. La localisation des protéines ciblées a ensuite été déterminée par microscopie électronique, en détectant les emplacements où les sous-unités se rejoignent

Figure 1-5 : Carte d'assemblage de la sous-unité 30S, montrant l'ordre de liaison des protéines ribosomiques à l'ARNr 16S (adapté de Culver, 2003). L'ARNr 16S est représenté par un rectangle. Les protéines primaires, secondaires et tertiaires sont indiquées respectivement en noir, en bleu et en vert. Les flèches larges indiquent une forte coopération pour la liaison au complexe, et les flèches minces une faible coopération. Les protéines S6 et S18 sont encadrées en pointillé pour indiquer qu'elles se lient à l'ARNr 16S en tant qu'hétérodimère.

ARN ribosomique 16S



dans les dimères (Stoffler-Meilicke & Stoffler, 1987; Scheinman et al., 1992; Schwedler et al., 1993). Une autre méthode a employé des sous-unités reconstituées *in vitro* à partir des constituants isolés, dont deux des protéines étaient deutérées. Ces sous-unités étaient ensuite bombardées par des neutrons et, à partir des patrons de diffraction des neutrons, il a été possible de déterminer la position des centres de masse de toutes les protéines de la sous-unité 30S et de plusieurs protéines de la sous-unité 50S (Capel & Ramakrishnan, 1988; May et al., 1992; Svergun et al., 1996). Les distances entre diverses protéines avaient aussi été mesurées par des expériences de transfert d'énergie de fluorescence par résonance, ou FRET (Huang et al., 1975). Des relations de voisinage entre les protéines ribosomiques avaient aussi été établies par des expériences de pontages (revue par Traut et al., 1995). Finalement, les structures de plusieurs protéines ribosomiques isolées ont également été déterminées par cristallographie aux rayons X ou par RMN (revues par Moore, 1998; Ramakrishnan & White, 1998). Les structures de quelques complexes ARN-protéines ont également été élucidées, dont celle d'un fragment du domaine central de l'ARNr 16S lié aux protéines S15, S6 et S18 (Agalarov et al., 2000). Ces données ont été très utiles dans l'élaboration de modèles structuraux et, plus tard, dans l'analyse de la structure cristalline du ribosome.

1.1.3. L'évolution du ribosome à partir d'un monde à ARN

Le ribosome catalyse la synthèse des protéines à partir de l'information contenue dans les ARNm, mais il est lui-même composé en partie de protéines. Pendant longtemps, cette situation a soulevé un paradoxe concernant l'évolution du ribosome. Depuis que les propriétés catalytiques des ARN ont été découvertes (Kruger et al., 1982; Guerrier-Takada et al., 1983), il a été proposé que la vie actuelle a évolué à partir d'un monde à ARN où les fonctions cellulaires étaient assurées par des ARN catalytiques (Poole et al., 1998; Gesteland et al., 1999). Selon cette théorie, le ribosome actuel aurait évolué à partir d'un

ribosome primitif formé exclusivement d'ARN (revue par Noller, 1999). Au cours de l'évolution, des peptides sont venus s'ajouter au ribosome pour augmenter sa stabilité et son efficacité (Poole et al., 1998). Récemment, il a été suggéré que l'avantage principal des peptides se liant à l'ARN a été d'augmenter la richesse structurale des ARN en permettant aux ARN d'adopter des conformations qu'ils ne peuvent adopter seuls (Noller, 2004). Cette hypothèse est appuyée par le fait que plusieurs peptides comme Rev et Tat (des protéines régulatrices du virus de l'immunodéficience humaine) et même des molécules plus petites, se lient à des ARN en induisant des structures que ces ARN ne peuvent adopter seuls (Puglisi et al., 1992; Battiste et al., 1996; Mandal & Breaker, 2004).

Dans un monde à ARN, l'évolution ne pouvait prévoir l'avènement de la synthèse protéique. Il est probable que les fonctions du ribosome actuel ont évolué à partir des fonctions utilisées dans le monde à ARN, comme la réplication et la recombinaison. La théorie la plus plausible est que les diverses fonctions du ribosome, notamment la catalyse du lien peptidique et le décodage, aient d'abord évolué de façon indépendante, jusqu'à ce qu'il soit utile d'associer les deux sous-unités ribosomiques pour la synthèse protéique (revue par Noller, 1999). Plusieurs petits ribozymes sélectionnés à partir de séquences aléatoires d'ARN peuvent catalyser les diverses réactions chimiques à la base de la synthèse protéique, comme l'activation des acides aminés, l'aminacylation des ARNt et la formation du lien peptidique (Zhang & Cech, 1997; Illangasekare & Yarus, 1999; Lee et al., 2000; Kumar & Yarus, 2001). En ce qui concerne la fonction de décodage, l'interaction entre les anticodons des ARNt et les codons de l'ARNm présente une ressemblance frappante avec les appariements utilisés lors de la reconnaissance de sites d'épissages et il fut imaginé que le décodage a évolué à partir d'une fonction de recombinaison similaire à l'épissage (Noller, 1991b). Il est d'ailleurs intéressant de souligner que plusieurs antibiotiques aminoglycosidés qui se lient au site de décodage du ribosome inhibent également l'autoépissage des introns de groupe I *in vitro* (von Ahsen et al., 1991; revue par Schroeder et al., 2000). Les ARNt ont plusieurs fonctions indépendantes de la synthèse

protéique, notamment dans la réplication des ARN viraux et des télomères, et il est probable que leur fonction dans la traduction a évolué à partir d'autres fonctions utilisées dans le monde à ARN (revues par Maizels & Weiner, 1999). En résumé, il y a beaucoup de spéculation au sujet de l'évolution du ribosome, mais il est clair que le ribosome est une machine à ARN très ancienne. L'évolution en a fait un complexe ribonucléoprotéique où protéines et ARN participent à la synthèse protéique, mais le rôle majeur est encore exercé par l'ARN.

1.2. La structure du ribosome bactérien à haute résolution

Comment le ribosome, un complexe comptant plus de 4500 nucléotides et plus de 50 protéines, permet-il d'accomplir les nombreuses étapes de la traduction? On ne peut répondre à cette question sans avoir une connaissance détaillée de la structure du ribosome. Déterminer la structure du ribosome est une tâche titanesque qui occupe la communauté scientifique depuis plus de 50 ans et qui n'est pas encore terminée. Pendant longtemps, il a fallu se contenter de modèles reposant sur diverses données biochimiques décrites plus haut (voir sections 1.1.1.2 et 1.1.2). Grâce à la persévérance de plusieurs groupes, nous disposons maintenant d'images à haute résolution du ribosome bactérien, obtenues grâce à deux techniques principales : la microscopie cryo-électronique (cryo-EM) et la cristallographie aux rayons X. Cette section présente ces deux techniques et résume leurs apports à notre connaissance de la structure du ribosome.

1.2.1. La microscopie cryo-électronique

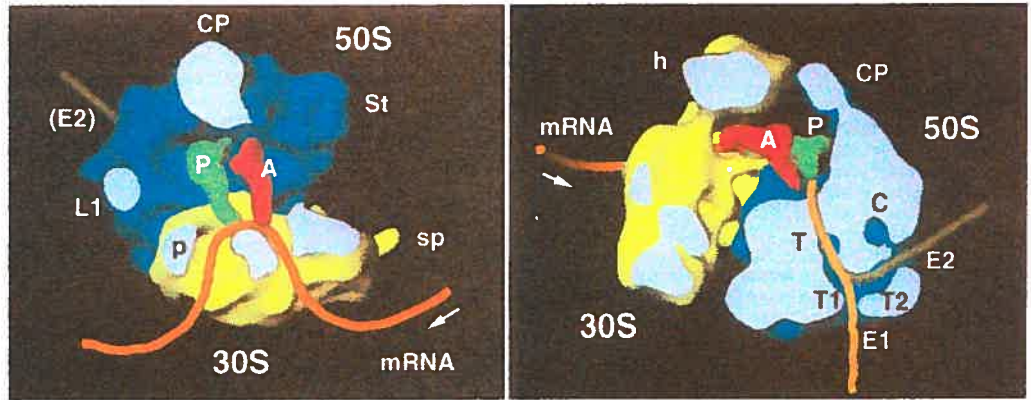
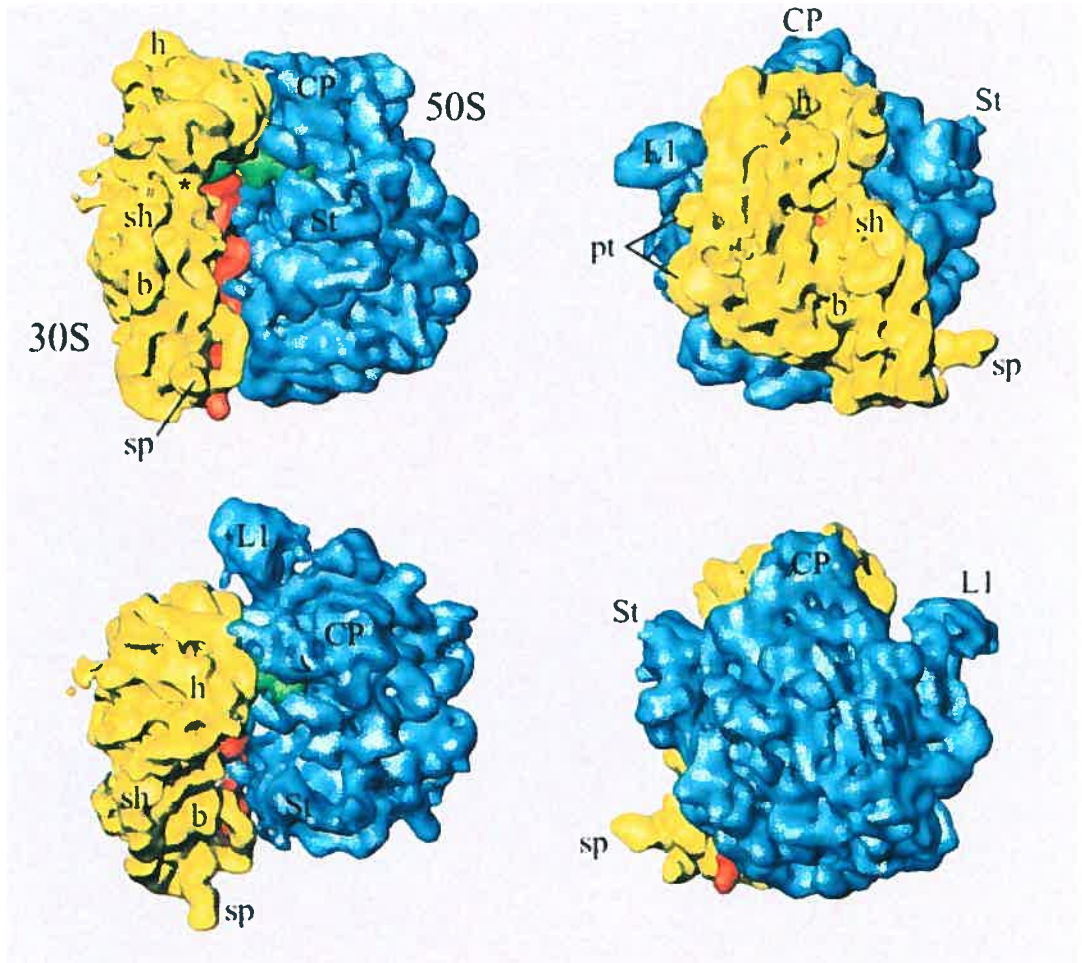
Il y plusieurs années, la détermination de la structure du ribosome par cristallographie était considérée comme impossible. Pendant des décennies, la microscopie

électronique a suppléé à l'absence de structure cristallographique. Un raffinement majeur de cette méthode est la microscopie cryo-électronique, ou cryo-EM, qui consiste à congeler rapidement des échantillons de ribosomes en solution aqueuse, afin d'emprisonner les particules dans de la glace amorphe. Les échantillons sont ensuite analysés par microscopie électronique. Des milliers d'images de ribosomes dans des orientations aléatoires sont numérisées et des programmes informatiques permettent de reconstruire une image en trois dimensions à partir de ces milliers de projections. Comparativement à la cristallographie, cette technique présente plusieurs avantages. Obtenir des cristaux de ribosomes est long et fastidieux, alors que, pour la cryo-EM, la préparation des échantillons est rapide et facile. N'importe quel complexe de ribosomes pouvant être produit en solution aqueuse peut être analysé par cryo-EM. La structure du ribosome a donc été étudiée dans différents états fonctionnels et en complexe avec divers facteurs et substrats. Un autre avantage de la cryo-EM est que les particules sont en solution aqueuse. Il n'y a donc pas d'interaction artificielle entre les particules, comme c'est le cas dans des cristaux. La principale difficulté avec la cryo-EM réside dans le fait que la résolution des images obtenues est limitée par le nombre de projections utilisées pour la reconstruction. Cette section présente la contribution de la cryo-EM à notre connaissance de la structure du ribosome. Plusieurs structures du ribosome ont été obtenues dans divers états fonctionnels et en complexe avec divers facteurs et substrats. Les détails de ces structures seront exposés dans les sections 1.4.1-1.4.3, traitant des étapes de la traduction.

Les premiers modèles du ribosome d'*E. coli* développés à partir de la cryo-EM furent élaborés en utilisant environ 300 projections, ce qui limitait la résolution à 40 Å (Frank et al., 1991). Quatre ans plus tard, l'amélioration des techniques de cryo-EM et l'augmentation du nombre de projections utilisées permirent d'améliorer la résolution à environ 25 Å (Frank et al., 1995; Stark et al., 1995). La structure du groupe de Frank est présentée à la Figure 1-6A. Les sous-unités sont séparées par une cavité dans laquelle la

Figure 1-6 : Étude du ribosome par microscopie cryo-électronique.

- A. Structure du ribosome d'*Escherichia coli* à une résolution de 25 Å (adapté de Frank et al., 1995). La sous-unité 30S est colorée en jaune et la sous-unité 50S est colorée en bleu. La position des ARNt au site P (vert) et au site A (rouge), ainsi que celle du messager, a été modélisée. Le panneau de gauche présente une coupe transversale au niveau du cou de la sous-unité 30S, autour duquel s'enroule l'ARNm. Le panneau de droite présente une coupe longitudinale permettant de voir le tunnel qui traverse la sous-unité 50S. Ce tunnel bifurque pour former deux tunnels, T1 et T2, avec chacun une sortie, E1 et E2. Le chemin du peptide à travers ces deux tunnels a été modélisé.
- B. Structure du ribosome d'*Escherichia coli* complexé avec un ARNt initiateur au site P, à une résolution de 11.5 Å (adapté de Gabashvili et al., 2000). La sous-unité 30S est colorée en jaune et la sous-unité 50S en bleu. L'ARNt au site P est coloré en vert et l'hélice 44 de l'ARNr 16S en rouge. Les principales caractéristiques structurales sont indiquées : h : tête (*head*); sh : épaule (*shoulder*); b : corps (*body*); pt : plate-forme (*platform*); sp : pied (*spur*); CP : protubérance centrale (*central protrance*); St : tige (*stalk*).

A**B**

position des ARNt a pu être modélisée. Un tunnel traverse le cou de la sous-unité 30S, par lequel il fut proposé que passe l'ARNm. La sous-unité 50S comporte aussi un tunnel, qui servirait de sortie au peptide en croissance. Ce tunnel débute dans la cavité interne, au niveau des extrémités acceptrices des ARNt, pour ressortir de l'autre côté de la sous-unité, en deux endroits. Aussi, six points de contacts entre les deux sous-unités furent observés et désignés B1 à B6 (B pour *bridge*).

Un an plus tard, le groupe de Frank publiait une structure à une résolution de 25 Å du ribosome 70S complexé à un ARNm synthétique, et trois ARNt^{phe} désacylés liés aux sites A, P et E (Agrawal et al., 1996). La position des ARNt sur la carte de densité du complexe fut déterminée par comparaison avec la carte de densité du ribosome libre. Il s'agissait des premières images montrant directement le positionnement des ARNt sur le ribosome. Les trois ARNt sont situés à l'interface entre les sous-unités et leur structure en forme de L est facilement reconnaissable. Les deux ARNt aux sites A et P sont positionnés de manière à ce que leur tige anticodon et leur tige acceptrice soient proche l'une de l'autre et les plans contenant ces ARNt forment un angle de 160°. L'ARNt au site E est positionné de manière à entourer la tige L1 de la sous-unité 50S. Peu de temps après la publication de cette structure, le groupe de van Heel a publié deux structures du ribosome dans deux états fonctionnels différents (Stark et al., 1997a). Dans l'un des états (dit pré-translocationnel), le ribosome contient un ARNm, un ARNt désacylé au site P et un pept-ARNt au site A. Dans l'autre état (dit post-translocationnel), le ribosome contient un ARNm, un ARNt désacylé au site E et un pept-ARNt au site P. Le positionnement des ARNt dans ces structures diffère de celui observé par le groupe de Frank. Notamment, l'angle entre les plans occupés par les ARNt aux sites A et P est de seulement 50° au lieu de 160°. Cet angle plus étroit est supporté par diverses expériences qui montrent que les coudes des ARNt aux sites A et P sont proches, comme des expériences de FRET (Paulsen et al., 1983) et de pontages (Rinke-Appel et al., 1995). Les différences entre ces deux structures peuvent s'expliquer par les différences de préparation des complexes ribosomiques. Dans les travaux du groupe

quel type
quel résolution

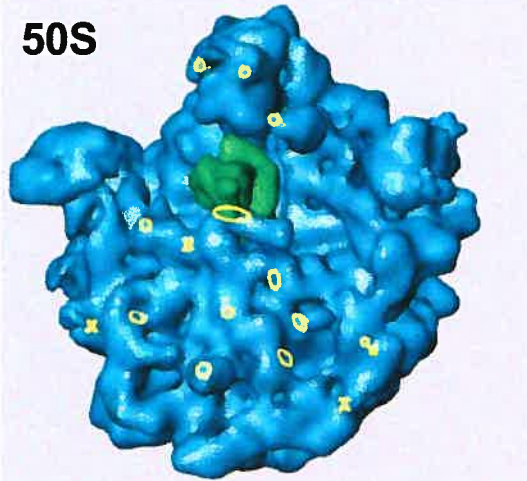
les de ces deux groupes

de van Heel, il s'agissait de deux complexes correspondant à des états fonctionnels du ribosome, alors que dans le cas des travaux du groupe de Frank, il s'agissait d'un seul complexe contenant les trois ARNt. Or, il a été montré que le ribosome ne contient jamais plus de deux ARNt en même temps au cours de la traduction (Rheinberger & Nierhaus, 1983; 1986, voir section 1.4.2.3) et la structure observée par le groupe de Frank pourrait donc correspondre à un état non-fonctionnel du ribosome.

La résolution des structures obtenues par cryo-EM s'est améliorée progressivement pour atteindre 11,5 Å en 2000 (Gabashvili et al., 2000). La structure obtenue à cette résolution est présentée à la Figure 1-6B. Il s'agit d'une structure du ribosome 70S, avec un fMet-ARNt^{Met} lié à son site P. Plus de 73 000 projections ont été utilisées pour atteindre cette résolution. Certaines hélices d'ARN y sont visibles, ainsi que des protéines situées à la périphérie du ribosome, mais il n'est pas toujours possible de les distinguer clairement. Les premières structures cristallographiques à faible résolution du ribosome et de ses sous-unités furent publiées peu avant cette structure par cryo-EM (Ban et al., 1999; Cate et al., 1999; Clemons et al., 1999), ce qui facilita l'identification de certains éléments d'ARN ou de protéines. Les hélices du domaine central de l'ARNr 16S ont pu être identifiées, et l'hélice 44 qui se situe le long du corps de la 30S est clairement visible. Les protéines S4, S5, S6, S7, S8 et S15 dont la structure était déjà connue ont pu être positionnées. Pour la sous-unité 50S, la boucle sarcine-ricine de l'ARNr 23S (SRL pour *sarcin-ricin loop*), une région impliquée dans la liaison des facteurs d'élongation, a pu être positionnée. Le complexe ARN-L11, impliqué dans l'activité de ces facteurs d'élongation, de même que les protéines L6 et L14 qui flanquent la SRL ont également été positionnés. La protéine L1 qui forme la tige L1 est visible. À cette résolution, il a également été possible de voir avec plus de détails les ponts qui unissent les deux sous-unités. Plusieurs des six ponts qui avaient été observés auparavant dans des structures à plus faible résolution sont en fait formés par plusieurs contacts (Figure 1-7). Le pont B1 entre la tête de la sous-unité 30S et la protubérance de la sous-unité 50S se divise en trois contacts, appelés B1a, B1b et B1c. Le

Figure 1-7 : Ponts entre les sous-unités ribosomiques, visualisés par cryo-EM. Cette image provient d'une structure du ribosome complexé avec un ARNt initiateur au site P, à une résolution de 11.5 Å (adapté de Gabashvili et al., 2000). Les sous-unités sont vue du côté de l'interface. L'hélice 44 de l'ARNr 16S est colorée en rouge et l'ARNt initiateur en vert. Les ponts sont indiqués sur la structure et leur disposition est reproduite à droite pour plus de clarté.

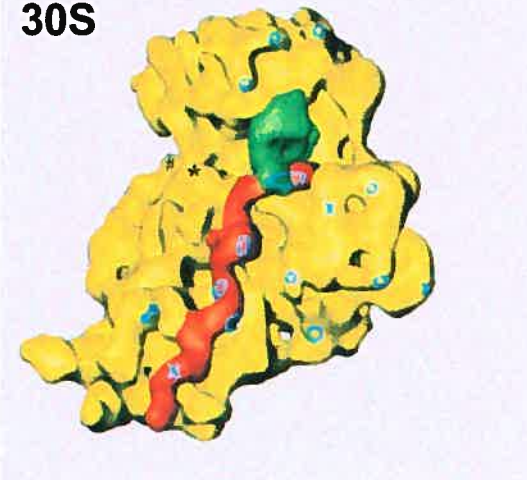
50S



B1c° °B1b
°B1a

B2d° x B2a
°B2b °B3
x °B2c °B2c° B5a° B6
B4° B5b x

30S



B1b° °B1c
B1a°

* B2a° B2d
B2b° x
B3° B2c° B2c° x
B6° B5a° B5b° B4
x

pont B2 qui lie la plate-forme de la sous-unité 30S à la sous-unité 50S est formé de cinq contacts nommés B2a à B2e et le pont B5 est formé de deux contacts, B5a et B5b.

En 1999, une structure de la sous-unité 50S à une résolution de 7,5 Å a été obtenue par cryo-EM (Matadeen et al., 1999). Il s'agit de la meilleure résolution atteinte à ce jour. À cette résolution, les hélices d'ARN sont clairement visibles. Cette structure fut utilisée pour construire un modèle du repliement de l'ARNr 23S à l'intérieur de la sous-unité 50S (Mueller et al., 2000). La structure par cryo-EM définit un volume que l'ARNr et les protéines ribosomiques doivent remplir. L'ARNr a pu être positionné en se basant sur les données structurales déjà disponibles, tels que les pontages et les expériences de protection contre les attaques par des agents chimiques. Les éléments conservés de l'ARNr 23S forment le coeur de la sous-unité, alors que les éléments variables se retrouvent à la périphérie. Le groupe de Frank mit au point une méthode astucieuse d'étiquetage permettant d'identifier la position de certaines régions d'ARNr (Spahn et al., 1999). Cette méthode consiste à insérer la séquence d'un ARNt à l'extrémité d'hélices de l'ARNr 23S. L'insertion forme une protubérance visible par cryo-EM, ce qui permet d'identifier la position de ces hélices. Des expériences similaires ont été utilisées par Matadeen et al. (2001) pour localiser les éléments de séquences secondaires qui diffèrent entre *E. coli* et *Haloarcula marismortui*, une archaebactérie halophile dont la structure de la sous-unité 50S venait d'être déterminée par cristallographie (voir section suivante).

Pour terminer, la cryo-EM a aussi été utilisée pour étudier la structure du ribosome eucaryote (revue par Doudna & Rath, 2002). Mentionnons les structures du ribosome du lapin à une résolution de 21 Å (Dube et al., 1998) et de la levure à une résolution de 15 Å (Spahn et al., 2001). Le ribosome eucaryote 80S est plus massif que le ribosome procaryote. Ses ARNr sont plus grands, il contient un ARNr supplémentaire, l'ARNr 5,8S, ainsi que 20-30 protéines additionnelles. Cependant, la structure globale des ribosomes eucaryotes et procaryotes est similaire. Le repliement des ARNr dans les structures du

ribosome eucaryote a été modélisé et, comme indiqué plus haut, les régions conservées forment le coeur du ribosome, alors que les extensions des ARNr sont principalement localisées à la périphérie.

1.2.2. La cristallographie aux rayons X du ribosome et de ses sous-unités

Le ribosome est un énorme complexe asymétrique, ce qui rend sa cristallisation très difficile. De plus, les cristaux de sous-unités ribosomiques sont souvent très fragiles et supportent difficilement le traitement aux rayons X. Ce problème a été contourné en utilisant des sous-unités ribosomiques de bactéries thermophiles et halophiles, qui sont beaucoup plus robustes que celles d'*E. coli*. Les premiers cristaux de la sous-unité 50S de *Bacillus stearothermophilus* ont été obtenus en 1980 (Yonath et al., 1980). Il a ensuite été montré que des cristaux de la sous-unité 50S de *H. marismortui* peuvent diffracter à une résolution de 3 Å (von Bohlen et al., 1991). Il fallut cependant attendre l'amélioration des sources de rayons X, des techniques de collection de données et de calculs informatiques avant de pouvoir déterminer la structure de ces cristaux. En 1998, la première structure cristallographique de la sous-unité 50S de *H. marismortui* a été déterminée à une résolution de 9 Å (Ban et al., 1998). À cette résolution, les portions d'ARN double brin étaient visibles. Ces résultats encourageants furent bientôt suivis par la publication des structures dont nous disposons présentement, incluant des structures de la sous-unité 30S de *Thermus thermophilus* (Schluenzen et al., 2000; Wimberly et al., 2000), de la sous-unité 50S de *H. marismortui* (Ban et al., 2000) et de la mésobactérie *Deinococcus radiodurans* (Harms et al., 2001), ainsi que du ribosome 70S de *T. thermophilus* (Yusupov et al., 2001). Les sections qui suivent présentent chacune de ces structures et résumant leurs apports à notre connaissance de la structure du ribosome. Des structures des sous-unités ribosomiques, complexées avec des analogues de substrats du ribosome, comme des fragments d'ARNm

et d'ARNt ou la puromycine (un petit analogue du substrat au site A), ont aussi été publiées. Ces structures qui ont fourni des informations importantes sur les diverses étapes de la synthèse protéique seront abordées dans les sections 1.4.1 à 1.4.3 qui décrivent ces étapes.

1.2.2.1. Les structures cristallographiques de la sous-unité 50S

Les premières structures cristallographiques de sous-unités ribosomiques furent obtenues avec la sous-unité 50S de *H. marismortui*, à une résolution de 9 Å (Ban et al., 1998), de 5 Å (Ban et al., 1999) et finalement à une résolution de 2,4 Å (Ban et al., 2000). Dans cette dernière structure, on distingue 2711 des 2933 nucléotides de l'ARNr 23S, les 122 nucléotides de l'ARNr 5S et 27 des 31 protéines ribosomiques. Un an plus tard, le groupe de Yonath publia la structure de la sous-unité 50S de la mésobactérie *D. radiodurans* à une résolution de 3,1 Å (Harms et al., 2001). Dans cette structure, 96% de tous les nucléotides des ARNr et la majorité des acides aminés de presque toutes les 33 protéines ont pu être identifiés. Ces deux structures, présentées à la Figure 1-8, sont très semblables, à part quelques différences qui peuvent être expliquées par les différences dans les méthodes de cristallisation et par les différences entre les deux organismes. De plus, la sous-unité 50S de *D. radiodurans* contient plusieurs protéines qui n'ont pas d'homologue chez *H. marismortui*. La forme en fauteuil de la sous-unité 50S est facilement reconnaissable, avec la protubérance centrale flanquée de la tige L1 et de la tige L7/L12. Dans la structure de *D. radiodurans*, les protéines de ces tiges sont présentes, mais leur structure est mal définie. Quant à *H. marismortui*, sa structure ne présente pas de densité visible pour ces deux tiges. Cependant, la densité de la protéine L1 était clairement visible dans la structure à une résolution de 9 Å publiée précédemment (Ban et al., 1998) et, comme la structure cristalline de cette protéine était déjà connue (Nevskaya et al., 2000), il a été possible de la positionner dans la sous-unité. Il n'y a pas non plus de densité

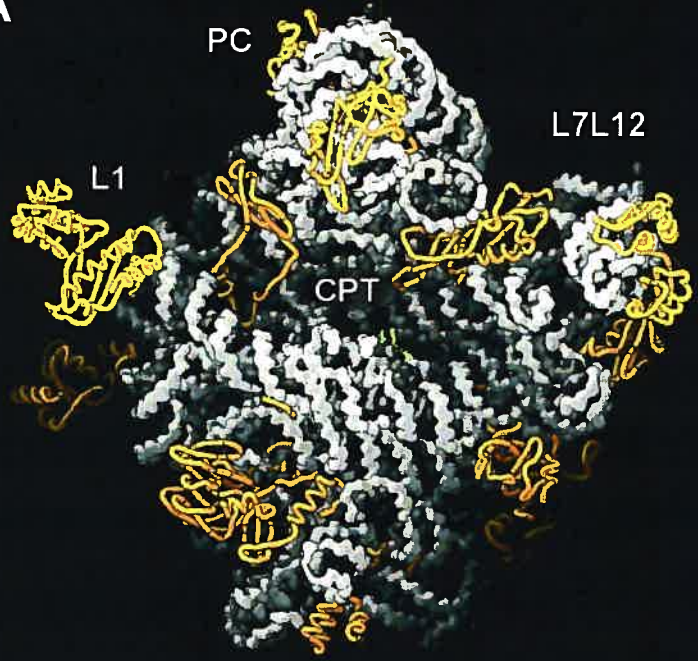
Figure 1-8 : Structure de la sous-unité 50S déterminée par cristallographie aux rayons X. Les principales caractéristiques structurales de la sous-unité sont indiquées : protubérance centrale (PC), tige L1, tige L7/L12 et centre peptidyltransférase (CPT).

A. Structure de la sous-unité 50S de *Haloarcula marismortui* obtenue par le groupe de Steitz et Moore (adapté de Ban et al., 2000). La sous-unité est présentée vue du côté de l'interface. L'ARNr est représenté en gris et les protéines en jaune.

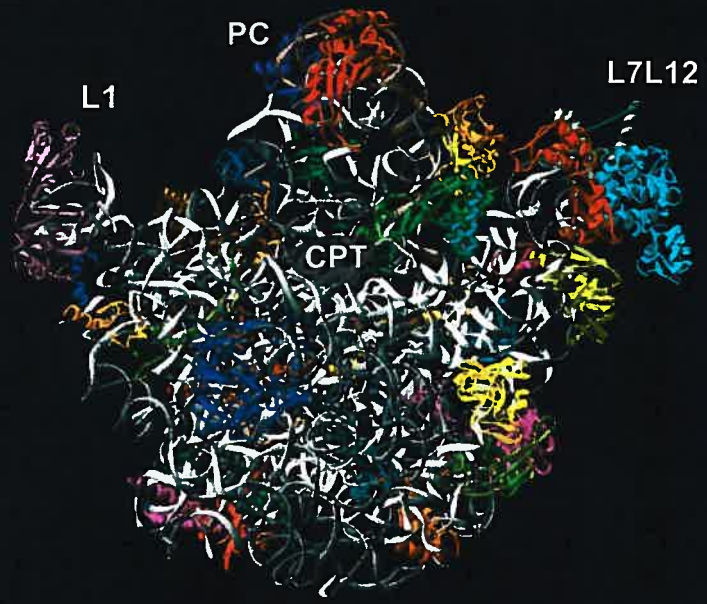
B. Structure de la sous-unité 50S de *Deinococcus radiodurans* obtenue par le groupe de Yonath (adapté de Harms et al., 2001). La sous-unité est présentée vue du côté de l'interface. L'ARN est coloré en gris et les protéines de diverses couleurs.

avec les
2 pores peptidyl

A



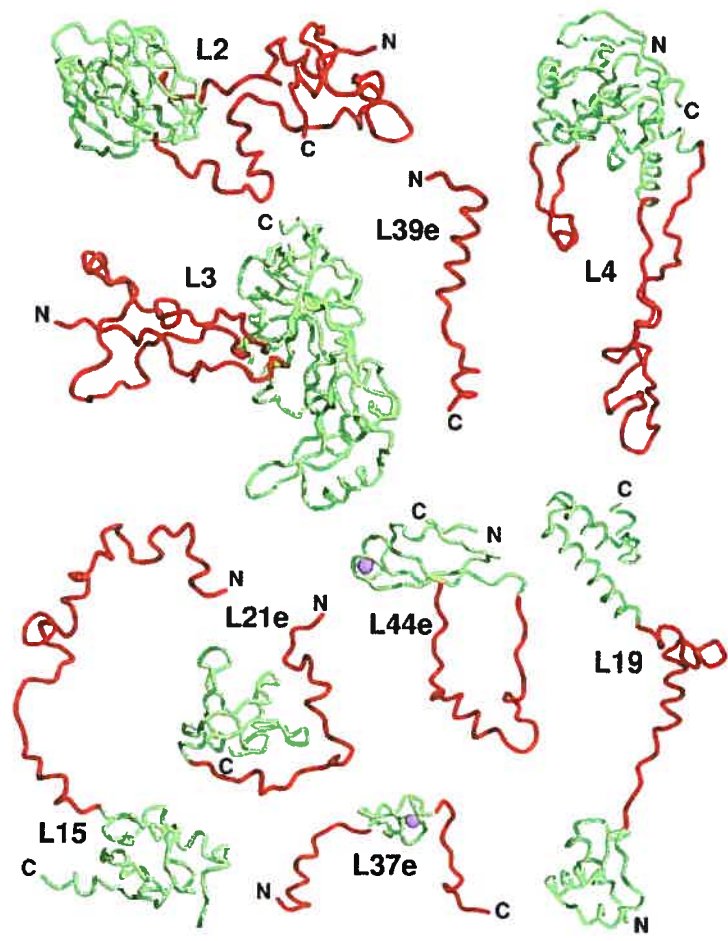
B



correspondant au complexe appelé centre d'activation de la GTPase (GAC), formé par la protéine L11 et la région de l'ARNr 23S contenant son site de liaison. Cependant, le complexe entre L11 et un fragment d'ARNr avait déjà été cristallisé (Conn et al., 1999; Wimberly et al., 1999) et cette structure a pu être positionnée dans une structure à 5 Å de la sous-unité 50S de *H. marismortui* publiée précédemment (Ban et al., 1999). Sous la protubérance centrale de la sous-unité 50S se trouve la crevasse appelée centre peptidyltransférase (CPT), car c'est à cet endroit qu'a lieu la catalyse du lien peptidique. Un tunnel d'environ 15 Å part de cette cavité pour aboutir 100 Å plus loin, de l'autre côté de la sous-unité. Comme mentionné plus haut, ce tunnel sert de sortie au peptide en croissance, ce qui a été confirmé directement par des expériences de cryo-EM (Gilbert et al., 2004). La sortie de ce tunnel est entourée de six protéines, dont les protéines L4 et L22 où des mutations confèrent la résistance à l'érythromycine, un antibiotique qui agit en bloquant le tunnel de sortie (Arevalo et al., 1988). Des changements conformationnels du ribosome à la sortie du tunnel pourraient être impliqués dans le repliement ou la maturation des protéines en croissance (Gabashvili et al., 2001).

Les protéines de la sous-unité 50S sont localisées principalement à la périphérie de la sous-unité et du côté exposé au solvant. La cavité peptidyltransférase est exempte de protéine, ce qui confirme que la catalyse du lien peptidique est assurée par l'ARNr 23S. Les protéines ribosomiques ont des structures très variées et souvent particulières (Figure 1-9). Plusieurs de ces protéines contiennent au moins un domaine globulaire en plus d'une longue extension. Ces extensions sont riches en résidus basiques et, dans plusieurs cas, n'ont pas de structure secondaire conventionnelle. Ces extensions se faufilent vers l'intérieur de la sous-unité, alors que les domaines globulaires sont principalement localisés à la surface. Les extensions interagissent avec plusieurs éléments de l'ARNr, souvent avec plusieurs domaines différents. Il semble que leur rôle soit de stabiliser la structure de l'ARNr, un peu comme du mortier dans un mur de briques. Plusieurs protéines

Figure 1-9 : Exemples de structures de protéines ribosomiques de la sous-unité 50S d'*Haloarcula marismortui* (adapté de Ban et al., 2000). Les domaines globulaires sont colorés en vert et les extensions non globulaires en rouge. Les protéines dont le nom est suivi de la lettre « e » n'ont pas d'homologue chez *Eschérichia coli*. Les cercles violets de L37e et L44e indiquent la position d'un atome de zinc.



ribosomiques ne pouvaient pas être cristallisées sous forme libre, car leur structure est trop désordonnée en absence d'ARN.

La sous-unité 50S est plutôt monolithique. Rappelons que l'ARNr 23S est formé de six domaines distincts et l'ARNr 5S peut être considéré comme un septième domaine. Tel qu'illustré à la Figure 1-10, les domaines de l'ARNr 23S ne forment pas de domaines indépendants dans la structure de cette sous-unité, mais sont imbriqués pour ne former qu'une seule masse compacte. Le domaine I se trouve du côté du solvant, sous la tige L1. Le domaine II est le plus grand des six domaines et forme surtout le dos de la sous-unité. Les hélices 42-44 de ce domaine font partie de la tige L7/L12. Le domaine III est un petit domaine globulaire localisé au bas de la sous-unité. Le domaine IV forme la majeure partie de l'interface. Ce domaine contient notamment l'hélice 69, qui interagit avec l'hélice 44 de l'ARNr 16S, et les hélices 67-71, qui forment le rebord central de la cavité peptidyltransférase. Le domaine V est flanqué par les domaines II et IV. Le domaine V est reconnu comme étant le siège de l'activité peptidyltransférase. En effet, plusieurs mutations dans ce domaine confèrent la résistance à des inhibiteurs de l'activité peptidyl-transférase (revues par Porse et al., 2000; Brakier-Gingras et al., 2003). Le domaine VI, le plus petit des six domaines, est localisé sous la tige L7/L12 et comprend la boucle sarcine-ricine. L'ARNr 5S est quant à lui localisé dans la protubérance centrale de la sous-unité.

1.2.2.2. Les structures cristallographiques de la sous-unité 30S

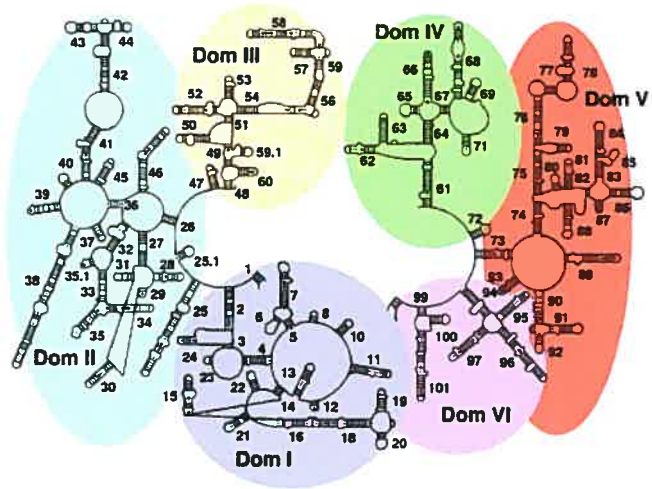
La première structure de la sous-unité 30S de *T. thermophilus* à une résolution de 5,5 Å a été publiée par le groupe de Ramakrishnan en 1999 (Clemons et al., 1999). Dans cette structure, il a été possible de positionner plusieurs hélices de l'ARNr 16S, dont toutes les hélices du domaine central, et les sept protéines ribosomiques dont la structure était déjà connue (S4, S5, S6, S7, S8, S15 et S17). L'année suivante, les groupes de Yonath et de

Figure 1-10 : Localisation des domaines de l'ARNr 23S et de l'ARNr 5S dans la sous-unité 50S (adapté de Ban et al., 2000).

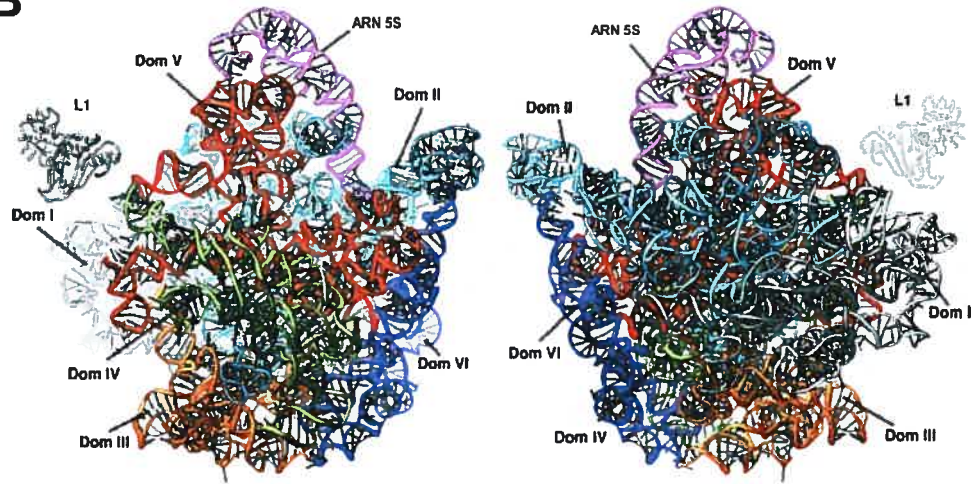
- A. Structure secondaire de l'ARNr 23S, avec les six domaines colorés de différentes couleurs.

- B. Structure tridimensionnelle des ARNr 23S et 5S, avec les domaines de l'ARNr 23S colorés comme en A et l'ARNr 5S coloré en violet. La position de la protéine L1 est aussi indiquée comme référence. La structure est présentée vue de l'interface et vue du solvant.

A



B



vue du côté de l'interface

vue du côté du solvant

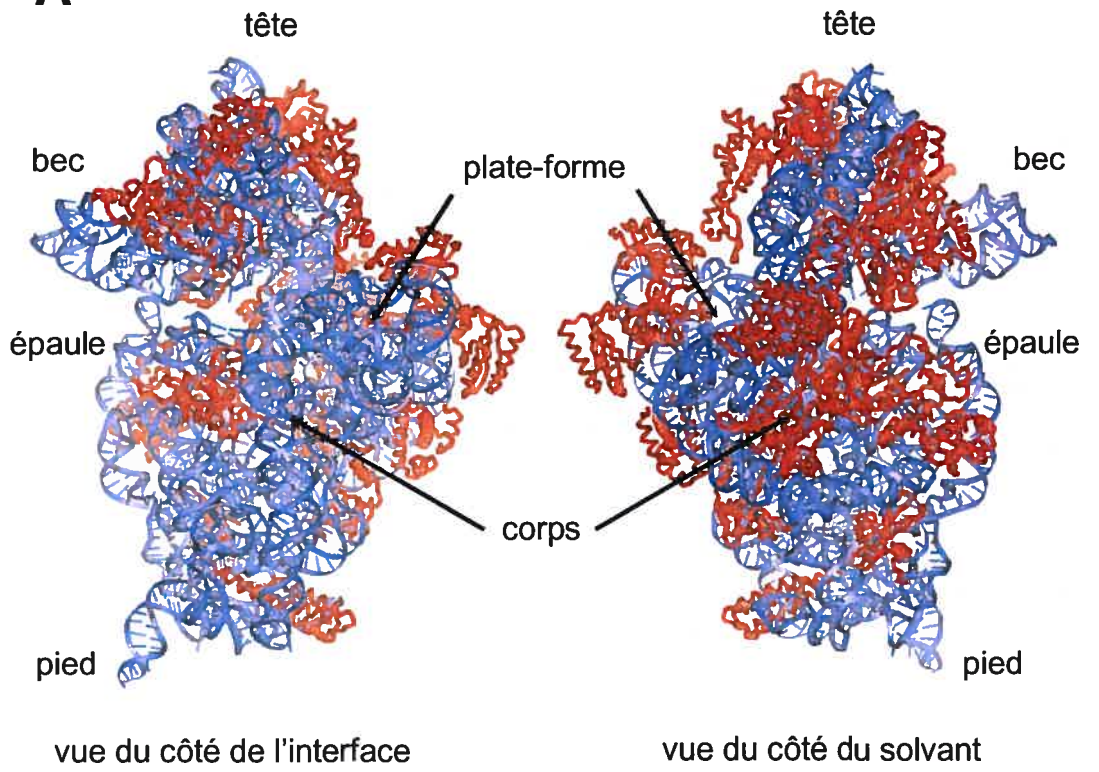
Ramakrishnan ont chacun publié une structure de la sous-unité 30S de *T. thermophilus* à des résolutions de 3,3 Å et 3 Å, respectivement (Schluenzen et al., 2000; Wimberly et al., 2000). Ces deux structures sont très similaires à première vue, mais celle du groupe de Ramakrishnan est plus complète, avec 51 737 atomes visibles contre 34 970 pour celle du groupe de Yonath. Il y a aussi plusieurs différences mineures dans la conformation des régions d'ARN et la topologie des protéines. Ces différences sont probablement dues en grande partie à des différences d'interprétation des patrons de diffraction, mais il peut aussi s'agir de différences dans les conformations des sous-unités cristallisées. Ces deux structures sont présentées à la Figure 1-11.

La structure du groupe de Ramakrishnan sera ici prise comme référence, puisqu'elle est plus complète et a une meilleure résolution. Environ 99% de l'ARNr 16S a pu être positionné dans cette structure. Toutes les protéines ribosomiques ont aussi été positionnées, sauf la protéine S1 qui avait été enlevée des sous-unités 30S afin d'améliorer l'efficacité de cristallisation. La structure globale est très semblable à la structure déterminée par cryo-EM. Les différentes caractéristiques structurales sont visibles : le corps, la plate-forme, l'épaule et la tête. On distingue aussi un bec situé sur un côté de la tête et une petite tige-boucle d'ARN qui dépasse du bas du corps et qui est appelée éperon (*spur*) ou pied (*foot*). La morphologie de la sous-unité 30S est imposée principalement par la structure de l'ARNr 16S. Tel que montré à la Figure 1-12, le corps est formé par les domaines 5' et 3' mineur, la plate-forme est formée par le domaine central et la tête par le domaine 3' majeur. La tête et le corps sont reliés par l'hélice 28, qui forme le cou de la 30S. Comme il avait été observé par cryo-EM, l'hélice 44 du domaine 3' mineur descend tout le long du corps. Sa partie supérieure est appelée centre de décodage, et sera décrite plus loin. Les divers domaines de l'ARNr 16S ont des structures indépendantes. Cette indépendance structurale des domaines explique la flexibilité de la sous-unité 30S (Gabashvili et al., 1999a). Les protéines ribosomiques sont localisées à la périphérie de la sous-unité, principalement du côté du solvant. Les protéines dont la structure était déjà connue ont pu

Figure 1-11 : Structure de la sous-unité 30S de *Thermus thermophilus* déterminée par cristallographie aux rayons X. Les caractéristiques structurales de la sous-unité sont indiquées (tête, corps, plate-forme, épaule, bec, pied).

- A. Structure à une résolution de 3 Å obtenue par le groupe de Ramakrishnan (Wimberly et al., 2000, numéro d'accès PDB: 1FJF). L'ARNr 16S est coloré en bleu, et les protéines ribosomiques en rouge. La sous-unité est présentée vue de l'interface et vue du solvant. Cette image a été préparée avec le programme WebLab ViewerPro 4.0.
- B. Structure à une résolution de 3,3 Å obtenue par le groupe de Yonath (adapté de Schluzen et al., 2000). L'ARNr est coloré en orange et les protéines sont colorées de diverses couleurs. La sous-unité est présentée vue du solvant.

A



B

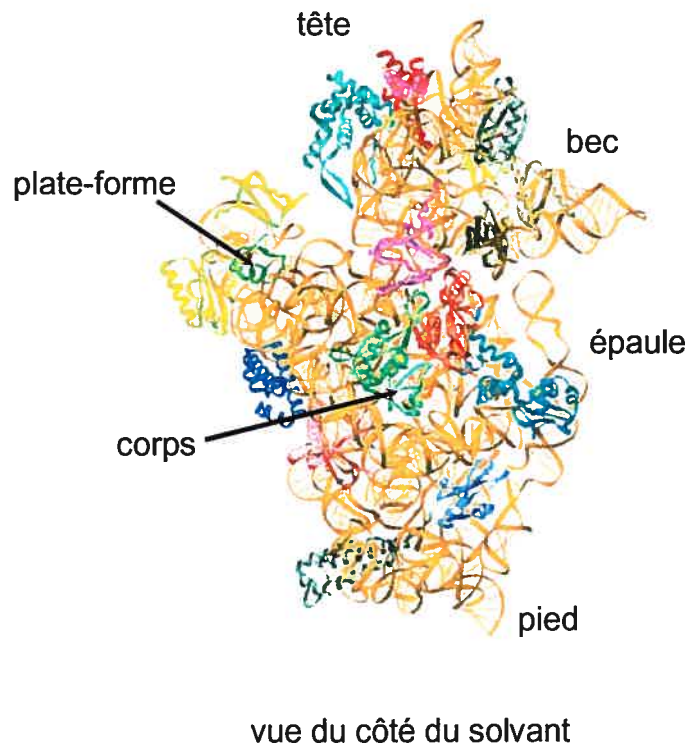
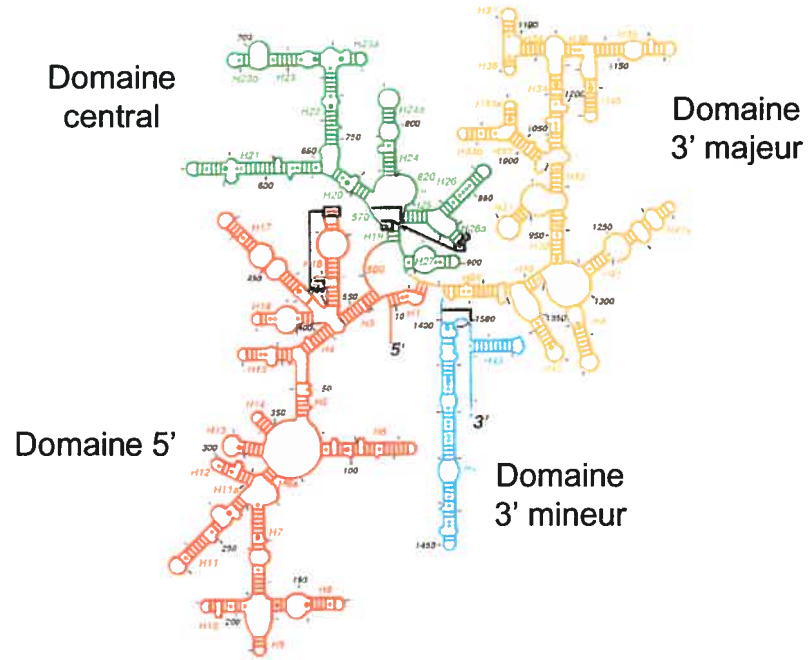


Figure 1-12 : Localisation des domaines de L'ARNr 16S dans la sous-unité 30S de *Thermus thermophilus* (adapté de Wimberly et al., 2000).

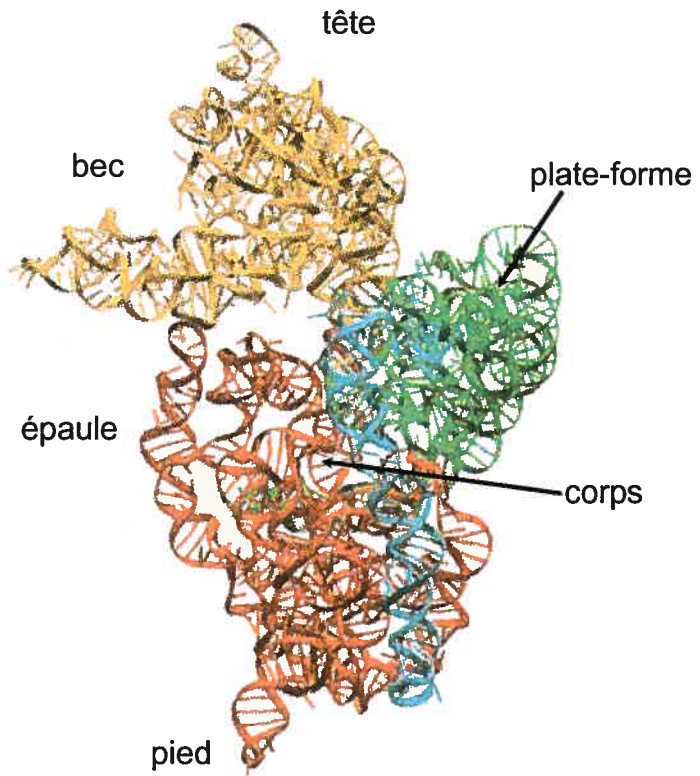
- A. Structure secondaire de l'ARNr 16S, avec les domaines colorés de différentes couleurs.

- B. Structure tridimensionnelle de l'ARNr 16S, avec les différents domaines colorés comme en A.

A



B



facilement être positionnées. Le positionnement des autres protéines a été facilité par les données de protection contre l'attaque d'agents chimiques, les données de pontage et les cartographies basées sur la diffraction des neutrons (Capel et al., 1987, voir section 1.1.2). La surface de la sous-unité 30S située du côté de l'interface avec la sous-unité 50S est constituée presque exclusivement d'ARN. C'est au niveau de l'interface qu'a lieu le décodage, ce qui confirme que ce sont principalement les ARNr qui assurent le fonctionnement du ribosome. Les protéines S12, S13 et S19 sont les seules protéines situées à l'interface entre les sous-unités. Les protéines S13 et S19 font partie de la tête, alors que S12 est située près du centre de décodage. Comme c'est le cas pour la sous-unité 50S, les protéines de la sous-unité 30S présentent des domaines globulaires, généralement positionnés à la surface de la sous-unité, avec des extensions basiques qui se faufilent vers l'intérieur en interagissant avec l'ARNr.

Dans les cristaux de sous-unités 30S du groupe de Ramakrishnan, la tige-boucle formant le pied d'une sous-unité 30S occupe le site P d'une autre sous-unité, imitant une tige-boucle anticodon occupant le site P (Carter et al., 2000). De plus, l'extrémité 3' de l'ARNr 16S imite un ARNm et forme des interactions Watson-Crick avec ce pied. Ces interactions permettent de voir quelles régions de l'ARNr 16S forment le site P de la sous-unité 30S. L'anticodon au site P interagit avec les nucléotides 1229-1230 et 1338-1341 dans le domaine 3' majeur. Des expériences de protection contre l'attaque par des agents chimiques avaient déjà montré que G1338 et A1339 interagissent avec l'ARNt au site P (Moazed & Noller, 1990). Le pied interagit aussi avec C1400 de l'hélice 44, en accord avec des données de pontages à l'UV (Prince et al., 1982) et avec A790 de l'hélice 24. Le codon au site P contacte le sillon majeur de la partie supérieure de l'hélice 44. La boucle anticodon de l'ARNt au site P est aussi en contact avec les extrémités C-terminales des protéines S9 et S13. Des expériences récentes ont montré que des délétions de ces extensions protéiques n'étaient pas létales, bien que les mutants poussent plus lentement (Hoang et al., 2004; Noller et al., 2005). Les mutants de délétion de S13 ont une affinité

réduite pour tous les ARNt, alors que les mutants de S9 ont une préférence pour certains ARNt, dont la séquence de la tige anticodon est similaire à celle de l'ARNt initiateur. La structure cristallographique montre aussi que le 2'OH du nucléotide +1 du codon au site P contacte le phosphate de C1498 et le phosphate du nucléotide +2 contacte le 2'OH de 1498. Quant à la position des ARNt aux sites A et E, elle a pu être déduite grâce à une structure cristallographique à faible résolution du ribosome 70S en complexe avec des ARNt (Cate et al., 1999). Le site A de la sous-unité 30S est plus large et moins profond que le site P, ce qui explique sa plus faible affinité pour les ARNt. Le site A est formé principalement des hélices 18 (aussi appelée tige-boucle 530), 31, 34 et 44 et de la protéine S12. De nombreuses expériences avaient déjà démontré l'implication de plusieurs de ces éléments dans la sélection des ARNt (revues par Green & Noller, 1997; Ogle & Ramakrishnan, 2004). En ce qui concerne le site E, il a la particularité d'être formé en partie de protéines ribosomiques, principalement S7 et S11. En résumé, les récentes structures cristallographiques de la sous-unité 30S confirment que l'ARNr contient les déterminants nécessaires à la fonction de décodage, alors que les protéines ribosomiques permettent probablement de moduler cette fonction.

Le groupe de Ramakrishnan a aussi publié la structure de la sous-unité 30S en présence d'antibiotiques, notamment la streptomycine, la paromomycine et la spectinomycine (Carter et al., 2000). On savait déjà que ces antibiotiques perturbent la fonction du ribosome en se liant à l'ARNr 16S (Gravel et al., 1987; Moazed & Noller, 1987; Spahn & Prescott, 1996). Ces nouvelles données structurales ont permis de localiser précisément leurs sites de liaison et d'expliquer leurs mécanismes d'action. La spectinomycine est une molécule plutôt rigide, formée de trois cycles fusionnés, qui inhibe l'étape de translocation (Wallace et al., 1979; Bilgin et al., 1990). Elle interagit avec les nucléotides G1064 et C1192 de l'hélice 34, dans la tête de la sous-unité 30S, ce qui est en accord avec les données de protections (Moazed & Noller, 1987) et de mutagenèse (Brink et al., 1994). Puisque la spectinomycine se lie près de la jonction entre la tête, le cou et le

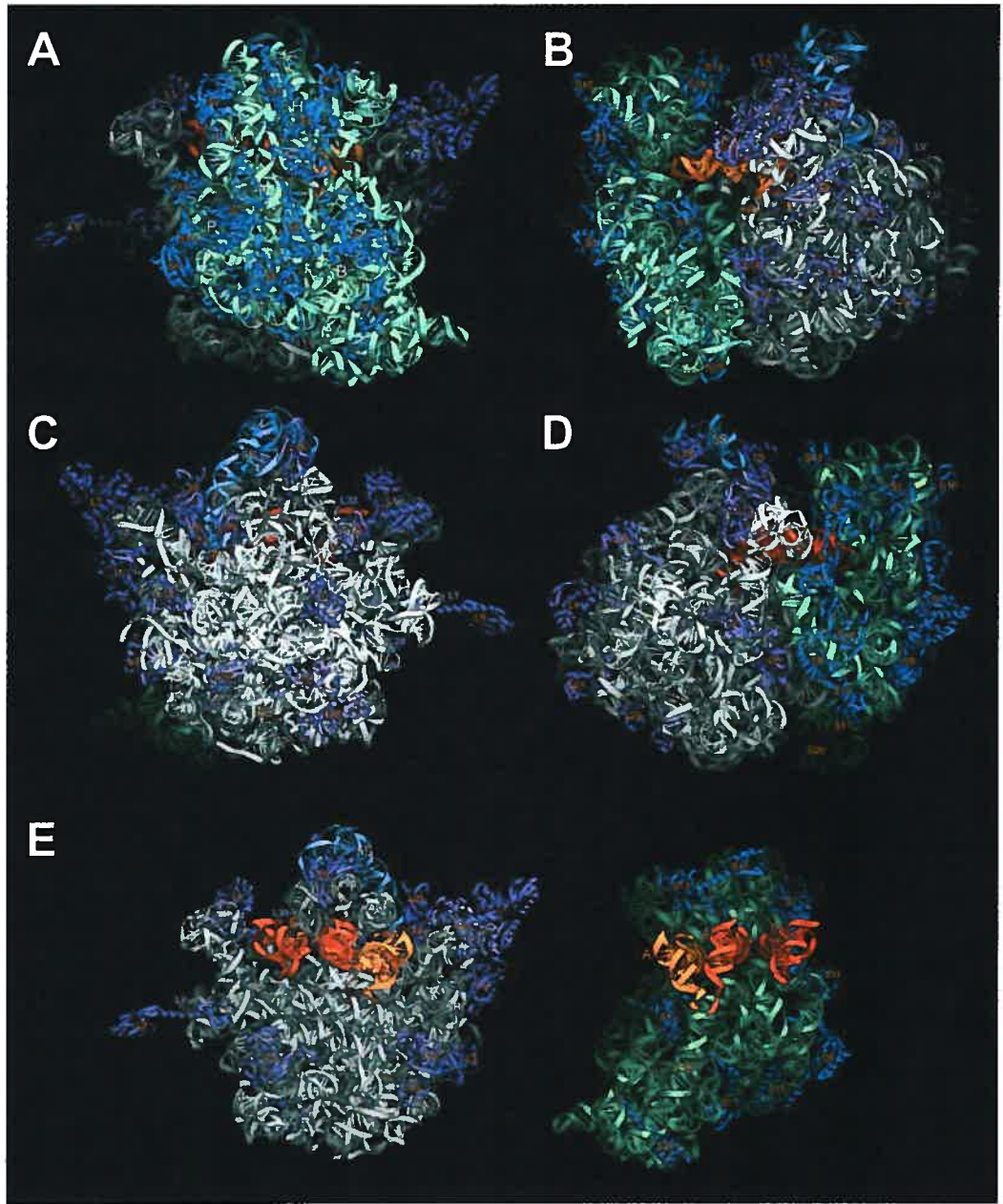
corps de la sous-unité 30S, il est proposé qu'elle bloque des mouvements de la tête lors de la translocation. La streptomycine est un antibiotique aminoglycosidé qui cause des erreurs de lecture lors de la sélection des aa-ARNt (Wallace et al., 1979). Elle interagit avec le résidu K45 de la protéine S12 et avec le ribose-phosphate de quatre régions différentes de l'ARNr 16S (les hélices 1, 18, 44 et la région 914). Ces interactions avec l'ARNr 16S sont supportées par des expériences de protection (Moazed & Noller, 1987), de pontage (Gravel et al., 1987) et de mutagenèse (Montandon et al., 1986; Melançon et al., 1988; Pinard et al., 1993). En ce qui concerne l'interaction avec la protéine S12, différentes mutations aux résidus L42 et L87 confèrent la résistance à la streptomycine et résultent en un phénotype d'hyper-précision (Gorini, 1971; Funatsu & Wittmann, 1972; Kurland et al., 1990). L'effet de la streptomycine sur le contrôle de la fidélité de traduction sera discuté en détail dans la section 1.4.2.1 qui traite de la sélection des aa-ARNt. La paromomycine est un autre antibiotique aminoglycosidé qui cause aussi des erreurs de lecture (Davies & Davis, 1968). Elle se lie dans le sillon majeur de l'hélice 44, ce qui était suggéré par des données de protection (Moazed & Noller, 1987) et de mutagenèse (De Stasio et al., 1989; revue par Spahn & Prescott, 1996). L'action principale de la paromomycine est de déplacer les bases de A1492 et de A1493 vers l'extérieur de l'hélice 44. Ce déplacement avait déjà été observé dans la structure par RMN de la paromomycine liée à un fragment de l'hélice 44 (Fourmy et al., 1996), mais il est plus important avec la sous-unité 30S entière. Les conséquences du déplacement des bases de A1492 et A1493 seront discutées dans la section 1.4.2.1. Outre les exemples présentés ici, les sites de liaisons de plusieurs autres antibiotiques ont été caractérisés par cristallographie, soit sur la sous-unité 30S (Brodersen et al., 2000; 2001; Pioletti et al., 2001), soit sur la sous-unité 50S (Schluenzen et al., 2001; Hansen et al., 2002a; Hansen et al., 2003). Ces structures apportent des informations importantes pour la compréhension du mécanisme d'action des antibiotiques et, à plus long terme, pour le développement de nouveaux agents antibiotiques.

1.2.2.3. Les structures cristallographiques du ribosome bactérien 70S

La structure cristallographique du ribosome 70S de *T. thermophilus* a initialement été déterminée à une résolution de 7,8 Å (Cate et al., 1999). Deux ans plus tard, la résolution fut améliorée à 5,5 Å (Yusupov et al., 2001). La structure obtenue à cette résolution est présentée à la Figure 1-13. Il s'agit en fait d'une combinaison de deux structures, l'une à une résolution de 5,5 Å, où le ribosome 70S est complexé avec un fragment d'ARNm et des ARNt aux sites P et E, et l'autre à une résolution de 7 Å, où le ribosome 70 est complexé à un ARNt au site A. La morphologie du ribosome est facilement reconnaissable. La protéine L1 qui n'était pas visible dans la structure de la sous-unité 50S de *H. marismortui* est maintenant visible. À une résolution de 5,5 Å, les hélices d'ARN sont également visibles et les protéines dont la structure cristalline est connue ont pu être positionnées. La structure des ARNr dans le ribosome 70S est généralement semblable à celle qu'il y a dans les sous-unités libres, mais avec quelques différences. Pour l'ARNr 16S, la différence la plus prononcée se situe au niveau du pied, au bas de la sous-unité 30S, qui est orienté dans un angle très différent. Les autres différences se situent dans l'hélice 44, dans le haut de la plate-forme et dans la tête. Toutes ces régions sont impliquées dans des interactions avec la sous-unité 50S, ce qui suggère que les différences observées résultent principalement de l'association entre les sous-unités. Pour l'ARNr 23S, plusieurs éléments qui n'étaient pas visibles dans la structure de *H. marismortui* sont visibles dans la structure du ribosome 70S, principalement les régions qui interagissent avec les protéines L1 et L11. Ces régions sont probablement stabilisées par l'association avec la sous-unité 30S. La plupart des différences conformationnelles entre la sous-unité 50S libre et associée se situent dans des régions phylogénétiquement variables. Ces différences sont localisées loin de l'interface et du centre actif, dans le bas de la sous-unité et du côté du solvant.

Figure 1-13 : Structure du ribosome 70S de *Thermus thermophilus* déterminée par cristallographie aux rayons X (adapté de Yusupov et al., 2001). L'ARNr 16S est coloré en cyan, l'ARNr 23S en gris et l'ARNr 5S en bleu pâle. Les protéines ribosomiques des sous-unités 30S et 50S sont colorées en bleu foncé et en magenta, respectivement.

- A. Ribosome vu du côté de la sous-unité 30S.
- B. Ribosome vu avec la sous-unité 30S à gauche et la sous-unité 50S à droite.
- C. Ribosome vu du côté de la sous-unité 50S.
- D. Ribosome vu avec la sous-unité 30S à droite et la sous-unité 50S à gauche.
- E. Les deux sous-unités vues de l'interface, montrant la position des ARNr aux sites A (jaune), P (orange) et E (rouge).



Malgré sa faible résolution comparativement à celles des sous-unités libres, la structure du ribosome 70S présente deux avantages importants: elle permet de voir les détails des interactions entre les sous-unités et elle permet de voir la position des ARNt et leurs interactions avec le ribosome. Les éléments qui forment les douze ponts entre les sous-unités ont été identifiés avec précision (Figure 1-14). Les douze ponts sont formés par une trentaine d'interactions individuelles, décrites en détail dans le Tableau 1-1. Il avait déjà été montré par des expériences d'attaque par des agents chimiques que la majorité de ces ponts impliquent les ARNr (Merryman et al., 1999a; 1999b), ce qui est confirmé par la structure cristallographique. Il y a aussi quelques interactions ARN-protéine et un pont protéine-protéine. Les interactions ARN-ARN sont localisées au centre des sous-unités et impliquent la plate-forme et l'hélice 44 de la sous-unité 30S et le domaine IV de l'ARNr 23S de la sous-unité 50S. Les interactions ARN-protéines sont localisées à la périphérie des sous-unités. Le pont B1b est le seul pont protéine-protéine et il implique la protéine S13 de la tête de la sous-unité 30S et la protéine L5 de la protubérance centrale de la sous-unité 50S. Ces structures du ribosome 70S ont aussi permis d'identifier les nombreux contacts entre le ribosome et les ARNt aux sites A, P et E. Il avait déjà été montré par des expériences de pontages et de protection que les ARNt interagissent principalement avec les ARNr (Moazed & Noller, 1986, 1989a; Doring et al., 1994; Joseph & Noller, 1996; Joseph et al., 1997). Les détails de ces interactions sont décrits dans le Tableau 1-2. La structure cristallographique montre que le ribosome interagit avec des résidus invariables des ARNt, afin d'assurer une interaction égale avec chaque type d'ARNt. La sous-unité 30S interagit avec la tige anticodon de chaque ARNt, alors que la sous-unité 50S interagit avec la tige acceptrice et le coude des ARNt. Le positionnement des ARNt est semblable à ce qui avait été observé par cryo-EM. Les boucles anticodons des ARNt aux sites A et P sont séparées de 10 Å. Cela est dû au fait que le messenger comporte une courbure qui forme un angle de 45° entre les codons aux sites A et P. Les extrémités des tiges acceptrices convergent vers la cavité peptidyltransférase. Les tiges anticodon des ARNt aux sites P et E sont proches, mais les extrémités de leurs tiges acceptrices sont séparées par plus de 50 Å.

Figure 1-14 : Ponts entre les sous-unités observés dans la structure cristallographique du ribosome 70S de *Thermus thermophilus* (adapté de Yusupov et al., 2001).

A. Structures secondaires des ARNr 23S et 16S, avec les régions impliquées dans les ponts indiquées en rouge.

B. Structure des sous-unités 50S (à droite) et 30S (à gauche) vues du côté de l'interface. Les numéros des ponts sont indiqués. Les régions impliquées dans des contacts ARN-ARN sont colorées en magenta et les régions impliquées dans des contacts protéine-ARN ou protéine-protéine sont colorées en jaune. Les ARNt aux sites A, P et E sont colorés en jaune, en orange et en rouge, respectivement.

pas clair

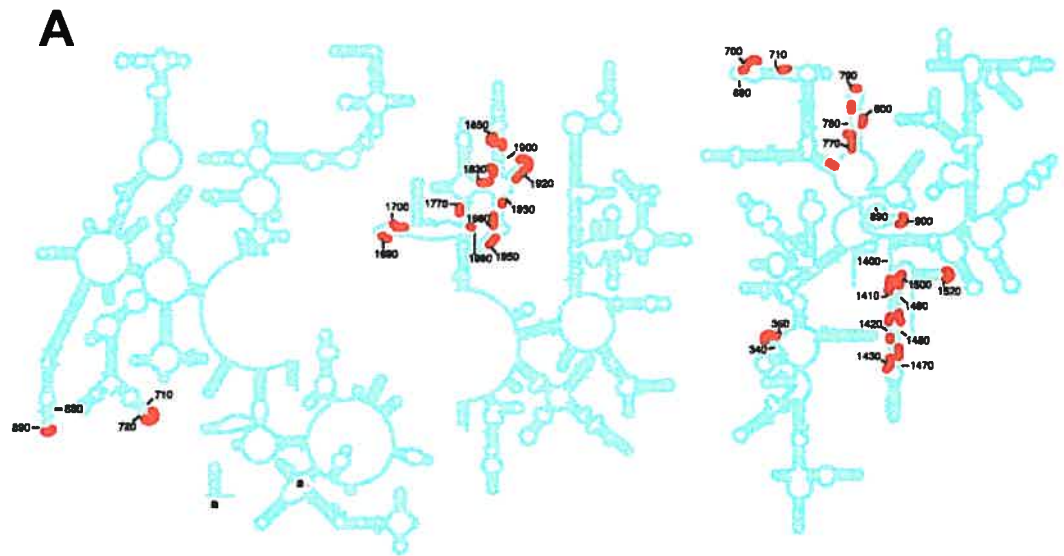


Tableau 1-1 : Détails des ponts entre les sous-unités ribosomiques, dans la structure cristallographique du ribosome 70S de *T. thermophilus* (adapté de Yusupov et al., 2001). Pour les hélices d'ARNr, il est indiqué si les interactions impliquent le sillon majeur (M) ou le sillon mineur (m), une boucle (B) ou le squelette ribose-phosphate (R).

Ponts	Types d'interactions	sous-unité 30S			sous-unité 50S		
		Hélices de l'ARNr ou protéines	Positions	Hélices de l'ARNr ou protéines	Positions	Hélices de l'ARNr ou protéines	
B1a	Prot-ARN	S13	92-94	H38(B)	866-888		
B1b	Prot-Prot	S13	N-term	L5	134-153		
B2a	ARN-ARN	H44(m)	1408-1410 1494-1495	H69(Bm)	1913-1914, 1918		
B2b	ARN-ARN ARN-ARN	H24(m,BM) H45(BM,Bm)	784-785, 794 1516-1519	H67(m), H69(M) H71(M), H69(R)	1836-1837, 1922 1919-1920, 1932		
B2c	ARN-ARN ARN-ARN	H24(Rm) H27(Rm)	770-771 900-901	H67(R) H67(R)	1832-1833 1832-1833		
B3	ARN-ARN	H44(m)	1484-1486	H71(m)	1947-1948, 1960-1961		
B4	ARN-ARN Prot-ARN	H20(m) S15	763-764 40-44, C-term	H34(Bm) H34(BR,BM)	717-718 713, 717		
B5	ARN-ARN ARN-Prot ARN-ARN ARN-ARN	H44(m) H44(R) H44(R) H44(R)	1418-1419 1420-1422 1474-1476 1474-1476	H64(m) L14 H62(Rm) H64(m)	1768-1769 44-49 1689-1690 1989		
B6	ARN-ARN ARN-Prot	H44(m) H44(R)	1429-1430, 1474-1476 1431	H62(m) L19	1689-1690, 1702-1705 (Hm24e:R44)		
B7a	ARN-ARN	H23(B,m)	698, 702	H68(m)	1848-1849, 1896		
B7b	ARN-Prot ARN-Prot	H23(M,m) H24(M,m)	712-713 773-776	L2 L2	162-164, 172-174, 177-178 177-178, 198-202		
B8	ARN-Prot	H14(BM)	345-347	L14	116-119		

Tableau 1-2 : Détails des interactions entre le ribosome et les ARNt aux sites A, P et E, dans la structure cristallographique du ribosome 70S de *T. thermophilus* (adapté de Yusupov et al., 2001). Les interactions sont classées par ordre de position sur l'ARNt : tige-boucle anticodon (AC), coude (tige-boucle D et tige-boucle T) et tige ou queue acceptrice (acc.). Pour chaque position des ARNt, il est indiqué si l'interaction implique le squelette ribose-phosphate (r), une base (b) ou une paire de bases (pb).

ARNt au site A		ARNt au site P		ARNt au site E	
ARNt	Ribosome	ARNt	Ribosome	ARNt	Ribosome
C-AC	34-45 b	530 b	16S (H30)	35-38 r	16S (H28)
C-AC	38 r	530 r	S13	34 r	16S (H28)
boucle AC	34 r	1054 b	16S (H42)	boucle AC	16S (H29)
tige AC	40 r	955 r		boucle AC	16S (H29)
tige AC	40-41 r	120-122		37-38 r	16S (boucle 790)
boucle AC	38 r	1483 r	16S (boucle 790)	37 b	16S (boucle 680)
			16S (boucle 965)	38-39 r	16S (boucle 680)
tige D	11-12	1914-1915	S9	37	S7
tige D	25-28	1913-1914	H44	boucle AC	S7
boucle D	17 b	881-882 r		boucle AC	2112-2113
boucle D	19 b	882-883 r	23S (H69)	boucle T	23S
boucle T	56 r	896-899 r	L5	boucle T	23S
tige T	50-53 r	2470-2472 r		tige T	L1
tige T	64-65 r	2482-2484 r		boucle T	L1
tige-boucle T	55, 62	27, 30	23S (H80)	boucle T	L1
			23S (boucle P)	tige acc.	1852-1853 b
tige acc.	72-73	1942-1943	23S (H53)	tige acc.	1882 r
queue acc.	74-76 r	2452, 2484 r	23S	tige acc.	1850-1853 r
queue acc.	75 b	2553 b		queue acc.	2235 r
				queue acc.	235 (H75)
				queue acc.	235 (H74)
				queue acc.	235 (H11)
				queue acc.	L33
					2433-2434
					199 b

1.3. Les motifs structuraux des ARN

La richesse structurale des ARN repose sur la diversité des appariements que les nucléotides peuvent former (revue par Westhof & Fritsch, 2000). Certaines combinaisons de paires de bases non Watson-Crick sont très abondantes et très conservées. Ce sont ce que l'on appelle des motifs structuraux. Depuis plusieurs années, l'étude de diverses structures d'ARN obtenues par cristallographie ou par RMN a permis d'observer un certain nombre de motifs structuraux, comme les diverses boucles coiffantes, le motif de G en saillie (*bulge-G motif*), l'empilement de purines entre deux brins (*cross-strand purine stack*) et le motif dit *kink-turn* (ou *K-turn*). Avec leurs tailles et complexités impressionnantes, les structures cristallographiques des sous-unités du ribosome ont été une mine d'or pour identifier des motifs d'interactions tertiaires entre des régions d'ARN distantes dans la structure secondaire. L'étude de ces structures a mené à la découverte de nouveaux motifs d'interaction tertiaires, comme le motif de type A-mineur et le motif d'interaction à récepteur GU. Les sections suivantes décrivent la structure et le rôle des motifs de structure secondaire et tertiaire les plus abondants.

1.3.1. Les motifs de structure secondaire des ARN

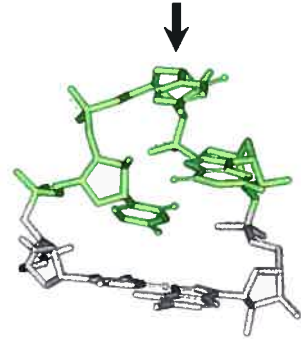
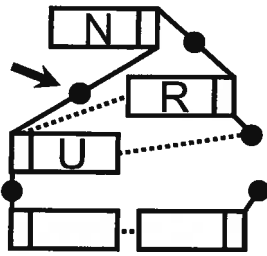
Les hélices d'ARN sont fermées par des boucles de tailles et de séquences variables. Ces boucles ont des structures compactes bien définies et plusieurs servent aussi de motif d'interaction ARN-ARN ou ARN-protéine. Les classes les plus répandues de boucles coiffant des hélices sont les motifs de virage en U (*U-turn*) et les tétraboucles (revues par Moore, 1999; Nowakowski & Tinoco, 1999). Le motif de virage en U a été identifié pour la première fois dans les boucles anticodon et T Ψ C des ARNt (Quigley & Rich, 1976) et a ensuite été observé dans une grande variété de structures d'ARN. Il s'agit d'un petit motif où l'orientation du squelette ribose-phosphate est subitement inversée, de manière à fermer

l'extrémité d'une hélice. La structure de ce motif est présentée à la Figure 1-15A. Ce motif a une séquence consensus UNR (N est n'importe quel nucléotide et R est une purine). Le groupe imino du U interagit avec le phosphate de la purine (R) et il peut y avoir une interaction entre le groupement 2'OH du U et le groupe N7 de la purine. La paire de bases adjacente à la boucle est généralement une paire Y•A, Y•Y ou G•A (Y est une pyrimidine), mais peut dans certains cas être une paire Watson-Crick (Campbell & Legault, 2005). Le nucléotide en 3' de cette paire n'est pas nécessairement adjacent à la boucle dans la séquence. Quant aux tétraboucles, il s'agit de boucles coiffantes de quatre nucléotides. L'analyse des séquences d'ARNr a permis de constater que les tétraboucles sont très fréquentes et on peut les classer en trois catégories, selon leur séquence consensus: GNRA, UNCG et CUNG (Woese et al., 1990). Dans les tétraboucles GNRA (Figure 1-15B), le G et le A forment une paire de bases non Watson-Crick G•A cisailée, ou *sheared* (paire *trans* ou la face Hoogsteen du A interagit avec le sillon mineur du G). Les bases N, R et A sont empilées du côté 3', avec les faces Watson-Crick dirigées vers l'extérieur. Ce motif est stabilisé par un pont hydrogène entre le N7 de la purine (R) en position 3 et le 2'OH du G en position 1. Ces tétraboucles sont généralement impliquées dans des interactions tertiaires ARN-ARN. Étant donné leur importance pour mon projet de recherche, les tétraboucles GNRA seront traitées en détail dans la section 1.3.3. Dans les tétraboucles UNCG (Figure 1-15C), le U à la position 1 et le G à la position 4 forment une paire de bases U•G *syn-anti*. Le C en position 3 est empilé sur le U et le groupe amino du C forme un pont hydrogène avec le phosphate du squelette ribose-phosphate situé entre les positions 1 et 2. La base variable en position 2 ne forme aucune interaction spécifique avec le reste de la tétraboucle. Les tétraboucles UNCG sont semblables aux tétraboucles GNRA et peuvent même les remplacer fonctionnellement dans certains cas (Selinger et al., 1993). Chez les tétraboucles CUNG (Figure 1-15D), les positions 1 et 4 forment une paire Watson-Crick, de sorte que l'on peut considérer cette boucle comme une boucle à deux nucléotides. Le U en position 2 est replié vers le sillon mineur de l'hélice et interagit avec la paire C-G de la boucle et avec la première paire de bases de l'hélice. La position 3 (N) ne forme aucune

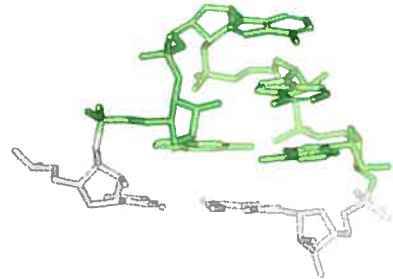
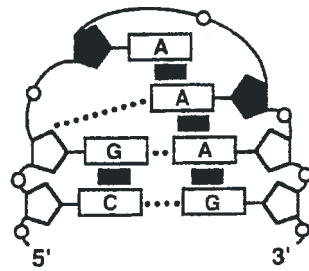
Figure 1-15 : Exemples de boucles coiffantes. Les panneaux de gauche montrent des représentations schématiques (adapté de Nowakowski & Tinoco, 1999; Gutell et al., 2000). Les ponts hydrogènes sont représentés par des lignes pointillées et les interactions d'empilement par des barres noires. Les panneaux de droite montrent des structures tridimensionnelles, avec les nucléotides des boucles en vert et ceux de la paire de bases adjacente en gris. Les images des structures tridimensionnelles ont été préparées avec le programme WebLab ViewerPro 4.0.

- A. Motif de virage en U. La position 3' de la paire adjacente ne suit pas nécessairement la boucle dans la séquence. La flèche indique l'endroit où a lieu le changement de direction du squelette ribose-phosphate. La structure tridimensionnelle est celle de la boucle TΨC de l'ARNt^{Phe} de la levure (Sussman et al., 1978, numéro d'accès PDB: 6TNA).
- B. Tétraboucles GNRA. Dans la représentation schématique, les riboses en noir ont une conformation 2' endo. La structure tridimensionnelle est celle d'une tétraboucle GAAA du ribozyme à tête de marteau (Pley et al., 1994, numéro d'accès PDB: 1HMH).
- C. Tétraboucle UNCG. Dans la représentation schématique, le G en gris a une conformation *syn*. La structure tridimensionnelle est celle d'une tétraboucle UUCG de l'hélice P1 de l'intron de groupe I de *Tetrahymena* (Allain & Varani, 1995, numéro d'accès PDB: 1HLX).
- D. Tétraboucle CUNG. La structure tridimensionnelle est celle d'une tétraboucle CUUG d'une tige-boucle synthétique, déterminée par RMN (Jucker & Pardi, 1995, numéro d'accès PDB: 1RNG).

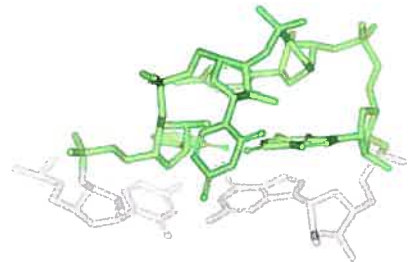
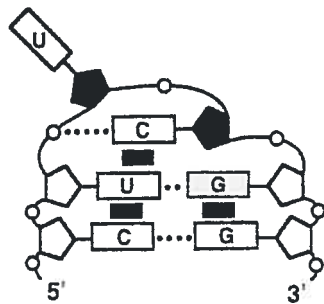
A



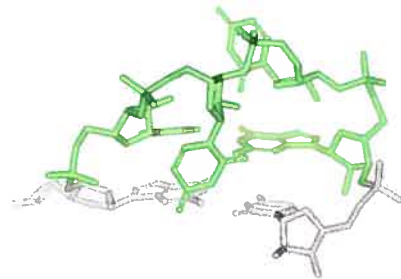
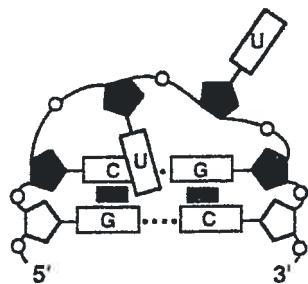
B



C



D

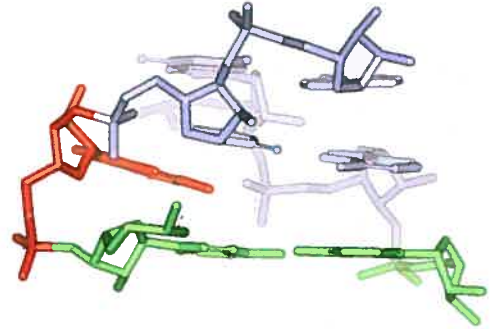
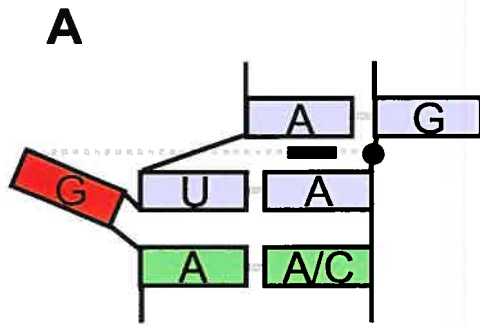


interaction spécifique avec le reste de la tétraboucle. Un motif formé d'une boucle de trois nucléotides flanquée d'une paire unique (*lonepair triloop*) a aussi été observé récemment à partir de l'analyse de co-variation de séquences d'ARNr et des structures cristallographiques du ribosome (Lee et al., 2003). Ces triboucles constituent généralement un motif de virage en U. La paire de bases flanquante est souvent non Watson-Crick et les nucléotides adjacents à cette paire de bases ne sont jamais appariés entre eux. Ces motifs de triboucles sont généralement impliqués dans des interactions tertiaires.

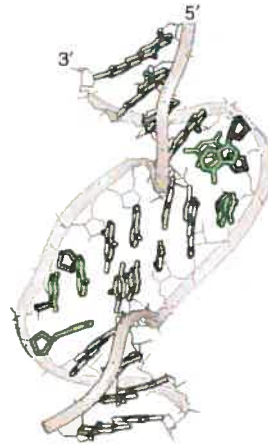
Tout comme les boucles coiffantes, les boucles internes présentent une grande variété de séquences et l'analyse des structures disponibles a permis de recenser plusieurs motifs fréquents. Un exemple est le motif appelé boucle E, car il a premièrement été identifié dans la boucle E de l'ARNr 5S eucaryote (Branch et al., 1985). La structure de cette boucle de l'ARNr 5S a été étudiée par RMN et par cristallographie (Wimberly et al., 1993; Correll et al., 1997). Ce motif est très fréquent dans les ARNr, surtout dans des régions impliquées dans des interactions ARN-protéine ou ARN-ARN (Leontis & Westhof, 1998). Un exemple de ce motif est retrouvé dans la boucle sarcine-ricine, dont la structure a été étudiée par RMN et par cristallographie aux rayons X (Szewczak et al., 1993; Szewczak & Moore, 1995; Correll et al., 1998; Correll et al., 2003). Tel que présenté à la Figure 1-16A, cette boucle E est en fait formée d'une combinaison de deux motifs différents : le motif d'empilement de purines entre des brins opposés (*cross-strand purine stack*) et le motif de G en saillie (*bulged-G motif*). En ce qui concerne les empilements de purines, il a été observé qu'un A s'empile toujours sur un autre A et un G sur un autre G. Le G en saillie est voisin d'une paire A•G *sheared* suivie d'une paire U•A *trans* Hoogsteen. Les A de ces deux paires forment le motif d'empilement entre les deux brins. De l'autre côté du G en saillie se trouve une paire A•A ou A•C. Le G en saillie est positionné dans le sillon majeur de l'hélice et son N1-H et NH₂ interagissent avec le phosphate du brin opposé, situé entre les nucléotides des deux paires de bases A•G et U•A. Notons que l'hélice 27 de l'ARNr 16S, qui est traitée en détail à la section 1.5, contient également un motif boucle E.

Figure 1-16 : Exemples de motifs de structure secondaire des ARN.

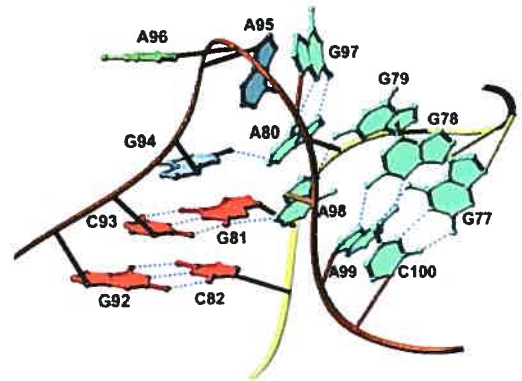
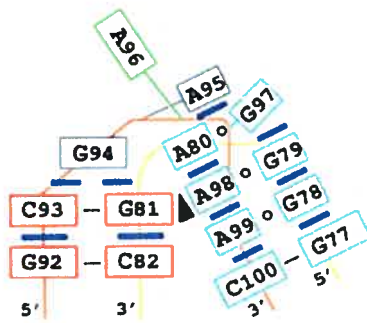
- A. Structure du motif boucle E, formé d'un motif de G en saillie et d'un motif d'empilement de purines entre deux brins. Le panneau de gauche montre une représentation schématique d'une portion de la tige-boucle sarcine-ricine. Les paires de bases non-Watson-Crick A•G et U•A sont colorées en bleu, le G en saillie est coloré en rouge et la paire de bases A•(A/C) est colorée en vert. Le pont hydrogène entre le G en saillie et le phosphate reliant le G et le A du brin opposé est représenté par une ligne pointillée. Les adénines en bleu forment un motif d'empilement entre deux brins. L'interaction d'empilement est représentée par une barre noire. Le panneau de droite présente la structure tridimensionnelle de la tige-boucle sarcine-ricine obtenue par RMN (Szewczak & Moore, 1995, numéro d'accès PDB: 1SCL). Cette image a été préparée avec le programme WebLab ViewerPro 4.0.
- B. Motif *bulge-helix-bulge* (adapté de Hermann & Patel, 2000). La structure secondaire est représentée à gauche et la structure tridimensionnelle à droite. Les bases en saillie sont colorées en vert.
- C. Motif dit *K-turn*. Structure du motif KT-7 de l'ARNr 23S (adapté de Klein et al., 2001). Le panneau de gauche montre une représentation schématique, avec les interactions d'empilement indiquées par des barres bleues et l'interaction de type A-mineur indiquée par un triangle noir. Le panneau de droite présente la structure tridimensionnelle.



B



C



Un motif formé d'une courte hélice flanquée de deux saillies, appelé motif *bulge-helix-bulge* (revues par Moore, 1999; Hermann & Patel, 2000) avait été découvert dans le site d'épissage d'un pré-ARNt (Diener & Moore, 1998). La structure de ce motif est présentée à la Figure 1-16B. La courte hélice comprise entre les deux saillies est presque perpendiculaire aux hélices flanquantes. Ce motif est surtout rencontré dans des interactions ARN-protéine. Un autre motif impliqué dans des interactions ARN-protéine est le motif appelé *K-turn*, découvert en étudiant la structure de la sous-unité 50S d'*H. marismortui* (Klein et al., 2001). Tel que présenté à la Figure 1-16C, ce motif est constitué d'une boucle interne asymétrique comportant généralement trois nucléotides sur l'un des brins et un ou aucun nucléotide sur l'autre brin. Cette boucle est flanquée par des paires G-C d'un côté et des paires G•A *sheared* de l'autre côté. Le squelette ribose phosphate présente une forte courbure au niveau de la boucle, de sorte que les deux hélices de part et d'autre de cette courbure forment un angle très aigu (environ 60°). Ces deux hélices interagissent ensemble via un motif A-mineur, où une adénine de l'une des hélices interagit avec le sillon mineur de l'autre hélice (le motif d'interaction A-mineur est décrit en détail dans la section suivante). En plus des six motifs *K-turns* observés dans l'ARNr 23S, on en trouve deux dans l'ARNr 16S et un dans l'ARNsn U4 du complexe d'épissage et dans l'ARNm de L30e de la levure (une protéine ribosomique qui n'a pas d'équivalent chez *E. coli*). Cinq des six motifs *K-turn* observés dans l'ARNr 23S interagissent avec des protéines ribosomiques et l'un d'eux participe également à une interaction tertiaire dans l'ARNr 23S. Ce motif possède une grande flexibilité lorsqu'il n'est pas lié par des protéines (Goody et al., 2004; Razga et al., 2004).

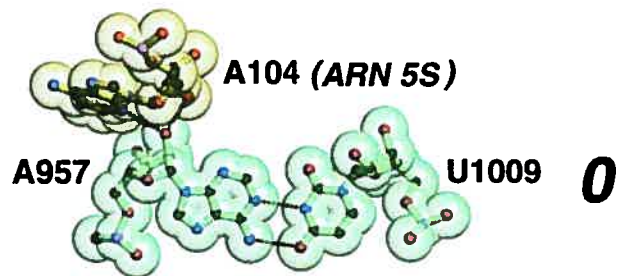
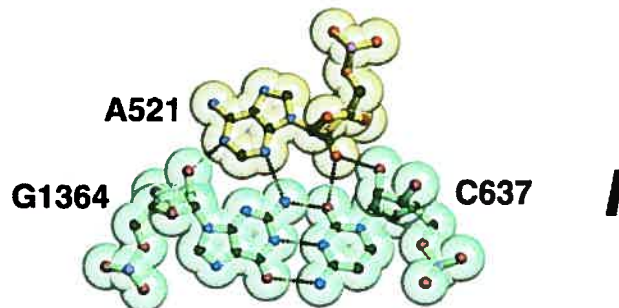
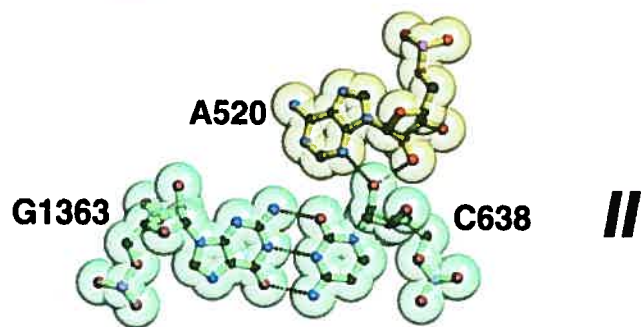
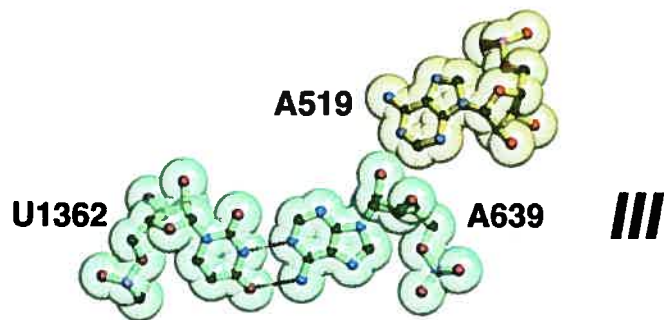
1.3.2. Les motifs d'interactions tertiaires

Lors de la formation de la structure tertiaire d'un ARN, les éléments de structure secondaire s'empilent pour former une structure globulaire. Le repliement tertiaire des

ARN est absolument dépendant de la présence d'ions métalliques, généralement d'ions magnésium (revue par Pyle, 2002). Le squelette ribose-phosphate des ARN présente une charge négative uniforme et les ions magnésium permettent le repliement tertiaire en neutralisant cette charge. Outre les interactions avec les ions magnésium, le repliement tertiaire des ARN est contrôlé par un grand nombre d'interactions tertiaires ARN-ARN. Cette section présente les principaux types de motifs d'interaction tertiaire, comme les motifs A-mineurs et les motifs à récepteurs GU. Étant donné leur importance pour mon projet de recherche, les interactions des tétraboucles GRNA sont traitées à part, dans la section suivante.

Un des motifs d'interactions tertiaires les plus communs est le motif A-mineur. Il avait été observé il y a longtemps que les portions non pairées dans les structures secondaires des ARN contiennent une proportion importante d'adénines très conservées (Ware et al., 1983; Gutell et al., 1993). L'analyse de la structure cristallographique de la sous-unité 50S de *H. marismortui* a montré que ces adénines sont en grande partie impliquées dans des types d'interactions baptisées motif A-mineur (Nissen et al., 2001). Ces motifs sont formés par une adénine qui interagit avec le sillon mineur d'une hélice d'ARN. Le ribose-phosphate de l'adénosine est positionné plus près de l'un des brins de l'hélice et l'orientation de ce brin est toujours antiparallèle au brin portant l'adénine. Il existe une grande variété dans la manière dont l'adénine interagit avec le sillon mineur de l'hélice. On peut classer les motifs A-mineurs en quatre catégories selon la position des atomes O2' et N3 de l'adénosine par rapport à l'atome O2' de la paire de bases de l'hélice (Figure 1-17). Dans le motif de type I, le O2' et le N3 de l'adénosine sont à l'intérieur du sillon mineur. Dans le type II, le N3 de l'adénosine est à l'intérieur du sillon, alors que son O2' est situé à l'extérieur. Dans le type III, le N3 et l'O2' de l'adénosine sont tous deux hors du sillon mineur. Dans le quatrième type, appelé type 0, le N3 de l'adénine est situé à l'extérieur du brin éloigné, de sorte que le sillon mineur interagit avec le ribose-phosphate de l'adénine. Selon les cas observés, le plan où se trouve l'adénine peut varier de 45° par

Figure 1-17 : Motif d'interaction A-mineur (adapté de Nissen et al., 2001). Les ponts hydrogènes sont représentés par des lignes pointillées. Les quatre types d'interactions A-mineur (III, II, I et 0) se distinguent par la position du 2'OH de l'adénosine par rapport aux 2'OH des nucléotides de la paire de bases avec laquelle elle interagit. Les motifs de type I, II et III présentés ici impliquent trois adénines consécutives dans l'ARNr 23S, interagissant avec le sillon mineur d'une hélice de l'ARNr 23S. Le motif de type 0 présenté ici implique une adénine de l'ARNr 5S interagissant avec le sillon mineur d'une paire de bases de l'ARNr 23S.



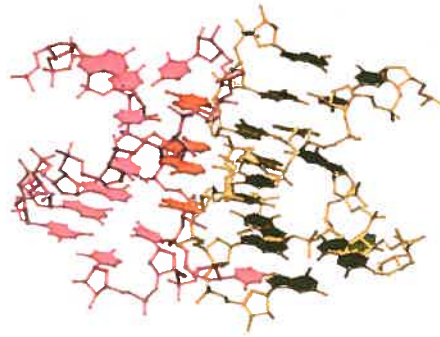
rapport au plan de la paire de bases avec laquelle elle interagit. L'adénine peut provenir d'une région non-pairée, d'une boucle coiffante ou même faire partie d'une paire de bases non Watson-Crick, telle G•A *sheared* ou U•A Hoogsteen inverse. Les motifs de type A-mineur sont souvent regroupés. Deux ou trois adénines consécutives sur un même brin peuvent s'empiler et former chacune des interactions avec des paires de bases consécutives d'une hélice. Généralement, la première adénine fera une interaction de type III, la deuxième une interaction de type II et la troisième une interaction de type I. Les interactions entre les tétraboucles GNRA et leurs récepteurs d'ARN sont des exemples de motifs A-mineurs. Pour les motifs A-mineur de type I et de type II, l'interaction entre l'adénine et la paire de bases est très spécifique. Une adénine a la forme et les groupements optimaux pour interagir avec un sillon mineur, particulièrement avec une paire de bases C-G (Doherty et al., 2001). Des études de mutagenèse dans un motif A-mineur du domaine P4-P6 de l'intron de groupe I de *Tetrahymena* ont montré que le remplacement de la paire de bases C-G par une autre paire de bases Watson-Crick avait peu d'effet sur la stabilité de l'interaction avec l'adénine, mais que la présence d'une paire de bases non Watson-Crick diminuait fortement la stabilité du motif A-mineur (Battle & Doudna, 2002).

L'analyse de la structure de la sous-unité 30S de *T. thermophilus* a permis d'identifier plusieurs types d'empilement entre des hélices d'ARN (Wimberly et al., 2000). Un type d'interaction très fréquent est l'empilement co-axial où deux hélices distinctes dans la structure secondaire sont empilées de façon verticale, de manière à former une seule tige. Pour imbriquer deux hélices, quatre types principaux d'interactions ont été observés. Dans chaque cas, l'interaction se fait via les sillons mineurs. Le type d'interaction le plus simple et le plus fréquent consiste à imbriquer les sillons mineurs de deux hélices (Figure 1-18A). L'une des hélices est souvent déformée par des bases non Watson-Crick ou des nucléotides en saillie. Ce type d'empaquetage est généralement stabilisé par des interactions de type A-mineurs. Un type d'interaction moins fréquent se fait par l'interaction de phosphates d'une hélice avec des groupements 2'OH et NH₂ dans le sillon mineur d'une autre hélice (Figure

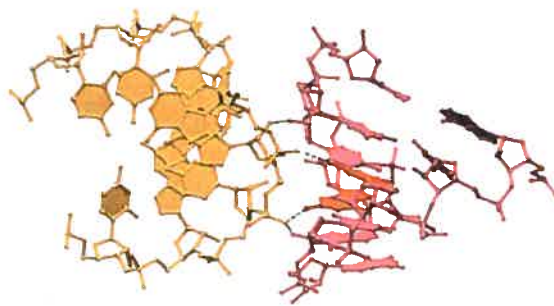
Figure 1-18 : Différents types d'empilement entre des hélices d'ARN.

- A. Interaction entre les sillons mineurs de deux hélices (adapté de Wimberly et al., 2000).
- B. Interaction d'un phosphate d'une hélice dans le sillon mineur d'une autre hélice (adapté de Wimberly et al., 2000).
- C. Motif d'interaction où une purine non appariée médie l'empilement perpendiculaire d'une hélice dans le sillon mineur d'une autre hélice (adapté de Wimberly et al., 2000).
- D. Motif à récepteur GU (adapté de Gagnon & Steinberg, 2002). Les flèches de couleurs représentent la direction 5'-3' du squelette ribose-phosphate (bleues pour la paire G-C, rouges pour la paire G•U). Les flèches noires illustrent le réseau de ponts hydrogènes entre les deux paires de bases.

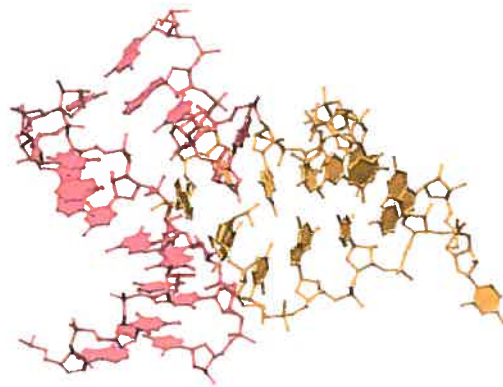
A



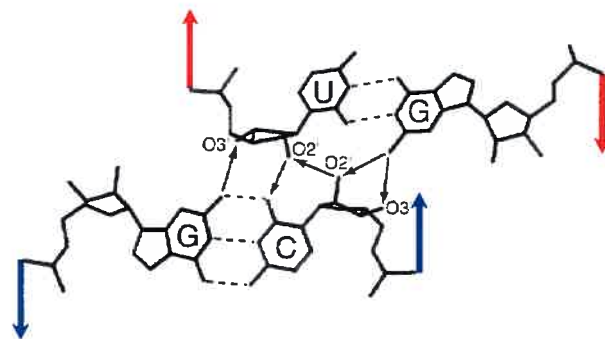
B



C



D



1-18B). Cette deuxième hélice contient souvent des paires de bases GU wobble qui rendent le groupement NH_2 de la guanine plus accessible. Dans le type d'empilement le plus rare, appelé *end-on packing*, une purine non appariée permet l'empilement perpendiculaire d'une hélice dans le sillon mineur d'une autre hélice (Figure 1-18C). Un type particulier d'interaction entre les sillons mineurs de deux hélices, appelé motif à récepteur GU (Figure 1-18D) a été découvert récemment (Gagnon & Steinberg, 2002). On retrouve quatre exemples de ce motif dans l'ARNr 16S et huit dans l'ARNr 23S. Dans ce motif, l'interaction entre les deux hélices se fait principalement via une paire de bases G•U d'une hélice et une paire Watson-Crick de l'autre hélice. Le U de la paire G•U est toujours positionné au centre du sillon mineur de l'autre hélice et le G à l'extérieur. L'interaction entre les deux paires de bases est stabilisée par un réseau de cinq ponts hydrogènes. Deux motifs de ce type sont impliqués dans l'interaction entre l'ARNr 23S et les ARNt aux sites P et E et il a été proposé que ces motifs jouent un rôle dans la translocation (Gagnon & Steinberg, 2002).

1.3.3. Les tétraboucles GNRA

Mon projet de recherche porte sur l'étude d'une tétraboucle GNRA de l'ARNr 16S et il est important de consacrer une section à ce type de tétraboucles. Les tétraboucles GNRA (où N est n'importe quel nucléotide et R est une purine) constituent un motif structural important, généralement impliqué dans des interactions ARN-ARN ou ARN-protéine (revues par Conn & Draper, 1998; Moore, 1999; Westhof & Fritsch, 2000). Plus de 50% des tétraboucles sont des tétraboucles GNRA (Woese et al., 1990). On connaît bien l'importance des tétraboucles GNRA pour le repliement et pour l'activité de plusieurs ARN, comme l'ARN de la RNase P (Pomeranz Krummel & Altman, 1999), les introns autocatalytiques (Jaeger et al., 1994; Murphy & Cech, 1994; Pomeranz Krummel &

Altman, 1999) et les sites d'initiation interne de la traduction (IRES) (Kaminski et al., 1994; Roberts & Belsham, 1997; Fernandez-Miragall & Martinez-Salas, 2003).

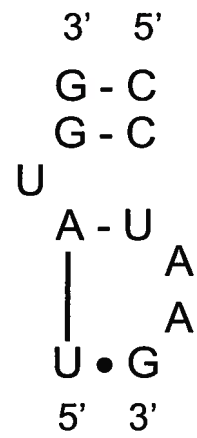
La structure du motif GNRA est connue depuis longtemps, grâce à la détermination par RMN des structures de tiges-boucles coiffées d'une tétraboucle GCAA ou GAAA (Heus & Pardi, 1991). Le G et le A du motif GNRA forment une paire de bases non Watson-Crick, généralement une G•A *sheared*. Les bases N, R et A sont empilées du côté 3' avec leur face Watson-Crick exposées au solvant. Le motif est stabilisé par un pont hydrogène entre le N7 de la purine en position 3 et le 2'OH de la guanosine en position 1. Cependant, les tétraboucles GNRA n'ont pas une conformation unique, mais alternent entre plusieurs conformations. Par exemple, Menger et al. (2000) ont introduit une 2-aminopurine (2AP) en position 2 ou 3 d'une tétraboucle GAAA. La 2AP est une molécule fluorescente, mais l'intensité de la fluorescence émise diminue lorsqu'elle participe à des interactions d'empilement. Menger et al. ont montré que la tétraboucle GAAA est en équilibre rapide entre plusieurs conformations qui diffèrent par le degré d'empilement des bases 2 et 3. Les deux formes principales seraient l'empilement 3', qui est la forme généralement observée dans les structures déterminées par RMN ou cristallographie, et l'empilement 5', où les bases sont empilées du côté 5', c'est-à-dire empilés sur le G1 plutôt que sur le A4. L'existence d'un équilibre entre ces deux formes avait été identifiée dans la boucle anticodon de l'ARNt^{Phe} (Labuda & Porschke, 1982; Bujalowski et al., 1986).

Le rôle principal des tétraboucles GNRA est de participer à des interactions ARN-ARN ou ARN-protéine, mais l'emphase sera mise sur les interactions ARN-ARN vu que mon projet de recherche s'intéresse à ce type d'interactions. Il a été observé que les hélices d'ARN coiffées par des tétraboucles GNRA ont une longueur conservée (Hedenstierna et al., 2000). Ceci est probablement dû au fait que les tétraboucles GNRA participent à des interactions qui imposent une contrainte sur la longueur des hélices qu'elles coiffent. L'analyse de séquences d'introns de groupe I avait suggéré que les tétraboucle GNRA

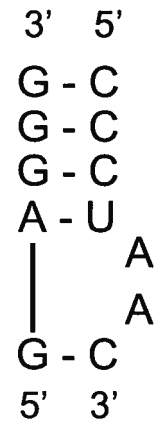
interagissent avec deux purines consécutives dans le sillon mineur d'une hélice d'ARN (Michel & Westhof, 1990). Les boucles GNAA peuvent interagir avec deux paires successives C-G alors que les boucles GNGA peuvent interagir avec une paire C-G suivie d'une paire U-A. Les hélices d'ARN avec lesquelles les tétraboucles GNRA interagissent sont appelées récepteurs. L'interaction entre une boucle GNRA et une hélice a été observée directement pour la première fois dans le cristal du ribozyme à tête de marteau (Pley et al., 1994). Les positions 3 et 4 d'une tétraboucle GAAA d'une molécule interagissaient avec deux paires C-G consécutives sur une autre molécule. Cette interaction était artificielle, car elle impliquait deux molécules voisines dans le cristal, mais elle démontrait néanmoins que les tétraboucles GNRA peuvent former des interactions ARN-ARN. La première interaction intramoléculaire fut observée peu après, dans la structure cristalline du domaine P4-P6 de l'intron de groupe I de *Tetrahymena* (Cate et al., 1996a). Dans ce cas, le récepteur n'est pas simplement constitué de deux paires de bases Watson-Crick, mais consiste en un motif asymétrique formé de 11 nucléotides, appelé motif 11-nt, dont la structure est présentée à la Figure 1-19A-B. Il avait déjà été observé que ce type de motif à 11 nucléotides est abondant dans les introns autocatalytiques de groupes I et II (Costa & Michel, 1995). Ce motif consiste en une hélice irrégulière, contenant un U en saillie et une structure particulière appelée plate-forme d'adénosines, formée par deux adénosines en saillie (Cate et al., 1996b). Ces deux adénosines sont positionnées côte à côte, de façon presque co-planaire, formant ainsi une plate-forme (Figure 1-19B). La paire de bases immédiatement sous la plate-forme est soit un G•U wobble ou un A•U non Watson-Crick. La structure du motif 11-nt est stabilisée par un ion potassium interagissant avec cette paire et les deux adénosines de la plate-forme (Basu et al., 1998). Les deux adénosines forment des interactions d'empilement avec les paires de bases voisines, mais une face de l'adénosine en 3' est libre. Ceci permet à la tétraboucle de venir s'y appuyer, avec le nucléotide en position 2 de la tétraboucle formant une interaction d'empilement avec l'adénosine 3' de la plate-forme (Figure 1-19B). Le même type d'interaction entre une tétraboucle et le récepteur 11-nt a été observé plus récemment dans la structure

Figure 1-19 : Interactions entre les tétraboucles GNRA et leurs récepteurs.

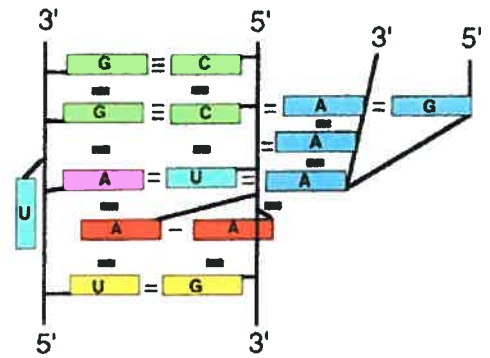
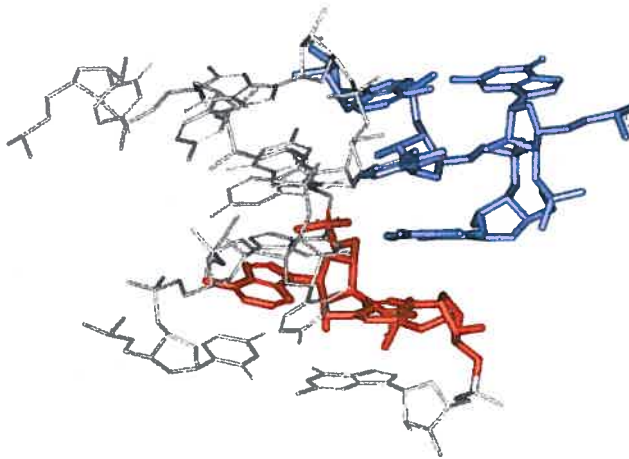
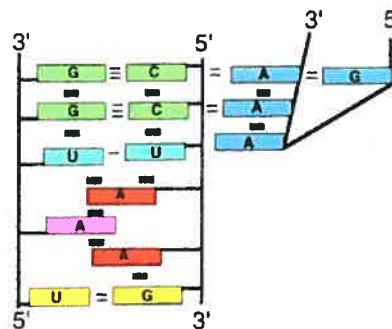
- A. Séquences consensus de deux types de récepteurs à tétraboucles GNRA : le motif 11-nt observé dans le domaine P4-P6 de l'intron de groupe I de *Tetrahymena* (Cate et al., 1996a) et le motif IC3 observé dans l'intron de groupe IC3 de l'ARNt^{Leu} d'une cyanobactérie (Ikawa et al., 1999).
- B. Interaction entre une tétraboucle GAAA et le récepteur 11-nt. À gauche, représentation schématique (adapté de Butcher et al., 1997). À droite, structure tridimensionnelle, provenant de la structure cristallographique du domaine P4-P6 de l'intron de groupe I de *Tetrahymena* (Cate et al., 1996a, numéro d'accès PDB: 1GID). La tétraboucle est colorée en bleu pâle et les deux adénosines du récepteur formant le motif plate-forme d'adénosines sont colorées en rouge. Les autres nucléotides du récepteur sont représentés en gris. Cette image a été préparée avec WebLab ViewerPro 4.0.
- C. Représentation schématique du récepteur 11-nt sous forme libre (adapté de Butcher et al., 1997). Tel qu'illustré, il est proposé que la tétraboucle se lie initialement à la forme libre du récepteur en interagissant avec les deux paires de bases G-C du haut (en vert).
- D. Représentation schématique de l'interaction entre la tétraboucle 900 et l'hélice 24 de l'ARNr 16S. La tétraboucle 900 s'arrime dans le sillon mineur de l'hélice 24. La majorité des contacts implique les positions C899 et A900 (encadrées) qui interagissent avec les positions encadrées de l'hélice 24. Les ribose-phosphates des positions en bleu interagissent avec l'ARNr 23S, formant le pont B2c.

A

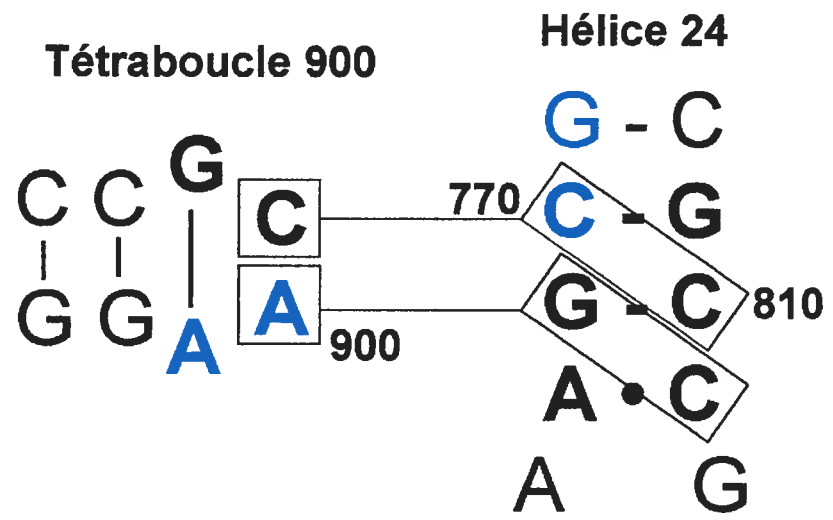
Motif 11-nt



Motif IC3

B**C**

D



cristallographique d'un intron de groupe I de la bactérie *Azoarcus* (Adams et al., 2004). La reconnaissance d'un récepteur de type 11-nt par une tétraboucle GAAA impliquerait un mécanisme d'ajustement induit. La structure du récepteur de 11 nucléotides du domaine P4-P6 de *Tetrahymena* a été étudiée par RMN sous forme isolée et la structure obtenue a été comparée à celle de la forme liée à la tétraboucle (Butcher et al., 1997). Sous forme libre, ce récepteur a une conformation très différente de celle qu'il adopte en présence de la tétraboucle GAAA (Figure 1-19C). Les deux adénosines voisines ne forment pas une plate-forme, mais participent plutôt à des empilements avec une adénosine du brin opposé. Cette étude suggère que l'interaction d'une tétraboucle avec son récepteur s'accompagne de changements conformationnels. Les auteurs proposent que la tétraboucle interagisse premièrement avec les deux paires de bases G-C du récepteur. Dans un deuxième temps, la tétraboucle glisserait d'une paire de bases vers le bas du motif et induirait la formation de la plate-forme d'adénosine. Finalement, un récepteur semblable au récepteur 11-nt a été découvert dans l'intron de groupe IC3 d'un ARN^{Leu} (Ikawa et al., 1999). Tel qu'illustré à la Figure 1-19A, ce motif appelé récepteur IC3 possède une paire G-C supplémentaire, ne possède pas de U en saillie et la paire de bases qui suit la plate-forme d'adénosines est une paire C-G au lieu de G•U. Contrairement au motif 11-nt, qui est très spécifique à la tétraboucle GAAA, le motif IC3 lie les tétraboucles GAAA, GUAA, GUGA et GAGA avec des affinités semblables.

Les tétraboucles GNRA sont faciles à identifier en analysant les structures secondaires des ARN, mais leurs récepteurs sont plus difficiles à identifier en absence de structure tridimensionnelle détaillée. La spécificité d'interaction de tétraboucles GUGA et GAAA fut étudiée en utilisant un système *in vitro* permettant de sélectionner des séquences d'ARN interagissant spécifiquement avec ces deux tétraboucles (Costa & Michel, 1997). Les récepteurs ainsi sélectionnés comprennent le motif à 11 nucléotides pour GAAA et les paires CU:AG pour GUGA. Les résultats montrent que les positions variables de la tétraboucle, particulièrement la position 2, déterminent la spécificité d'interaction des

tétraboucles GNRA avec les divers récepteurs. En résumé, il existe un grand nombre de récepteurs pouvant interagir avec les tétraboucles GNRA, avec des spécificités différentes. La comparaison de structures de tétraboucles GNRA de différentes séquences montre qu'elles ont des structures très semblables, mais avec quelques différences au niveau des ponts hydrogènes et de l'empilement des bases (Jucker et al., 1996). De plus, l'orientation des bases peut varier d'un angle de 48° entre les différentes tétraboucles GNRA (Correll & Swinger, 2003). Ces variations dans la structure des tétraboucles GNRA constitue un critère additionnel de spécificité pour l'interaction entre une tétraboucle et un récepteur.

Les tétraboucles GNRA n'interagissent pas qu'avec l'ARN. Dans certains cas, les tétraboucles GNRA participent à des interactions ARN-protéine. Par exemple, l'élément *boxB* de l'ARN du phage λ contient une tige coiffée d'une boucle à cinq nucléotides de séquence GAAGA. Cette tige-boucle interagit avec un facteur transcriptionnel appelé protéine N. La structure obtenue par RMN de cet ARN en complexe avec le fragment arginine-riche de la protéine N montre que quatre des cinq nucléotides de la pentaboucle forment un motif GNRA classique (Legault et al., 1998). Le G en position 4 est quant à lui positionné hors du motif GNRA et permet l'interaction de ce complexe ARN/protéine N avec le facteur cellulaire NusA. Abramovitz & Pyle (1997) avaient en effet montré qu'il est possible d'insérer des nucléotides dans la séquence d'une tétraboucle GAAA sans affecter son interaction avec son récepteur (dans ce cas, il s'agissait d'un récepteur ARN de type 11-nt). Également, le clivage d'un lien phosphodiester entre n'importe quelle position de la tétraboucle n'affecte presque pas cette interaction. Un autre exemple bien connu d'interaction GNRA-protéine est la toxine ricine qui reconnaît le domaine sarcine-ricine de l'ARNr 28S et clive le lien entre l'adénine et le ribose en position 4324 de la tétraboucle GAGA (Endo et al., 1987). Comme mentionné plus haut, la tige-boucle sarcine-ricine est impliquée dans la liaison des facteurs d'élongation. L'interaction de la ricine avec la tige sarcine-ricine est absolument dépendante de la tétraboucle GAGA qui la coiffe (Gluck et al., 1992) et des expériences de mutagenèse suggèrent que la tétraboucle GAGA est

impliquée dans la liaison des facteurs d'élongation (Tapprich & Dahlberg, 1990; Tapio & Isaksson, 1991).

Finalement, en ce qui concerne la tétraboucle 900 de l'ARNr 16S du ribosome, peu de choses étaient connues quand j'ai entamé mon projet de recherche. La séquence GCAA de cette tétraboucle est l'une des plus conservée de l'ARNr 16S, dénotant son importance fonctionnelle. Il était logique de supposer que cette tétraboucle adopte une structure semblable à celle des autres tétraboucles GNRA et qu'elle est impliquée dans des interactions avec d'autres régions des ARNr ou avec des protéines ribosomiques. Avant l'élucidation de la structure cristallographique du ribosome et de ses sous-unités, des données de protection contre des agents chimiques avaient suggéré que cette tétraboucle est impliquée dans un pont avec la sous-unité 50S (Merryman et al., 1999), mais il n'y avait aucune donnée permettant de proposer un partenaire potentiel pour cette tétraboucle. Les structures cristallographiques de la sous-unité 30S (Schluenzen et al., 2000; Wimberly et al., 2000) ont montré que la tétraboucle 900 forme effectivement un motif de type GNRA et qu'elle interagit avec la base de l'hélice 24 de l'ARNr 16S. La structure de ce récepteur est relativement simple, puisqu'il n'est formé que de deux paires Watson-Crick G-C (C770-G809 et G769-C810) et de la paire non Watson-Crick A768•C811, qui ferme l'hélice 24. L'interaction entre la tétraboucle 900 et son récepteur est schématisée à la Figure 1-19D. Les nucléotides C899 et A900 de la tétraboucle font des interactions de type A-mineur avec les paires de bases du récepteur. Ces interactions diffèrent des interactions classiques A-mineur, car les bases de la tétraboucle ne sont pas positionnées dans le même plan que les paires de bases du récepteur, de sorte que les nucléotides C899 et A900 interagissent chacun avec des groupements de deux paires de bases adjacentes. Les interactions entre la tétraboucle 900 et son récepteur sont présentées en détail dans le Chapitre II. La structure cristallographique du ribosome 70S a ensuite montré que le squelette ribose-phosphate des nucléotides 900-901 de la tétraboucle 900 et celui des nucléotides 770-771 de son récepteur sont impliqués dans des interactions avec les nucléotides 1832-1833 de l'ARNr 23S de la grande sous-unité (Yusupov et al., 2001). Cette interaction est appelée pont B2c (voir les sections 1.2.2.3 et 1.4.1.3 pour plus de détails sur les ponts entre les sous-unités).

1.4. Les étapes de la synthèse protéique

La traduction se divise en trois grandes étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Lors de l'initiation, le ribosome doit sélectionner correctement le codon initiateur d'un ARNm. Lors du cycle d'élongation, le ribosome décode l'un après l'autre les codons de l'ARNm en sélectionnant les aa-ARNt correspondants, puis il catalyse la formation du lien peptidique, ajoutant chaque nouvel acide aminé au peptide en croissance. La terminaison a lieu quand le ribosome rencontre l'un des codons de terminaison qui signalent la fin de la chaîne polypeptidique. La protéine nouvellement synthétisée est alors libérée du ribosome et les sous-unités ribosomiques quittent le messenger et se dissocient pour permettre au cycle de recommencer. Cette section résume nos connaissances sur chacune des étapes de la traduction.

1.4.1. L'initiation de la synthèse protéique

Lors de l'étape d'initiation, le ribosome et un ARNt initiateur chargé de méthionine formylée (fMet-ARNt^{fMet}) se positionnent au niveau du codon initiateur de l'ARNm à traduire (revues par Gualerzi et al., 2001; Laursen et al., 2005). La traduction d'un ARNm commence le plus souvent à un codon AUG, mais certains autres codons comme GUG, UUG et AUU sont parfois utilisés. Cette étape d'initiation fait intervenir trois facteurs (IF1, IF2 et IF3) qui aident à positionner correctement le ribosome et l'ARNt initiateur sur le site d'initiation de l'ARNm.

1.4.1.1. Le rôle des facteurs d'initiation

L'initiation de la traduction chez les bactéries débute avec une sous-unité 30S à laquelle se sont liés les trois facteurs d'initiations (revues par Gualerzi et al., 2001; Laursen et al., 2005). Il y a ensuite formation d'un complexe dit de pré-initiation entre la sous-unité 30S, un ARNm et le fMet-ARNt^{fMet} initiateur. L'ordre de liaison de l'ARNm et de l'ARNt initiateur est aléatoire. Des études cristallographiques montrent que le facteur IF1 occupe le site A de la sous-unité 30S (Carter et al., 2001). De plus, il interagit avec IF2 et augmente l'affinité de celui-ci pour la sous-unité 30S. Le facteur IF2 est une GTPase qui se lie à la sous-unité 30S sous sa forme liée au GTP. IF2 interagit avec l'ARNt initiateur, comme EF-Tu interagit avec les aa-ARNt (voir section 1.4.2), mais contrairement à EF-Tu, IF2 se lie à la sous-unité 30S avant d'interagir avec l'ARNt initiateur. L'ARNt initiateur a la particularité d'être le seul ARNt à venir se fixer au ribosome directement au site P. Des études récentes de protection contre l'attaque par le Fe(II)-EDTA et le Cu(II):1,10-orthophénantroline ont fourni des indications sur le positionnement de IF2 sur la sous-unité 30S (Marzi et al., 2003; Brandi et al., 2004). Ces réactifs ont été accrochés à des résidus cystéines introduits à diverses positions de IF2 et ils produisent des clivages dans les régions d'ARNr voisines en générant des radicaux libres. Sur l'ARNr 16S, les clivages sont localisés dans les hélices 3, 4 et 16-18, dans le corps de la sous-unité 30S, près de l'épaule. Quant au facteur IF3, il empêche les ARNt autres que l'ARNt initiateur de se lier au site P, en plus d'empêcher l'association avec la sous-unité 50S. Il existe plusieurs données contradictoires concernant la position de IF3 sur la sous-unité 30S. Selon des expériences de cryo-EM, IF3 se lierait du côté de l'interface, au niveau du site E, près du cou et de la plate-forme de la sous-unité 30S (McCutcheon et al., 1999). Des données de protection contre l'attaque par des radicaux hydroxyles confirment le positionnement du domaine C-terminal de IF-3, mais non du domaine N-terminal (Dallas & Noller, 2001). Ces résultats de cryo-EM sont toutefois en contradiction avec l'analyse de la structure cristallographique qui place le domaine C-terminal de IF3 au niveau de la plate-forme, mais du côté extérieur

de la sous-unité 30S (Pioletti et al., 2001). Cette structure a été obtenue avec des cristaux de sous-unité 30S libres, imbibés avec une solution contenant le facteur IF-3 et ce procédé peut conduire à des interactions non fonctionnelles. Il a également été suggéré que les deux positionnements d'IF3 correspondent à deux états fonctionnels distincts lors de l'initiation (revue par Yonath & Bashan, 2004).

Suite à la formation du complexe de pré-initiation entre la sous-unité 30S, l'ARNm et l'ARNt initiateur, il y a interaction entre l'anticodon de l'ARNt initiateur et le codon initiateur de l'ARNm. Cette interaction provoque un changement de conformation du complexe de pré-initiation, qui permet l'association de la sous-unité 30S avec la sous-unité 50S et le départ des facteurs IF1 et IF3. Le départ de IF1 libère le site A et affaiblit l'interaction de IF2 avec le ribosome. Les expériences de clivages par des radicaux libres mentionnées plus haut ont montré que IF2 interagit non seulement avec l'ARNr 16S, mais aussi avec l'hélice 43 du domaine II de l'ARNr 23S et avec l'hélice 89 du domaine V (Marzi et al., 2003). La position de IF2 sur le ribosome est similaire à celle qu'occupent les facteurs d'élongation (voir section 1.4.2). En effet, il a été montré que IF2 et EF-G compétitionnent pour se lier sur le ribosome (Cameron et al., 2002). La liaison de la sous-unité 50S au complexe d'initiation active la fonction GTPasique de IF2 et déclenche l'hydrolyse du GTP. Le rôle de l'activité GTPase de IF2 n'est pas clairement défini. Cette activité n'est pas requise pour le positionnement de l'ARNt initiateur, ni pour la relâche de IF2 (Tomsic et al., 2000). Cependant, cette activité GTPase est nécessaire à la croissance cellulaire (Laursen et al., 2003) et, lors d'un stress, la cellule peut produire des molécules de guanosine-5'-diphosphate-3'-diphosphate (ppGpp), qui ont la propriété d'inactiver IF2 en se liant à la place du GTP (Gualerzi et al., 2001). Il est donc possible que le site de liaison au GTP de IF2 serve de senseur métabolique permettant de moduler l'activité de ce facteur. Suite à l'hydrolyse du GTP par IF2, ce facteur quitte le ribosome, laissant la place au facteur EF-Tu qui apportera les aa-ARNt durant l'étape d'élongation.

1.4.1.2. La liaison de l'ARNm au ribosome et la sélection du site d'initiation

Tel que représenté à la Figure 1-20, l'ARNm est enroulé autour du cou de la sous-unité 30S, et il se faufile à travers deux tunnels : un tunnel d'entrée formé par des contacts non covalents entre la tête et l'épaule, et un tunnel de sortie formé par des contacts entre la tête et la plate-forme (Culver, 2001; Yusupova et al., 2001). On sait que les tunnels d'entrée et de sortie doivent s'ouvrir lors de la liaison du messenger, car l'initiation peut avoir lieu sur des ARNm circulaires (Bretscher, 1968a). Les protéines S7 et S11 ont été impliquées dans ce phénomène d'ouverture des tunnels. Le tunnel de sortie de l'ARNm est formé par l'interaction entre S7, positionnée dans la tête de la sous-unité 30S et S11, positionnée dans la plate-forme. Des mutations qui perturbent cette interaction facilitent la liaison de l'ARNm à la sous-unité 30S (Robert & Brakier-Gingras, 2003). Des études de cryo-EM décrites dans les prochaines sections ont montré que les tunnels sont sujets à des changements de conformation lors de la traduction (Gabashvili et al., 1999b; Frank & Agrawal, 2000; Gilbert et al., 2004).

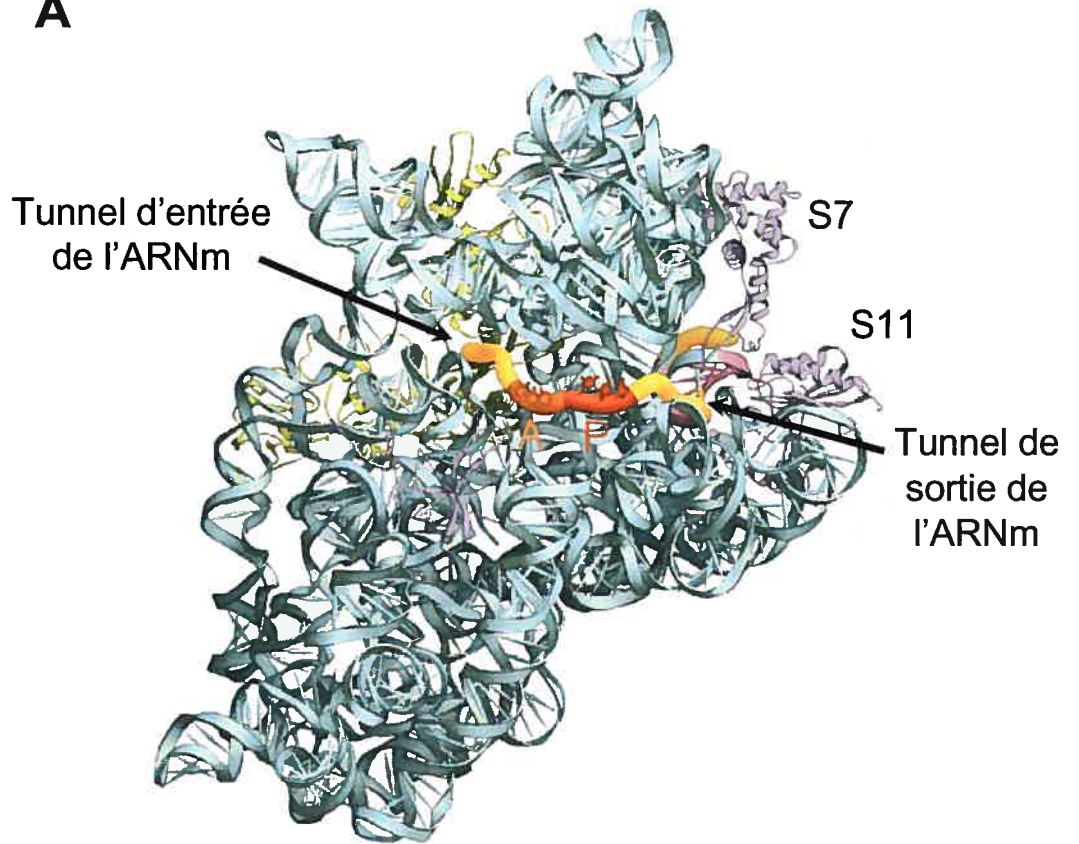
Le positionnement de la sous-unité 30S sur l'ARNm est contrôlé par une séquence riche en purines, généralement située 7 à 9 nucléotides en 5' d'un codon AUG initiateur. Cette séquence appelée séquence Shine-Dalgarno est complémentaire à la séquence anti-Shine-Dalgarno située en 3' de l'ARNr 16S (Shine & Dalgarno, 1974). L'existence de l'interaction entre ces deux séquences, appelée interaction Shine-Dalgarno, a été démontrée par des expériences de protection aux nucléases (Steitz & Jakes, 1975) et par des expériences de mutagenèse, où les deux séquences complémentaires sont mutées de façon à conserver ou à perturber leur complémentarité (Hui & de Boer, 1987; Jacob et al., 1987; Lee et al., 1996). La séquence Shine-Dalgarno est l'un des points de contrôle importants de la traduction. Il a été montré que certaines séquences anti-Shine-Dalgarno mutantes causent un effet létal dominant, probablement en augmentant la traduction de certains ARNm ayant

Figure 1-20 : Positionnement de l'ARN messenger au niveau du cou de la sous-unité 30S, tel qu'observé dans la structure cristallographique du ribosome 70S (adapté de Culver, 2001).

- A. Vue d'ensemble de la sous-unité 30S. Les codons du messenger localisés aux sites A et P sont colorés en orange et en rouge, respectivement. Les portions de l'ARNm et de l'ARNr 16S qui participent à l'interaction de Shine-Dalgarno sont colorées en rose. Les tunnels d'entrée et de sortie de l'ARNm sont indiqués. Les protéines S7 et S11, situées au niveau du tunnel de sortie, sont aussi indiquées.

- B. Agrandissement de la région entourant l'ARNm.

A



B



habituellement un faible niveau de traduction (Lee et al., 1996). Cependant, il n'y a qu'une faible corrélation entre la stabilité de l'interaction Shine-Dalgarno et l'efficacité d'initiation (Ringquist et al., 1992; Lee et al., 1996). En effet, les ARNm dont le niveau de traduction est faible ont souvent une interaction Shine-Dalgarno faible, mais l'inverse n'est pas toujours vrai. L'accessibilité des séquences Shine-Dalgarno est aussi un facteur qui influence l'efficacité de l'initiation. Des structures secondaires qui masquent la séquence Shine-Dalgarno de certains ARNm diminuent l'efficacité de l'initiation de la traduction de ces messager (Lesage et al., 1992; de Smit & van Duin, 1994).

La séquence Shine-Dalgarno n'est pas le seul élément important pour le positionnement du ribosome au niveau du codon initiateur. Les bactéries et les archaebactéries contiennent un certain nombre d'ARNm dont la séquence débute directement au codon initiateur et qui n'ont donc pas de séquence Shine-Dalgarno (revue par Moll et al., 2002). De plus, il a été montré que l'interaction Shine-Dalgarno n'est pas indispensable pour l'initiation de la traduction *in vitro* (Calogero et al., 1988; Melançon et al., 1990). Comment s'effectue la sélection du codon initiateur dans ces cas? La réponse n'est pas claire, mais il y a d'autres éléments dans la séquence des ARNm qui stimulent l'initiation. Deux exemples bien connus sont la séquence dite *Downstream Box* (DB), localisée à une quinzaine de nucléotides en aval du site d'initiation de certains ARNm (Sprengart et al., 1990) et la séquence Epsilon découverte en amont de la séquence Shine-Dalgarno sur le gène 10 du phage T7 (Olins & Rangwala, 1989). Ces séquences présentent une complémentarité avec des régions de l'ARNr 16S et il avait été proposé qu'elles participent à des interactions semblables à l'interaction Shine-Dalgarno. Cependant, aucune interaction fonctionnelle n'a pu être détectée expérimentalement entre l'ARNr 16S et les séquences DB et Epsilon (O'Connor et al., 1999; La Teana et al., 2000; Moll et al., 2001; O'Connor & Dahlberg, 2001) et il n'est pas clair par quel mécanisme ces séquences stimulent l'initiation de la traduction. La protéine S1 est un autre élément important pour l'initiation (Subramanian, 1983; Tzareva et al., 1994; Komarova et al., 2002). La protéine

S1 n'est pas présente dans les structures cristallographiques actuelles, mais elle a pu être localisée par cryo-EM (Sengupta et al., 2001). Elle est située du côté du solvant, à la jonction entre la tête, la plate-forme et le corps et elle interagit avec le messager, immédiatement en amont de la séquence Shine-Dalgarno. Des expériences précédentes avaient effectivement montré que la protéine S1 interagit avec une séquence riche en U en amont de la séquence Shine-Dalgarno du messager (Boni et al., 1991).

1.4.1.3. La formation des ponts entre les sous-unités ribosomiques

Dans les dernières étapes de l'initiation, la sous-unité 50S s'associe à la sous-unité 30S, ce qui implique la formation d'un réseau complexe d'interactions. La dynamique de ces ponts entre les sous-unités est particulièrement importante pour mon projet de recherche, puisqu'il porte sur une région impliquée dans l'un de ces ponts, appelé pont B2c. Des expériences antérieures aux récentes structures cristallographiques du ribosome avaient montré que plusieurs régions de l'ARNr étaient protégées contre l'attaque par des agents chimiques lors de l'association (Chapman & Noller, 1977; Merryman et al., 1999a; Merryman et al., 1999b). Ceci a permis d'identifier les régions des ARNr qui participent à la formation des ponts. Des expériences de pontages avaient aussi permis de déterminer des relations de voisinages entre les ARNr 16S et 23S lors de l'association (Mitchell et al., 1992). Les ponts ont ensuite été observés directement par cryo-EM (Frank et al., 1995; Gabashvili et al., 2000), puis par cristallographie aux rayons X (Cate et al., 1999; Yusupov et al., 2001).

La structure cristallographique du ribosome 70S a permis de voir les détails des ponts, mais cette structure représente une image statique du ribosome. Peu de choses sont connues sur la manière dont ces ponts se forment lors de l'association des sous-unités et sur leur

dynamique lors du cycle d'élongation. On sait depuis longtemps que la cinétique de l'association des sous-unités est fortement dépendante de la concentration en ions Mg^{2+} (Wishnia et al., 1975; Wishnia & Boussert, 1977). *In vitro*, l'association est optimale à partir d'une concentration de Mg^{2+} de 10 mM, alors que les sous-unités sont complètement dissociées à 2 mM de Mg^{2+} . La cinétique de l'association des sous-unités ribosomique montre qu'un changement conformationnel est l'étape limitante de cette réaction (Blaha et al., 2002). L'énergie d'activation de ce changement est très élevée (78 kJ/mol), et cette énergie est nécessaire pour l'activation de la sous-unité 30S exclusivement. En effet, tel que décrit plus haut, la petite sous-unité est plus flexible et peut adopter une plus grande variété de conformations que la grande sous-unité (Gabashvili et al., 1999a; 2003). Des expériences dites d'interférence ont été effectuées, où des sous-unités 50S traitées au DMS étaient sélectionnées pour leur capacité à s'associer aux sous-unités 30S (Maivali & Remme, 2004). Ces expériences ont montré que la modification du nucléotide 715 dans l'hélice 34 et des nucléotides 1912 et 1918 dans l'hélice 69 de l'ARNr 23S inhibaient drastiquement l'association. Ces deux régions participent respectivement aux ponts B2a et B4, ce qui montre que ces ponts sont particulièrement importants pour l'association. Dans une autre étude récente (Hennelly et al., 2005), la formation des ponts a été analysée par des expériences de modification chimique avec un appareil de *quench-flow*. Le réactif DMS est ajouté très rapidement à des sous-unités ribosomiques en cours d'association et la réaction est arrêtée à différents temps. Ceci permet de sonder l'exposition de certains nucléotides pour une période de temps de l'ordre des millisecondes, pendant que la réaction d'association se produit. Cette étude démontre que les ponts entre les sous-unités se forment de manière hiérarchique. Les ponts B2a et B2c, qui impliquent respectivement l'hélice 44 et la tétraboucle 900 de l'ARNr 16S se forment immédiatement, suivis par le pont B5, un autre pont impliquant l'hélice 44 de l'ARNr 16S. La formation des premiers ponts entraîne probablement des changements de conformation qui permettent la formation des autres ponts. Les expériences de Maivali & Remme montraient que le pont B4 est important pour l'association, mais il n'est pas parmi les premiers ponts à se former. La

Figure 1-21 présente la disposition ainsi que la conservation des ponts entre les sous-unités ribosomiques (Mears et al., 2002). Comme on le voit sur cette figure, les ponts B2c et B2a qui amorcent le processus d'association des sous-unités sont localisés au centre des deux sous-unités et ce sont aussi deux des ponts les plus conservés.

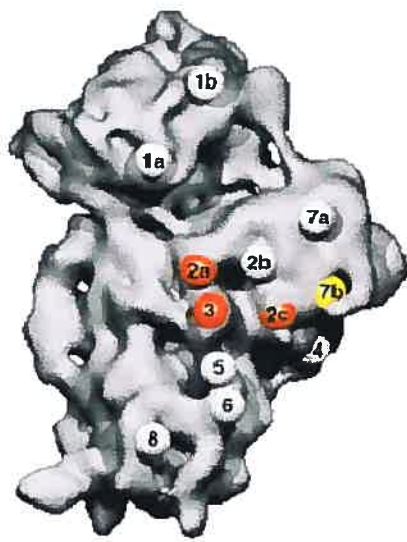
1.4.2. Le cycle d'élongation

Une fois l'initiation terminée, le ribosome est prêt à commencer l'étape d'élongation qui constitue la traduction proprement dite. Au cours de cette étape, le ribosome décode séquentiellement chacun des codons qui suivent le codon initiateur sur l'ARNm et synthétise le polypeptide correspondant. L'étape d'élongation est un cycle où trois sous-étapes se répètent pour chacun des codons. La première sous-étape est la sélection de l'aa-ARNt correspondant au codon de l'ARNm au site A du ribosome. Une fois que l'aa-ARNt est accepté et accommodé au site A, la deuxième sous-étape consiste à catalyser le transfert de la chaîne polypeptidique portée par le pept-ARNt au site P sur l'aa-ARNt au site A. La troisième et dernière sous-étape du cycle d'élongation est la translocation, où l'ARNt désacylé est déplacé du site P vers le site E et le nouveau pept-ARNt est déplacé du site A vers le site P.

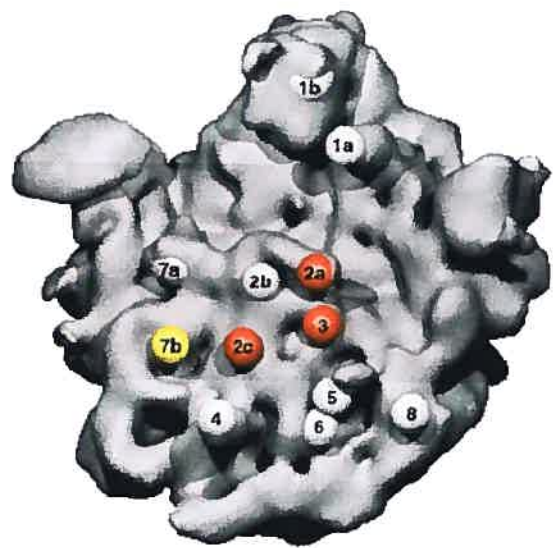
1.4.2.1. La sélection des aa-ARNt

L'une des étapes les plus importantes de la traduction est naturellement la sélection des aa-ARNt correspondant aux codons du messenger. L'efficacité remarquable du ribosome repose sur un équilibre entre la rapidité et la précision de cette sélection. Les deux sections suivantes décrivent nos connaissances sur le processus de sélection des aa-ARNt. La

Figure 1-21 : Conservation des ponts entre les sous-unités (adapté de Mears et al., 2002). Les ponts indiqués en gris sont conservés dans les trois domaines phylogénétiques, mais non dans les organelles. Les trois ponts représentés en rouge (B2a, B2c et B3) sont présents dans au moins 95% des séquences des trois domaines phylogénétiques (eubactéries, archaebactéries et eucaryotes) et des organelles. La conservation du pont B7b indiqué en jaune est incertaine.



sous-unité 30S



sous-unité 50S

première section décrit les étapes de ce processus d'un point de vue cinétique et la deuxième section présente les bases structurales de la sélection des aa-ARNt.

1.4.2.1.1. Les étapes de la sélection des aa-ARNt

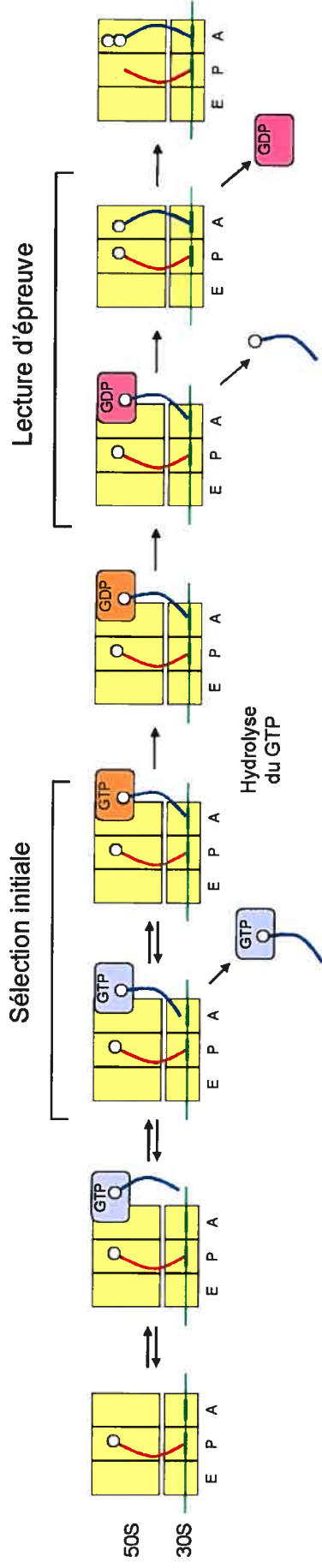
Après l'étape d'initiation de la traduction, le site P du ribosome porte le fMet-ARNt^{fMet} initiateur et son site A est vide, prêt à recevoir un aa-ARNt. Les aa-ARNt arrivent au ribosome sous forme de complexe avec le facteur d'élongation EF-Tu et une molécule de GTP. C'est le rôle de la sous-unité 30S de sélectionner l'aa-ARNt correct (revues par Rodnina & Wintermeyer, 2001; Ogle & Ramakrishnan, 2004; Rodnina et al., 2005). Le taux d'erreurs faites par le ribosome lors de cette sélection est très faible; on estime qu'il y a un acide aminé erroné pour 1000 à 10000 acides aminés incorporés dans le polypeptide en croissance (Parker, 1989). La discrimination entre un aa-ARNt correct et un aa-ARNt incorrect (pas plus d'un appariement correct sur trois) peut s'expliquer par la différence de stabilité des interactions codon-anticodon, mais ce n'est pas le cas pour la discrimination entre des aa-ARNt corrects et presque corrects (au moins deux appariements corrects sur trois). La différence de stabilité entre des interactions codon-anticodon correctes et presque correctes est de moins de 3 kcal/mol, ce qui devrait résulter en un taux d'erreurs d'un acide aminé sur 100 (revue par Rodnina & Wintermeyer, 2001). Il a d'abord été suggéré que la sélection des aa-ARNt se fait en deux étapes, ce qui permettrait de multiplier les chances de rejeter les aa-ARNt presque corrects (Hopfield, 1974; Ninio, 1975). Cette suggestion a ensuite été confirmée expérimentalement (Thompson & Stone, 1977; Ruusala et al., 1982; revu par Rodnina & Wintermeyer, 2001). Les deux étapes sont la sélection initiale et la lecture d'épreuve (*proofreading*), qui sont séparées par l'hydrolyse irréversible du GTP par EF-Tu. EF-Tu hydrolyse en moyenne plus d'une molécule de GTP pour chaque acide aminé incorporé dans le peptide en croissance, ce qui indique que certains aa-ARNt sont rejetés après l'hydrolyse du GTP (Thompson & Stone, 1977; Kakhniashvili et al., 1986).

Avec la sélection des aa-ARNt en deux étapes, la différence d'énergie entre des appariements codon-anticodon corrects et presque corrects est théoriquement suffisante pour expliquer la fidélité de la traduction, mais il faudrait que les réactions de liaison des aa-ARNt atteignent l'équilibre, ce qui n'est pas le cas. Les étapes de la sélection des aa-ARNt ont été ensuite caractérisées par de nombreuses études de cinétiques (Pape et al., 1998; 1999; 2000b; revue par Rodnina & Wintermeyer, 2001). Ces études ont suggéré que le ribosome n'est pas qu'un support où a lieu la sélection des aa-ARNt, mais qu'il reconnaît les aa-ARNt corrects par un mécanisme d'ajustement induit. La Figure 1-22A présente les étapes de la sélection des aa-ARNt, telles qu'elles sont comprises actuellement. Les aa-ARNt interagissent avec le ribosome sous forme de complexe avec EF-Tu et une molécule de GTP. Un complexe aa-ARNt•EF-Tu en présence d'un analogue non hydrolysable du GTP résulte en un patron de protections caractéristiques d'un ARNt au site A sur l'ARNr 16S, mais il ne protège pas le site A de l'ARNr 23S. Il y a plutôt des protections au niveau de la boucle sarcine-ricine de l'ARNr 23S, comme c'est le cas lors de la liaison du facteur EF-G (Moazed et al., 1988). EF-Tu bloque l'accès de l'aa-ARNt au site A de la sous-unité 50S, afin d'éviter qu'il n'y ait catalyse du lien peptidique avant que l'étape de sélection ne soit complétée. L'état occupé par l'aa-ARNt lié à EF-Tu a été appelé état hybride A/T (T pour EF-Tu). Des études de cryo-EM ont déterminé avec précision le site de liaison de EF-Tu sur le ribosome (Stark et al., 1997b; 2002; Valle et al., 2002; 2003a). EF-Tu est positionné à la base de la saillie L7/L12 sur la sous-unité 50S et il interagit directement avec la boucle sarcine-ricine de l'ARNr 23S. Sur la sous-unité 30S, EF-Tu interagit avec l'hélice 5 de l'ARNr 16S, près de la protéine S12. Lors de la sélection initiale, le complexe aa-ARNt•EF-Tu•GTP interagit d'abord avec le ribosome indépendamment du codon au site A. L'anticodon de l'aa-ARNt interagit ensuite de façon transitoire avec ce codon au site A. La cinétique de cette liaison au codon est la même pour des aa-ARNt corrects et presque corrects, avec une constante vitesse de liaison de 100 s^{-1} , mais un aa-ARNt presque correct se dissocie plus rapidement, avec une constante de vitesse de dissociation de 17 s^{-1} contre $0,2 \text{ s}^{-1}$ pour un aa-ARNt correct. Si l'anticodon de l'aa-ARNt est parfaitement

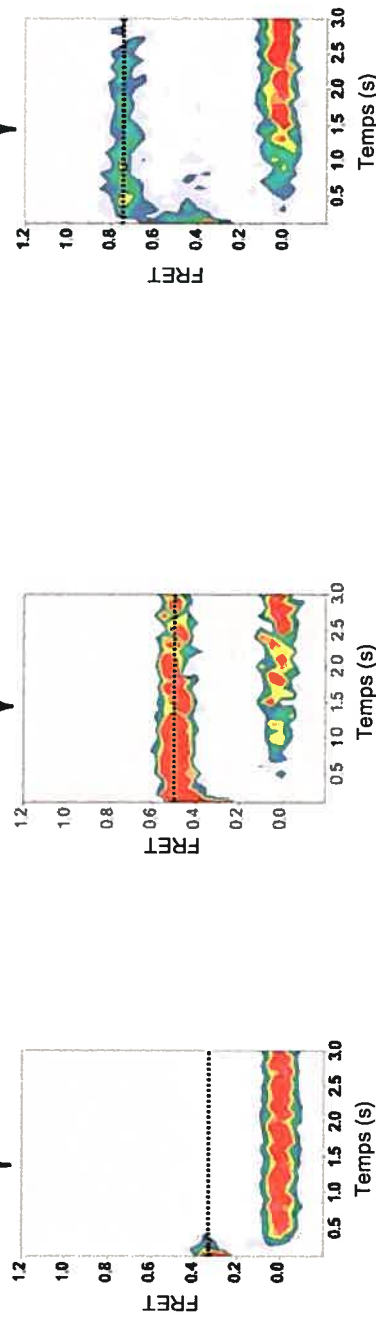
Figure 1-22 : Étapes de la sélection des aa-ARNt (adapté de Blanchard et al., 2004a).

- A. Représentation schématique. Le ribosome et les sites A, P et E sont schématisés par des rectangles jaunes. L'ARNm est représenté en vert, le pept-ARNt en rouge, l'aa-ARNt en bleu et les acides-aminés en blanc. EF-Tu est représenté par un rectangle bleu pâle sous sa forme liée au GTP, par un rectangle rouge sous sa forme GTPase activée et par un rectangle mauve sous sa forme liée au GDP. Les étapes précédant l'hydrolyse du GTP constituent la sélection initiale et les étapes suivant l'hydrolyse du GTP constituent la lecture d'épreuve.
- B. Résumé de l'étude par smFRET réalisées par Blanchard et al. (2004a). Voir le texte pour les détails. Les courbes représentent les distributions des signaux de FRET entre les fluorophores portés par les deux ARNt en fonction du temps.

A



B



ARNt correct + tétracycline
ou ARNt incorrect
FRET = 0,35

ARNt correct +
GDPNP ou kirromycine
FRET = 0,50

ARNt correct
FRET = 0,75

complémentaire du codon au site A, l'interaction codon-anticodon déclenche l'activation de la fonction GTPasique de EF-Tu, suivie par l'hydrolyse du GTP en GDP et la relâche de Pi. La constante de vitesse de réaction de l'activation de la GTPase et d'hydrolyse du GTP est 500 s^{-1} pour un aa-ARNt correct. Si l'aa-ARNt n'est pas correct, l'activité GTPasique de EF-Tu n'est pas activée et le complexe ternaire se détache rapidement du ribosome. Si l'aa-ARNt est presque correct, il peut y avoir activation de la GTPase de EF-Tu, mais beaucoup plus lentement que pour un aa-ARNt correct (avec une constante de vitesse de réaction de 50 s^{-1}). L'hydrolyse irréversible du GTP par EF-Tu marque la fin de la sélection initiale. C'est alors l'étape de lecture d'épreuve, où l'ARNt peut être accommodé au site A ou être rejeté. Suite à l'hydrolyse du GTP et relâche de Pi, EF-Tu change de conformation, adopte sa forme liée au GDP et perd son affinité pour l'aa-ARNt. EF-Tu quitte alors le ribosome et l'aa-ARNt est libre d'occuper le site A de la sous-unité 50S. L'accommodation d'un aa-ARNt correct au site A se fait avec une constante de vitesse de réaction de 7 s^{-1} , alors que cette constante pour un aa-ARNt presque correct est seulement de $0,1 \text{ s}^{-1}$. Par contre, les aa-ARNt presque corrects sont rejetés avec une constante de vitesse de 6 s^{-1} , alors que la constante de vitesse de cette réaction est négligeable pour les aa-ARNt corrects.

Récemment, les étapes de la sélection ont été étudiées avec une méthode de transfert d'énergie de fluorescence par résonance sur des molécules individuelles (*single molecule fluorescence resonance energy transfer* ou smFRET) (Blanchard et al., 2004a). Cette technique a permis de visualiser les étapes de la sélection en temps réel. Des ribosomes sont programmés avec un ARNm biotinylé, ce qui permet de les immobiliser sur une surface recouverte de streptavidine. Le site P de ces ribosomes est occupé par un fMet-ARNt^{fMet} contenant un fluorophore de type cyanine 3. Des complexes Phe-ARNt^{Phe}•EF-Tu•GTP, où l'ARNt porte un fluorophore de type cyanine 5, sont ajoutés par une technique de flux arrêté. La proximité entre les deux fluorophores des ARNt est mesurée en temps réel par FRET. Chaque particule ribosomique immobilisée produit un signal de FRET qui varie en fonction du temps, à mesure que l'aa-ARNt passe par les étapes de la sélection. Tel

qu'illustré à la Figure 1-22B, trois signaux distincts de FRET sont visibles. En présence de tétracycline, un antibiotique qui inhibe la liaison des ARNt au site A, le signal atteint une valeur relative de FRET de 0,35, ce qui correspond à l'étape de la reconnaissance codon-anticodon. Ce signal a une durée très courte, montrant que les ARNt se dissocient rapidement quand il n'y a pas d'activation de la GTPase de EF-Tu. En présence d'un analogue non hydrolysable du GTP ou en présence de kirromycine, un inhibiteur qui bloque le changement de conformation de EF-Tu qui se produit normalement après l'hydrolyse du GTP, le signal stagne à une valeur de FRET de 0,5. Cet état correspond à la fin de la sélection initiale et à l'activation de la GTPase de EF-Tu. Cette méthode ne permet toutefois pas de distinguer les états correspondant à la situation avant et après hydrolyse du GTP. Lorsqu'un aa-ARNt correct est utilisé en absence d'inhibiteur, le signal de FRET atteint rapidement un plateau de 0,75, ce qui correspond à l'état où l'aa-ARNt est accommodé au site A. Si l'ARNt est presque correct, il en résulte un signal de FRET à 0,35, mais rarement un niveau de FRET supérieur, car cet ARNt parvient rarement à activer la GTPase de EF-Tu avant d'être rejeté. Lorsque la boucle sarcine-ricine de l'ARNr 23S est clivée par un analogue de la toxine sarcine, le signal stagne à une valeur de FRET de 0,5, ce qui indique que cette boucle est importante pour l'activation de la GTPase de EF-Tu. Si la boucle sarcine-ricine n'était importante que pour la liaison de EF-Tu au ribosome, le clivage de cette boucle résulterait en un niveau de FRET de 0,35.

1.4.2.1.2. Les bases structurales du contrôle de la fidélité de traduction

Les études cristallographiques du ribosome ont permis de comprendre le mécanisme de la sélection des aa-ARNt d'un point de vue structural (Ogle et al., 2001; 2002; revues par Ogle et al., 2003; 2004). Les deux régions de l'ARNr 16S les plus importantes pour le contrôle de la fidélité de traduction sont les hélices 18 et 44, plus particulièrement la

position G530 de la boucle coiffant l'hélice 18 et les positions A1492 et A1493 dans la partie supérieure de l'hélice 44. Ces positions universellement conservées forment la « tête de lecture » du ribosome. Des études de protection contre les attaques par des agents chimiques avaient déjà montré que ces positions sont protégées par un ARNt au site A (Moazed & Noller, 1986). Leur importance fonctionnelle pour la fidélité de traduction avait aussi été démontrée par des expériences de mutagenèse (Powers & Noller, 1994; Yoshizawa et al., 1999). Les structures du centre de décodage libre ou en présence d'un ARNm et d'une tige-boucle anticodon correcte sont présentées à la Figure 1-23. Dans les structures cristallines de sous-unités 30S libres, le nucléotide 530 adopte une forme *syn* et les bases A1492 et A1493 sont insérées à l'intérieur de l'hélice 44. Par contre, lorsque la sous-unité 30S est complexée avec un fragment d'ARNm et une tige-boucle anticodon correcte au site A, le nucléotide 530 adopte une forme *anti* et les bases A1492 et A1493 se placent à l'extérieur de l'hélice 44, de manière à interagir avec le sillon mineur du duplex codon-anticodon. Par ces interactions, les bases des positions G530, A1492 et A1493 sondent la géométrie du duplex codon-anticodon. Les détails de ces interactions sont présentés à la Figure 1-24. Les positions du codon sont numérotées de 1 à 3 et celles de l'anticodon de 34 à 36. A1493 interagit avec le sillon mineur de la première paire de bases du duplex codon-anticodon (U1-A36). Les nucléotides G530 et A1492 interagissent avec le sillon mineur de la deuxième paire de bases (U2-A35). Dans cette conformation, A1492 interagit aussi avec le nucléotide C518 et le résidu S50 de la protéine S12. L'interaction avec la troisième paire de bases (U3-G34) fait intervenir G530. Cette paire de bases interagit aussi indirectement avec C518 et la proline 48 de la protéine S12, via un ion Mg^{2+} . De plus, le résidu C1054 de l'hélice 34 interagit avec la position 34 de la boucle anticodon. Notons que les interactions de A1492 et A1493 avec le duplex codon-anticodon sont des interactions de type A-mineur (section 1.3.2). La stabilité de ces interactions entre le ribosome et le duplex codon-anticodon dépend de la géométrie Watson-Crick des paires de bases de ce duplex. Il s'agit donc d'un mécanisme d'ajustement induit dans lequel la présence d'un aa-ARNt correct stabilise une conformation du centre de décodage différente

Figure 1-23 : Changement conformationnel du centre de décodage induit par un ARNt correct ou par la paromomycine (Ogle et al., 2001). Les nucléotides G530, C1054, A1492 et A1493 sont représentés en rouge. L'ARNm est représenté en mauve, la boucle anticodon (ASL) de l'ARNt au site A en doré, la protéine S12 en brun et la paromomycine (PAR) en jaune.

- A. Structure du centre de décodage dans la sous-unité 30S libre. Le nucléotide G530 est dans une conformation *syn* et les bases de A1492 et A1493 sont positionnées à l'intérieur de l'hélice 44.
- B. Structure du centre de décodage en présence d'un ARNm et de la boucle anticodon d'un ARNt correct au site A. Le nucléotide G530 adopte une conformation *anti* et les bases de A1492 et A1493 sont positionnées hors de l'hélice 44 et interagissent avec le duplex codon-anticodon.
- C. Structure du centre de décodage en présence de l'antibiotique paromomycine. La conformation de G530 n'est pas affectée, mais les bases de A1492 et A1493 sont positionnées hors de l'hélice 44.
- D. Structure du centre de décodage en présence d'un ARNm, de la boucle anticodon d'un ARNt correct au site A et de l'antibiotique paromomycine. La structure est similaire à celle présentée en B.

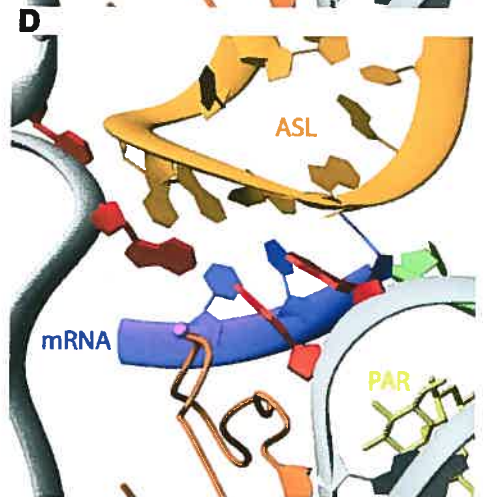
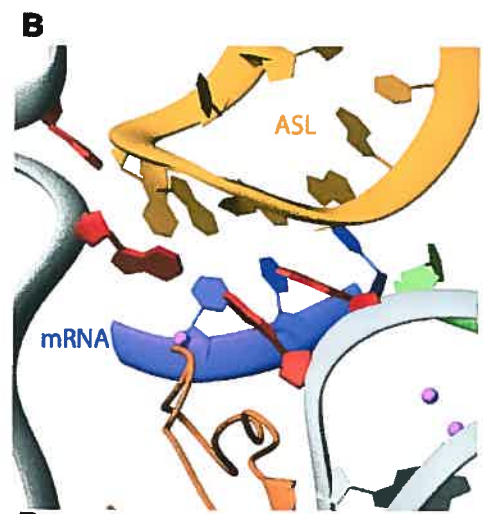
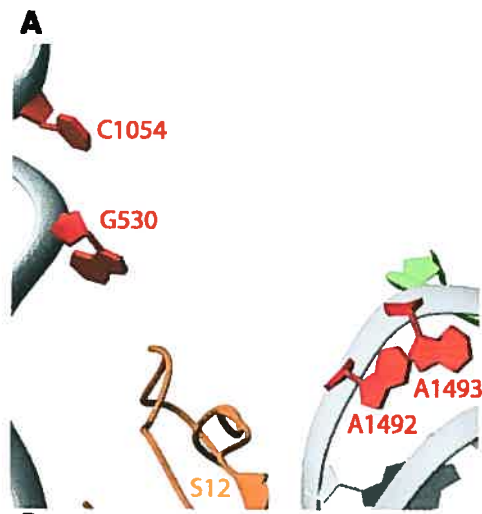
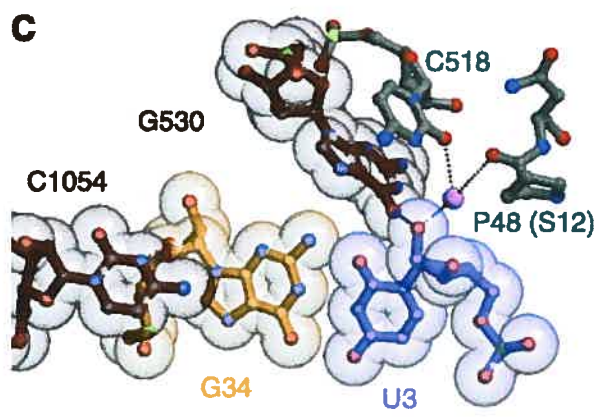
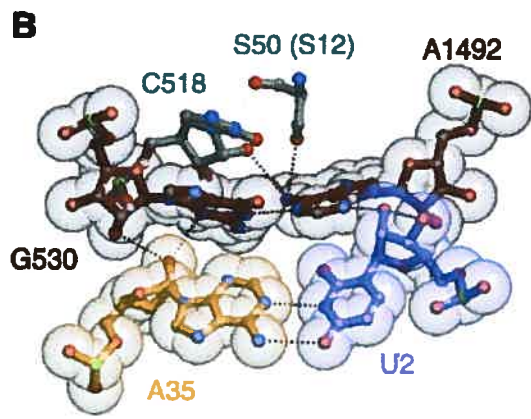
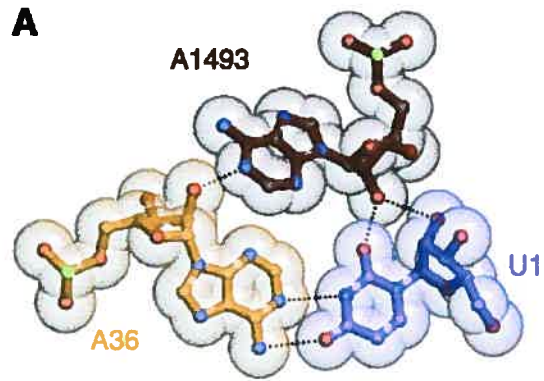


Figure 1-24 : Détails des interactions entre le ribosome et les paires de bases du duplex codon-anticodon. Les nucléotides de l'ARNm (numérotés 1 à 3) sont en bleu, les nucléotides de l'anticodon (numérotés 34 à 36) sont en vert et les éléments du centre de décodage en gris.

- A. Interaction de A1493 de l'hélice 44 avec la paire de bases A36-U1 du duplex codon-anticodon.
- B. Interaction de A1492 de l'hélice 44 et de G530 de l'hélice 18 avec la paire de bases A35-U2 du duplex codon-anticodon. Le ribose de C518 et le résidu S50 de la protéine S12 interagissent également avec A1492.
- C. Interaction de G530 avec la paire G34-U3 du duplex codon-anticodon. C1054 de l'hélice 34 est empilé sur G34 de l'anticodon et U3 interagit indirectement avec G518 et avec la proline 48 de la protéine S12 via un ion Mg^{2+} (en magenta).



de la conformation au repos. La géométrie de la troisième paire de bases du duplex codon-anticodon est moins surveillée, ce qui explique que certains appariements non Watson-Crick sont tolérés à cette position.

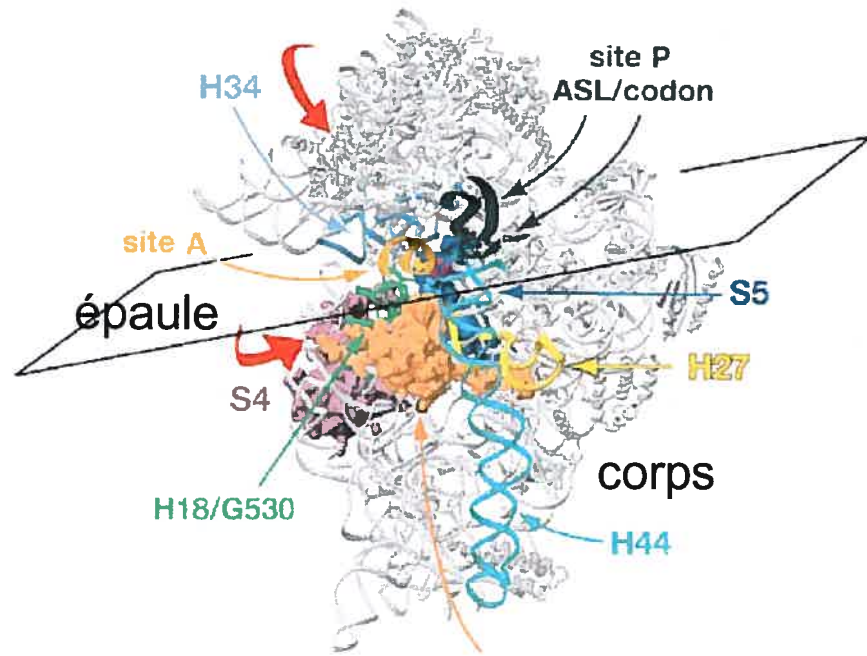
Les études cristallographiques ont également montré que le changement de conformation local du centre de décodage suite à la reconnaissance d'une interaction codon-anticodon correcte entraîne aussi un changement de conformation de l'ensemble de la sous-unité 30S (Ogle et al., 2002). La sous-unité 30S qui était initialement dans une conformation dite ouverte adopte une conformation plus compacte, que l'on appelle conformation fermée. Essentiellement, la tête et l'épaule de la sous-unité 30S subissent une rotation vers le centre de la sous-unité. Cependant, il semble que le déplacement de la tête observé dans la forme fermée de la sous-unité 30S s'effectue lors de l'association entre les deux sous-unités, indépendamment de l'étape de sélection (Vila-Sanjurjo et al., 2003). Le changement conformationnel de la sous-unité 30S lors du décodage n'impliquerait alors que les mouvements de l'épaule par rapport au corps. Il est connu depuis longtemps que des mutations dans la protéine ribosomique S12 confèrent la résistance, et parfois même la dépendance à la streptomycine (Gorini & Kataja, 1964; Ozaki et al., 1969). Alors que la streptomycine augmente les erreurs de lecture, il a été observé que les mutations de résistance à cet antibiotique rendent le ribosome plus précis (Chakrabarti & Gorini, 1975; Kurland & Ehrenberg, 1984). On dit que ces mutations causent un phénotype restrictif. Des mutations dans les protéines ribosomiques S4 et S5 ont un effet opposé, car elles annulent la résistance à la streptomycine des mutants de S12 et augmentent le taux d'erreurs de lecture (Zimmermann et al., 1971; Piepersberg et al., 1975). On dit qu'elles causent un phénotype *ram* (pour *ribosomal ambiguity*). Tel qu'illustré à la Figure 1-25, les travaux de Ogle et al. (2002) ont permis d'expliquer le mécanisme d'action de la streptomycine et des mutations dans les protéines S4, S5 et S12. Lorsque la sous-unité 30S passe de la forme ouverte à la forme fermée, certains contacts entre les protéines S4 et S5 sont défaites, alors que de nouveaux contacts se forment entre l'épaule (S12 et hélice 18) et le corps (hélice

Figure 1-25 : Changement de conformation de la sous-unité 30S lors de la sélection des aa-ARNt (adapté de Ogle et al., 2003).

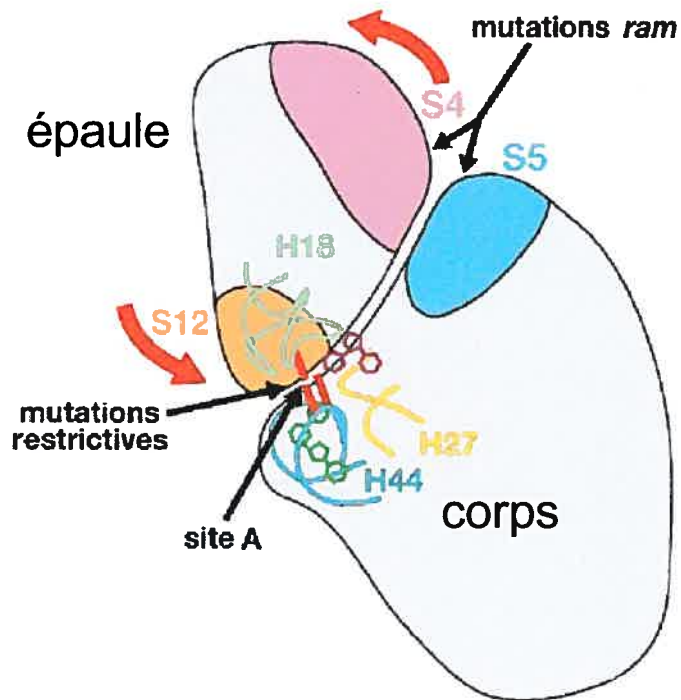
- A. Sous-unité 30S vue de l'interface. Les hélices 18, 27, 34 et 44 sont représentées par des rubans de différentes couleurs. Les protéines S4, S5 et S12 sont représentées par des masses de différentes couleurs. Les codons et boucles anticodons (ASL) aux sites A et P sont aussi indiquées. Les mouvements de la tête et de l'épaule lors du passage de la forme ouverte à la forme fermée sont indiqués par les deux flèches rouges. Le plan indique la coupe présentée en B.
- B. Schéma de la sous-unité 30S vue en coupe, selon le plan montré en A. Les différentes hélices et protéines ribosomiques sont colorées comme en A. Le mouvement de l'épaule lors du passage de la forme ouverte à la forme fermée est indiqué par les flèches rouges. Des mutations *ram* dans les protéines S4 et S5 perturbent l'interaction entre ces protéines et facilitent le passage à la forme fermée. Des mutations restrictives dans la protéine S12 perturbent les contacts qui se forment normalement entre cette protéine et l'ARNr lors du passage à la forme fermée.

A

tête



B



44). Tel que décrit précédemment, la streptomycine interagit simultanément avec la protéine S12 et avec les hélices 1, 18, 27 et 44 de l'ARNr 16S (Carter et al., 2000). La streptomycine a donc pour effet de favoriser une interaction plus étroite entre l'épaule et le corps. Le mécanisme d'action de la streptomycine a été étudié par des expériences de cinétiques (Gromadski & Rodnina, 2004). En présence de streptomycine, le taux d'hydrolyse du GTP par EF-Tu est augmenté dans le cas d'un aa-ARNt presque correct, mais les aa-ARNt corrects ne parviennent plus à activer rapidement la GTPase de EF-Tu comme c'est le cas normalement. Il en résulte un taux d'hydrolyse constant peu importe la nature de l'aa-ARNt. Ceci suggère que la streptomycine bloque la sous-unité 30S dans une conformation qui est différente de sa forme fermée, et qui permet un taux d'activation constant de la GTPase de EF-Tu. Cette étude démontre l'importance de la nature des changements de conformation de la sous-unité 30S pour l'activation de la GTPase lors de la sélection des aa-ARNt. L'effet de la streptomycine est très différent de celui de la paromomycine, qui se lie exclusivement dans l'hélice 44. Tel qu'illustré à la Figure 1-23C-D, la paromomycine induit le déplacement de A1492 et A1493, comme le fait un aa-ARNt correct (Ogle et al., 2001). La paromomycine favorise donc les erreurs de lecture en facilitant le changement de conformation du centre de décodage, même en l'absence d'un aa-ARNt correct. Des expériences cinétiques ont montré que la paromomycine favorise l'activation de la GTPase pour un aa-ARNt presque correct, mais n'affecte pas l'activation pour un aa-ARNt correct (Pape et al., 2000b; Gromadski & Rodnina, 2004). La paromomycine facilite donc l'ajustement induit du centre de décodage sans perturber les changements conformationnels de la sous-unité 30S comme le fait la streptomycine.

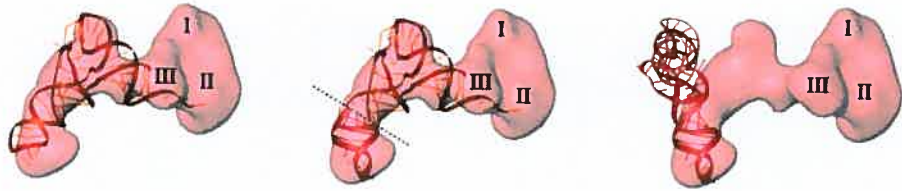
Comment le passage de la sous-unité 30S de la forme ouverte à la forme fermée mène à l'activation de la GTPase de EF-Tu n'est pas clair, mais des études de cryo-EM ont apporté quelques informations sur cette question. EF-Tu interagit avec les deux sous-unités, mais il semble que l'activation de la GTPase se fait via la sous-unité 50S. Tel que mentionné plus haut, la sous-unité 50S comprend une région appelée « centre associé à la

GTPase » (*GTPase-associated center*, ou GAC) Le GAC est localisé au niveau de la tige L7/L12 et il est formé par les nucléotides 1051-1102 de l'ARNr 23S et la protéine ribosomique L11. Cette région est la cible d'antibiotiques, tels que la thiostreptone et la micrococcine, qui inhibent la liaison des facteurs d'élongation (Egebjerg et al., 1989). Des études d'attaques par des agents chimiques suggèrent que la thiostreptone inhibe la liaison des facteurs d'élongation en affectant la structure du complexe ARN-L11 (Bowen et al., 2005). Une simple mutation en position 1067 de l'ARNr 23S inhibe également la fonction des deux facteurs d'élongation (Saarma et al., 1997). La boucle sarcine-ricine de l'ARNr 23S, comme mentionné plus haut, est aussi importante pour la liaison et l'action des facteurs d'élongation. Il a été proposé que l'aa-ARNt participe directement à la communication entre la sous-unité 30S et la GTPase de EF-Tu, puisqu'un ARNt intact est nécessaire pour qu'il y ait activation de la GTPase (Piepenburg et al., 2000). Des études récentes de cryo-EM ont confirmé cette hypothèse. Deux groupes ont publié indépendamment des structures du complexe ternaire lié au ribosome en présence de kirromycine (Stark et al., 2002; Valle et al., 2002; 2003a; revue par Frank et al., 2005). Rappelons que la kirromycine se lie à EF-Tu et bloque le changement de conformation de ce facteur suite à l'hydrolyse du GTP, empêchant ainsi son départ et bloquant l'ARNt dans l'état hybride A/T. Les structures obtenues ont permis de visualiser les régions du ribosome avec lesquelles le complexe ternaire interagit, et elles ont aussi montré que la tige-boucle anticodon de l'aa-ARNt lié au site A/T avait une structure déformée (Figure 1-26). L'épaule de l'aa-ARNt interagit avec le GAC et la tige acceptrice interagit avec la protéine S12. La boucle sarcine-ricine est très proche du site de liaison du GTP de EF-Tu. La forme courbée des ARNt est moins stable que leur forme normale et les ARNt non corrects quitteront rapidement le ribosome sans avoir activé la GTPase de EF-Tu. Pour les aa-ARNt corrects, la forme courbée de l'aa-ARNt est stabilisée par les interactions de la boucle anticodon avec le centre de décodage. Il est suggéré que la tension créée par la distorsion de l'ARNt entraînerait l'activation de la GTPase de EF-Tu, via le GAC et/ou la boucle sarcine-ricine. Après l'hydrolyse du GTP en GDP, EF-Tu adopte une conformation

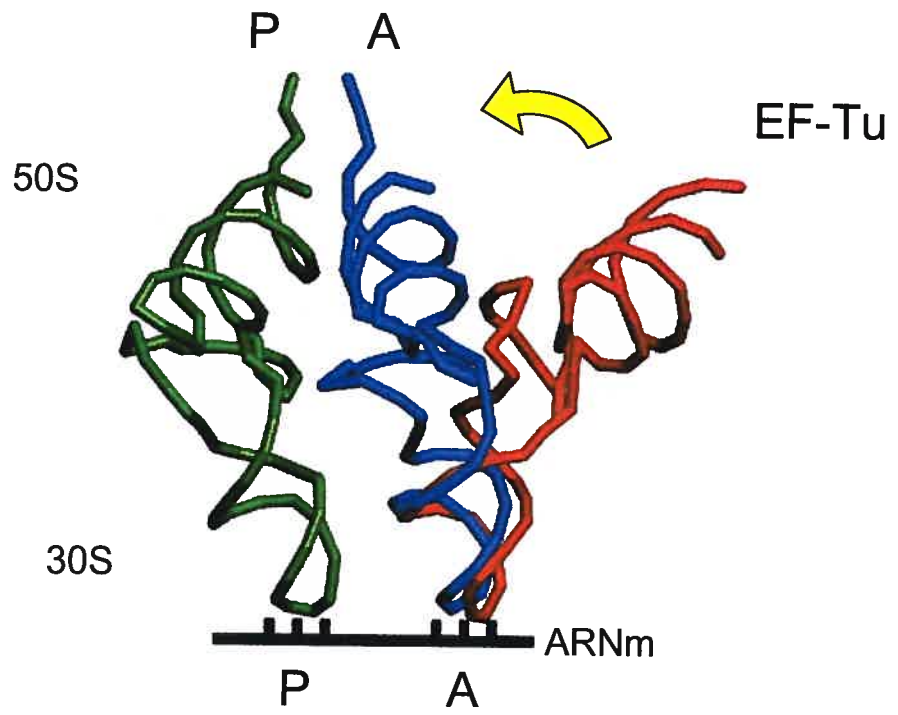
Figure 1-26 : Changement conformationnel de l'aa-ARNt lors de la sélection initiale.

- A. Structure obtenue par cryo-EM du complexe ternaire aa-ARNt•EF-Tu•GDP lié au ribosome en présence de kirromycine (adapté de Valle et al., 2002). La structure du complexe est représentée par une surface semi-transparente, isolée de la structure du ribosome pour plus de clarté. Les domaines I, II et III de EF-Tu sont indiqués. À gauche, la structure d'un ARNt libre est superposée sur la structure du complexe ternaire. Au centre, la structure de l'ARNt déformé est modélisée. La ligne pointillée indique l'emplacement de la courbure dans la tige-boucle anticodon. À droite, la structure d'un ARNt positionné au site A est superposée à la structure du complexe.
- B. Mouvement de l'aa-ARNt lors de la sélection (adapté de Rodnina et al., 2005). L'ARNt au site P est coloré en vert. L'ARNt lié à EF-Tu est coloré en rouge et l'ARNt au site A est coloré en bleu. Tel qu'illustré par la flèche jaune, suite au départ de EF-Tu l'aa-ARNt bascule dans le site A.

A



B



différente, il perd son affinité pour l'aa-ARNt et quitte le ribosome. C'est alors l'étape de lecture d'épreuve. Dans le cas d'un ARNt correct, la tige-boucle anticodon de l'aa-ARNt est fermement liée au ribosome. Suite au départ de EF-Tu, l'aa-ARNt courbé reprend spontanément sa forme normale, ce qui amène la tige acceptrice dans le site A de la sous-unité 50S. Dans le cas d'un aa-ARNt presque correct, l'aa-ARNt n'est pas retenu fermement au niveau de la sous-unité 30S et il quittera le ribosome en reprenant sa forme normale. Pour terminer cette section, il faut mentionner que l'activation de la fonction GTPasique de EF-Tu pourrait également impliquer certains ponts entre les sous-unités. Des régions importantes pour le décodage, comme l'hélice 44 et l'hélice 27 participent à des ponts avec la sous-unité 50S et ces ponts pourraient servir à transmettre de l'information entre les sous-unités ribosomiques. Les études cristallographiques de Ogle et al. ont été faites avec des sous-unités 30S libres et on ne sait donc pas si les ponts subissent des changements de conformations lors de la sélection des aa-ARNt.

1.4.2.2. La catalyse du lien peptidique

Une fois que l'aa-ARNt est accommodé au site A, la catalyse du lien peptidique s'effectue très rapidement. Le groupement amine nucléophile de l'aa-ARNt au site A attaque le groupement carbonyle liant la chaîne en croissance au pept-ARNt. Cette attaque résulte en la formation d'un intermédiaire tétrahédrique, suivi par la rupture du lien entre le polypeptide et l'ARNt au site P. Il en résulte que la chaîne polypeptidique est transférée du pept-ARNt sur l'aa-ARNt. Cette réaction est thermodynamiquement favorable et se produit spontanément en solution, bien que très lentement. Le ribosome agit comme catalyseur en augmentant la vitesse de réaction par cinq à sept ordres de grandeur (Weber & Orgel, 1979). On sait depuis longtemps que la sous-unité 50S est responsable de l'activité peptidyltransférase du ribosome. Des sous-unités 50S dont presque toutes les protéines ont été enlevées par extraction au phénol conservent une activité peptidyltransférase (Noller et

al., 1992), et il avait été proposé que l'ARNr 23S est responsable de cette activité. De nombreuses expériences de mutagenèse, de pontages et de protection par des ARNt ou des antibiotiques ont montré que le centre peptidyltransférase (CPT) se trouve localisé dans la boucle centrale du domaine V de l'ARNr 23S (revues par Porse et al., 2000; Brakier-Gingras et al., 2003). Plusieurs mutations dans cette boucle confèrent la résistance à des antibiotiques qui agissent en bloquant l'activité peptidyltransférase.

Des études cristallographiques de la sous-unité 50S ont été réalisées en présence de divers analogues de substrats comme des analogues du pept-ARNt, de l'aa-ARNt de l'ARNt désacylé ou de l'intermédiaire tétrahédrique de réaction (Ban et al., 2000; Harms et al., 2001; revues par Baram & Yonath, 2005; Steitz, 2005). Ces études ont permis d'identifier avec précision les éléments qui forment le centre peptidyltransférase et ont confirmé que le CPT est formé exclusivement d'ARN, ce qui permet d'affirmer que le ribosome est un ribozyme. Bien que les sous-unités ribosomiques soient en apparence non symétriques, il a été observé que les éléments qui forment les sites A et P au niveau de la cavité peptidyltransférase présentent une symétrie à deux axes (Bashan et al., 2003). Les structures cristallographiques montrent que les extrémités CCA des ARNt aux sites P et A interagissent respectivement avec les boucles qui coiffent les hélices 80 et 92 de l'ARNr 23S (Figure 1-27A). L'existence de ces interactions est supportée par des expériences de complémentation génétique (Samaha et al., 1995; Kim & Green, 1999). Les deux boucles, dénommées boucle A et boucle P, servent à positionner les extrémités des ARNt en vue de la réaction de transpeptidation. Des structures de la sous-unité 50S de *D. radiodurans* complexée avec des analogues de différentes tailles (ACC-puromycine et tige acceptrice) ont été obtenues en présence et en absence de sparsomycine, un antibiotique qui inhibe la formation du lien peptidique (Bashan et al., 2003). Ces structures montrent que le CPT, et plus particulièrement la position A2602, peut adopter une grande variété de conformations (Figure 1-28). L'étude de ces structures suggère aussi que la catalyse du lien peptidique se fait en même temps que la translocation, ce qui sera discuté dans la section suivante.

Figure 1-27 : Détails du centre peptidyltransférase de la sous-unité 50S de *Haloarcula marismortui*.

- A. Interaction des extrémités CCA des ARNt avec les boucles A et P de l'ARNr 23S (adapté de Steitz, 2005). Un analogue du produit peptidyle au site A, CC-puromycine-phénylalanine-acide caproïque-biotine ou CC-pmm-pcb (en vert) interagit avec la boucle A (en rouge). Un analogue du produit désacylé au site P, CCA (en violet) interagit avec la boucle P (en bleu). Les positions de l'ARNr 23S sont numérotées selon la séquence de *Haloarcula marismortui*.
- B. Détail du centre peptidyltransférase, montrant les substrats aux sites A et P (adapté de Steitz, 2005). Ce modèle a été obtenu en superposant une structure d'un complexe contenant un substrat aminoacylé au site A sur une structure d'un complexe contenant un substrat peptidyle au site P. Le substrat au site A est en mauve et le substrat au site P en vert. Le groupement α -amine du substrat au site A est positionné pour attaquer le groupement carbonyle du substrat au site P. Tel qu'indiqué par les lignes pointillées, le N3 de A2451 et le 2'OH de la position A76 du substrat au site P sont positionnés de manière à interagir avec le groupement α -amine du substrat au site A. Les positions de l'ARNr 23S sont numérotées selon la séquence de *Haloarcula marismortui*. Les numéros entre parenthèses réfèrent à la numérotation des bases d'*Eschérichia coli* utilisée dans le texte.
- C. Modèle de transfert de charge proposé par Nissen et al. (2000). Le réseau d'interaction entre les bases A2451, G2447, G2061, le phosphate de

A2450 et un ion potassium (K^+) pourraient augmenter le caractère nucléophile du groupement N3 de A2451.

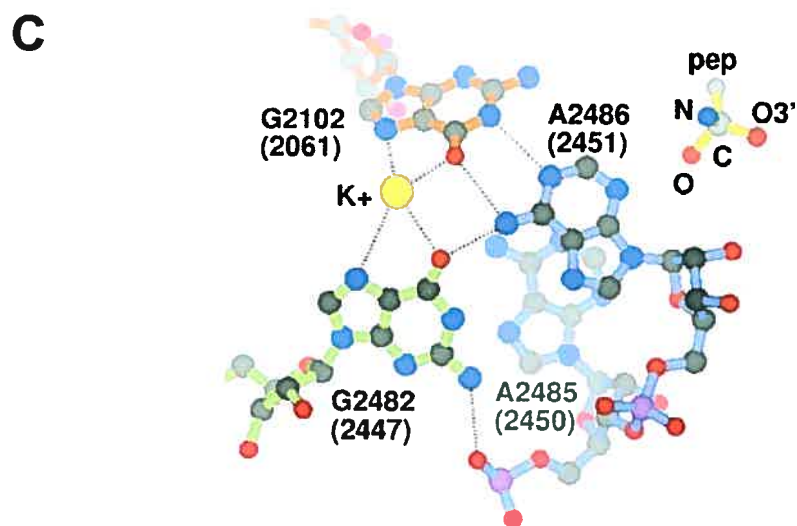
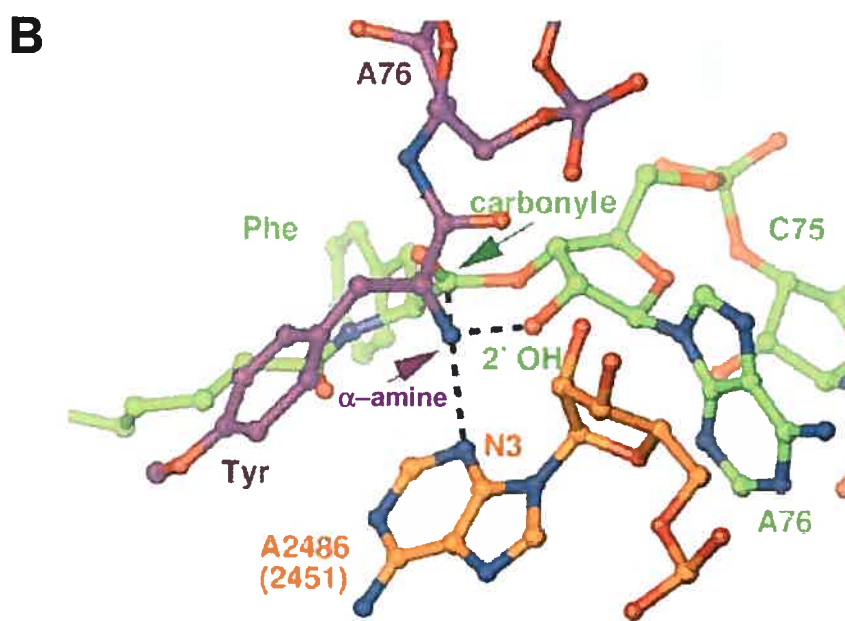
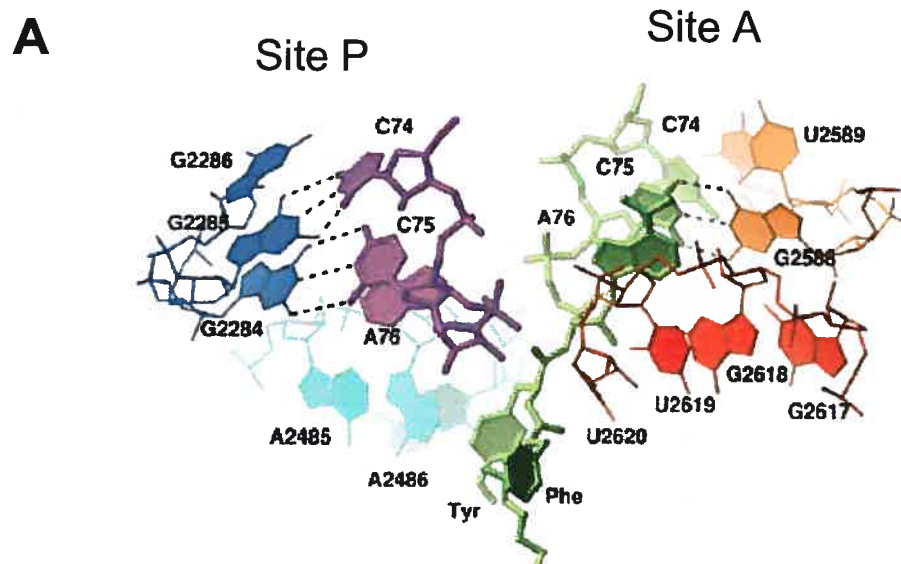
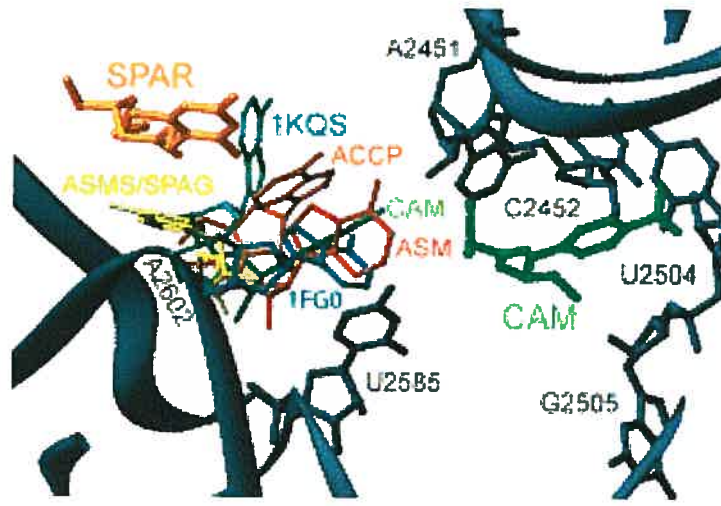


Figure 1-28 : Détails du centre peptidyltransférase dans la structure cristallographique de la sous-unité 50S de *Deinococcus radiodurans* (adapté de Bashan et al., 2003).

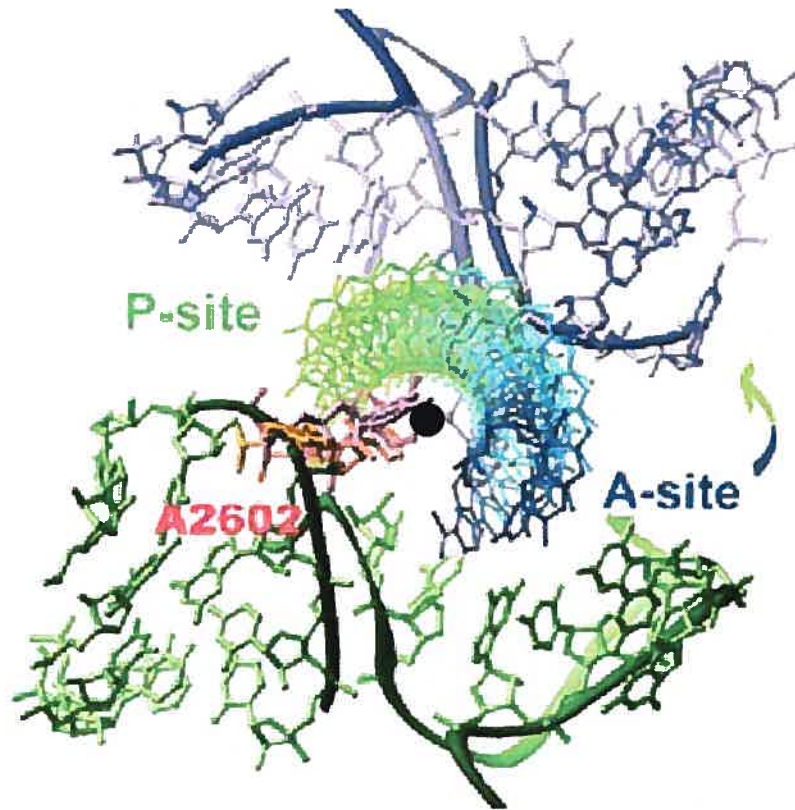
- A. Différents positionnements de A2602, observés dans les structures cristallographiques de différents complexes: en présence d'ACC-puromycine (ACCP), en présence de chloramphénicol (CAM), en présence de la tige acceptrice (ASM), en présence de la tige acceptrice et de la sparsomycine (ASM/SPAR), ainsi que dans deux structures de *H. marismortui* publiées par le groupe de Steitz et Moore (1FG0 et 1KQS).

- B. Modélisation de la rotation de l'extrémité CCA du pept-ARNt autour de l'axe de symétrie du centre peptidyltransférase. Les éléments du site A sont en bleu et les éléments du site P en vert. L'axe de symétrie est représenté par un point noir. La superposition d'images autour de l'axe de symétrie illustre la rotation de l'extrémité CCA de l'ARNt allant du site A au site P lors de translocation. Le nucléotide A2602 présenté en A est situé au niveau de l'axe de symétrie et pourrait servir à transporter l'extrémité CCA du pept-ARNt lors de sa rotation du site A au site P (voir détails dans le texte).

A



B



La nature de la catalyse effectuée par le CPT reste controversée. Le ribosome agit en positionnant les substrats de façon optimale pour la réaction de transpeptidation, mais il y a une controverse quant à savoir s'il participe également à une catalyse chimique. On sait que l'activité du CPT est sensible au pH, l'activité peptidyltransférase augmentant à mesure que le pH augmente (Fahnestock et al., 1970). Il a été montré que la protonation d'un groupement du ribosome, ayant un pKa d'environ 7,5, cause l'inactivation du ribosome (Katunin et al., 2002), mais ce groupement n'a pas encore été identifié. Cette dépendance au pH pourrait être expliquée par l'existence d'une catalyse acide-base, mais elle pourrait aussi être due à un changement de conformation du ribosome. Une structure cristallographique de la sous-unité 50S de *H. marismortui* a été obtenue en complexe avec des analogues de substrats, comme la CCdA-phosphate-puromycine qui imite l'intermédiaire tétrahédrique de la réaction de transpeptidation (Nissen et al., 2000). Cette structure a montré que l'atome N3 du nucléotide A2451 est positionné de manière à pouvoir interagir directement avec l'intermédiaire de réaction (Figure 1-27B). Cette observation a mené à la proposition d'un modèle selon lequel l'adénine 2451 serait le groupement ionisable du CPT et agirait comme base lors de la catalyse. La réactivité de A2451 au diméthylsulfate (DMS) en fonction du pH a montré que cette base avait un pKa de 7,6, ce qui est beaucoup plus élevé que la valeur normale pour une adénine (Muth et al., 2000). Un modèle de transfert de charge fut proposé afin d'expliquer le pKa anormalement élevé de cette adénine. Tel qu'illustré à la Figure 1-27C, il existe un réseau complexe d'interactions entre les positions G2061, G2447 et A2450 et un ion potassium, et il a été proposé que ce contexte particulier augmente le caractère nucléophile de A2451. Cependant, des études subséquentes n'ont pas permis de supporter ce modèle. Des mutations à la position 2451 sont létales, mais n'abolissent pas complètement l'activité peptidyltransférase, tandis que des mutations à la position 2447 sont viables et conservent une activité peptidyltransférase normale (Polacek et al., 2001; Thompson et al., 2001). De plus, la mutation G2447A n'affecte pas l'ionisation du groupement ayant un pKa de 7,5 (Beringer et al., 2003). La dépendance de l'activité peptidyltransférase au pH serait plutôt

due à des changements de conformation (Bayfield et al., 2001; Muth et al., 2001; Bayfield et al., 2004). Des études récentes montrent que le groupement 2'OH de A2451 est essentiel pour l'activité peptidyltransférase, alors que des modifications de la base, ou même son élimination, n'ont pratiquement pas d'effet (Erlacher et al., 2005). Tel que montré à la Figure 1-27B, le groupement 2'OH de A2451 peut interagir avec le groupement α -amine du substrat au site A et cette interaction pourrait être importante pour positionner cet ARNt (Hansen et al., 2002b). La Figure 1-27B montre aussi que le groupement 2'OH de la position A76 du substrat au site P est positionné de manière à pouvoir interagir avec le groupement α -amine du substrat au site A. Il a été proposé que cette interaction participe à la catalyse en augmentant la caractère nucléophile du groupement α -amine. Dans ce cas, il s'agirait d'une catalyse assistée par le substrat et non pas d'une catalyse par le ribosome. Ce modèle est supporté expérimentalement (Dorner et al., 2003; Weinger et al., 2004). Lorsque ce groupement 2'OH est remplacé par un 2'H ou un 2'F, la vitesse de la réaction de transpeptidation est réduite de 10^6 fois, mais la liaison du substrat n'est pas affectée. Finalement, des analyses thermodynamiques ont montré que l'enthalpie de la réaction de transpeptidation est légèrement moins favorable sur le ribosome qu'en solution et que le ribosome ne fait que réduire l'entropie de cette réaction (Sievers et al., 2004).

1.4.2.3. La translocation

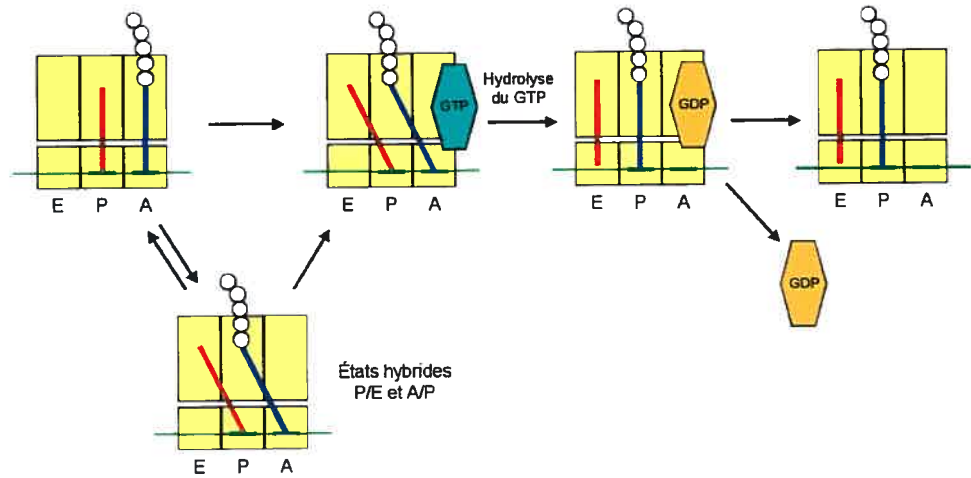
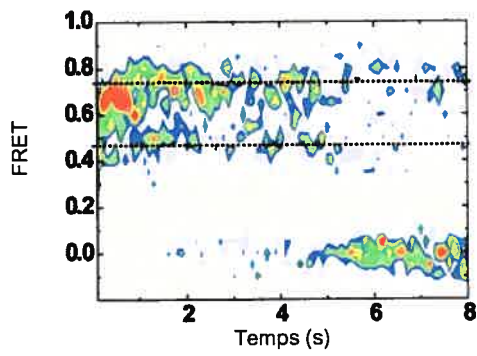
Suite au transfert de la chaîne polypeptidique, le ribosome porte un ARNt désacylé au site P et un pept-ARNt au site A. Lors de l'étape de translocation, ceux-ci sont déplacés vers les sites E et P, respectivement, afin de libérer le site A (revue par Noller et al., 2002; Joseph, 2003). Cette étape est catalysée par le facteur d'élongation EF-G et fait intervenir l'hydrolyse d'une molécule de GTP. La structure de EF-G a été élucidée par cristallographie aux rayons X (Czworkowski et al., 1994; Al-Karadaghi et al., 1996). EF-G contient quatre domaines. Les domaines I, II et III forment une structure globulaire, alors

que le domaine IV est allongé et forme une protubérance. La structure de EF-G est semblable à celle du complexe EF-Tu•ARNt (Nissen et al., 1995; 1999), où le domaine IV de EF-G correspondrait à l'ARNt lié à EF-Tu. Cette ressemblance a mené à l'hypothèse de mimétisme moléculaire (Liljas, 1996; Green, 2000). Le domaine IV de EF-G s'insérerait dans le site A de la sous-unité 30S et déplacerait le pept-ARNt lié au site A vers le site P.

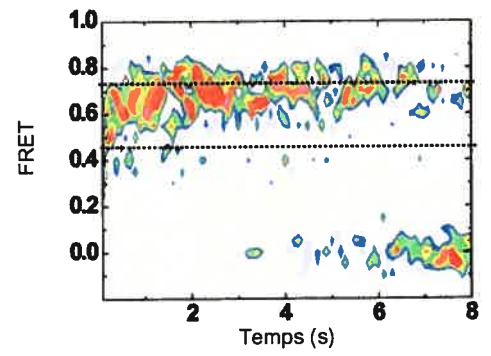
Un élément important pour la directionnalité de la translocation est l'affinité relative de chaque site de liaison pour les différents ARNt. Le site A a une affinité maximale pour les aa-ARNt, le site P pour les pept-ARNt et le site E pour les ARNt désacylés (Lill et al., 1986). Il existe plusieurs modèles pour décrire comment la translocation se produit. Le modèle le plus populaire était celui des états hybrides. Il avait été proposé en 1968 que le déplacement des ARNt sur le ribosome pourrait se faire de façon indépendante sur les deux sous-unités (Bretscher, 1968b). Il fallut attendre plus de vingt ans avant que cette hypothèse soit supportée par des données expérimentales. Le groupe de Noller a utilisé des expériences de protection afin de caractériser les interactions des ARNt avec le ribosome au cours des étapes de l'élongation. (Moazed & Noller, 1989b; revue par Noller et al., 2002). Par exemple, lorsqu'un ribosome portant un pept-ARNt au site P réagit avec la puromycine, les protections caractéristiques de l'ARNt au site P sur l'ARNr 23S sont remplacées par celles d'un ARNt au site E, alors que les protections sur l'ARNr 16S restent inchangées. Dans le modèle des états hybrides (Figure 1-29), suite à la catalyse du lien peptidique, les tiges acceptrices des ARNt aux sites P et A de la sous-unité 50S se déplacent vers les sites E et P, alors que leurs boucles anticodons restent immobiles relativement à la sous-unité 30S. Il en résulte que les ARNt occupent les états hybrides P/E et A/P. Suite à l'hydrolyse du GTP par EF-G, les ARNt se déplacent par rapport à la sous-unité 30S pour occuper les sites classiques E et P. Un autre modèle est celui des trois sites allostériques. Il avait été observé que la liaison d'un complexe ternaire EF-Tu•GTP•aa-ARNt au ribosome avait pour effet d'éjecter l'ARNt occupant le site E (Rheinberger & Nierhaus, 1983), et ce même en présence d'un analogue non hydrolysable du GTP (Rheinberger & Nierhaus, 1986).

Figure 1-29 : Modèle des états hybrides lors de la translocation.

- A. Représentation schématique des étapes de la translocation. Le ribosome et les sites A, P et E sont schématisés par des rectangles jaunes, avec la sous-unité 30S en bas et la sous-unité 50S en haut. L'ARNm est représenté en vert, l'ARNt désacylé en rouge, le pept-ARNt en bleu et les acides-aminés en blanc. EF-G est représenté en turquoise sous sa forme liée au GTP et en orange sous sa forme liée au GDP. Suite au transfert de la chaîne peptidique sur l'ARNt au site A, les ARNt sont en équilibre entre les états classiques et hybrides. EF-G déplace cet équilibre vers l'occupation des états hybrides.
- B. Équilibre dynamique entre les états hybrides, observé par des expériences de smFRET (Blanchard et al., 2004b). Les courbes représentent les distributions des signaux de FRET entre les fluorophores portés par les ARNt en fonction du temps. Avec un fMet-ARNt^{fMet} au site P et un aa-ARNt au site A, il y a transfert de la chaîne polypeptidique sur l'aa-ARNt au site A et les ARNt oscillent entre les états classiques (FRET = 0,75) et hybrides (FRET = 0,45). Avec un ARNt^{fMet} désacylé au site P et un aa-ARNt au site A, il n'y a pas de transfert de chaîne polypeptidique sur l'ARNt au site A et les ARNt passent très peu de temps dans les états hybrides.

A**B**

fMet-ARNt^{fMet} au site P



ARNt^{fMet} désacylé au site P

Selon ce modèle, il y a un couplage entre les sites A et E et les deux ne peuvent pas être occupés en même temps. Le modèle allostérique et le modèle des états hybrides ne sont pas en opposition et ils décrivent probablement deux aspects de la réalité. Un autre modèle de la translocation, le modèle « α - ϵ », a été proposé par le groupe de Nierhaus qui avait constaté que les contacts entre le ribosome et les ARNt aux sites A et P ne change pas lors de la translocation (Dabrowski et al., 1998; revue par Spahn & Nierhaus, 1998). Selon ce modèle, il existerait des éléments mobiles du ribosome qui déplacent les ARNt lors de la translocation.

L'ensemble des données actuelles favorisent le modèle des états hybrides plutôt que le modèle « α - ϵ ». Il y a cependant des données contradictoires quant à savoir si les ARNt occupent les sites hybrides de façon spontanée après la transpeptidation. Les expériences initiales de protection montraient que les ARNt occupent spontanément les états hybrides lors de la formation du lien peptidique (Moazed & Noller, 1989b; Odom et al., 1990; revue par Green & Noller, 1997). Les études cristallographiques de la sous-unité 50S par le groupe de Yonath suggèrent que la translocation des ARNt par rapport à la sous-unité 50S se produit en même temps que la réaction de transpeptidation. Par contre, des études par cryo-EM (voir plus loin) montrent que le facteur EF-G est nécessaire pour que les ARNt occupent les états hybrides (Valle et al., 2003b), ce qui est aussi supporté expérimentalement (Zavialov & Ehrenberg, 2003). Cette question a été clarifiée par des études de smFRET (voir aussi la section 1.4.2.1), qui ont permis d'étudier la dynamique des ARNt sur le ribosome en temps réel (Blanchard et al., 2004b). Des ribosomes immobilisés sur une surface et contenant un fMet-ARNt^{fMet} au site P sont mis en présence de complexes aa-ARNt•EF-Tu•GTP. Les deux ARNt contiennent un fluorophore qui permet de mesurer leur distance par FRET. Les valeurs de FRET en fonction du temps sont mesurées pour chacune des particules ribosomiques immobilisées. En absence de facteur EF-G et suite à la réaction de transpeptidation, il a été observé que les ARNt oscillent entre deux états : un état avec une valeur de FRET de 0,75 correspondant aux ARNt accommodés

aux sites A et P et un état avec une valeur de FRET de 0,45, qui correspondrait aux états hybrides A/P et P/E. Cette expérience montre que les ARNt sont en équilibre dynamique entre les états hybrides et classiques. Avec un pept-ARNt au site A, les ARNt passent six fois plus de temps dans les états hybrides, ce qui montre que le transfert de la chaîne polypeptidique favorise les états hybrides. EF-G agirait en déplaçant cet équilibre en faveur de l'occupation des états hybrides.

Des études de cryo-EM ont aussi montré que les sous-unités subissent une rotation l'une par rapport à l'autre lors de la translocation (Frank & Agrawal, 2000; Gao et al., 2003; Tama et al., 2003). La liaison du facteur EF-G•GTP à un ribosome portant un ARNt désacylé au site P et un pept-ARNt au site A résulte en une rotation d'environ 6 degrés des sous-unités l'une par rapport à l'autre. Suite à l'hydrolyse du GTP par EF-G, les sous-unités reprennent leur position initiale. Cette rotation est appelée mouvement de rochet du ribosome. Ces observations sont supportées par des études cinétiques de la translocation qui ont démontré que l'hydrolyse du GTP par EF-G est utilisée pour faciliter un réarrangement conformationnel du ribosome précédant la translocation des ARNt (Savelsbergh et al., 2003; Peske et al., 2004). En plus de la rotation entre les sous-unités, la liaison de EF-G entraîne divers changements de conformation dans le ribosome. La tige L7/L12 devient fourchue et la structure globale du ribosome est moins compacte. Plus spécifiquement, les tunnels d'entrée et de sortie de l'ARNm deviennent plus larges, ce qui devrait faciliter le mouvement de l'ARNm lors de la translocation. Cette rotation cause aussi des changements dans les ponts entre les sous-unités. Les régions ayant la plus grande amplitude de mouvement lors de la liaison de EF-G•GTP sont la tête et le pied de la sous-unité 30S. Les ponts B1a et B7b, qui impliquent des contacts ARN-protéine sont défaits, tandis que les interactions qui forment le pont B1b (le seul pont protéine-protéine), sont modifiées. Les ponts ARN-ARN situés au centre des sous-unités restent inchangés. Ces ponts correspondent approximativement à l'axe de rotation des sous-unités lors du mouvement de rochet. Des études subséquentes ont montré que le mouvement de rochet des sous-unités

nécessite que l'ARNt au site P soit désacylé (Valle et al., 2003b). La présence d'un pept-ARNt au site P bloque le ribosome dans une conformation qui ne permet pas cette rotation des sous-unités. Ceci permet d'assurer qu'il n'y a pas de translocation avant le transfert de la chaîne polypeptidique.

La translocation est une fonction inhérente du ribosome (revue par Noller et al., 2002). EF-G n'est pas indispensable pour la translocation, même s'il stimule grandement son efficacité (Gavrilova et al., 1976). La translocation peut même se produire en absence d'ARNm (Belitsina et al., 1981). Il avait été observé que la translocation en absence de facteur d'élongation était stimulée par le *p*-chloromercuribenzoate, un agent qui modifie les groupements thiols des protéines (Gavrilova & Spirin, 1971; Southworth et al., 2002). Une étude récente montre que l'inactivation ou l'absence simultanée des protéines S12 et S13 résulte en une forte stimulation de la translocation indépendante de EF-G (Cukras et al., 2003). Ces deux protéines sont situées au niveau de l'interface entre les sous-unités et S13 participe aux ponts B1a et B1b avec la sous-unité 50S (Yusupov et al., 2001). Les protéines S12 et S13 interagissent respectivement avec les tiges-boucles anticodons des ARNt aux sites A et P. Ces protéines sont manifestement importantes pour la stabilité de l'état pré-translocationnel du ribosome et elles auraient évolué, entre autre, pour servir d'élément de contrôle lors de la translocation. La translocation indépendante de EF-G est également stimulée par la sparsomycine (Fredrick & Noller, 2003), un antibiotique qui se lie au centre peptidyltransférase et inhibe la formation du lien peptidique. Ces résultats démontrent un lien entre le centre peptidyltransférase et la translocation et suggèrent que la sparsomycine favorise des changements conformationnels du centre peptidyltransférase nécessaires pour la translocation. Cette suggestion est en accord avec les études cristallographiques de Bashan et al (2003) qui montraient que le CPT, et particulièrement la position A2602, a une grande flexibilité de conformation (Figure 1-28A). Selon ces mêmes études, les ARNt subiraient un mouvement de rotation autour de l'axe de symétrie du centre peptidyltransférase lors du transfert de la chaîne peptidique (Figure 1-28B). Le nucléotide

A2602 est positionné au niveau de l'axe de symétrie du CPT et il est proposé qu'il contribue au transport du pept-ARNt lors de cette rotation.

La translocation permet au ribosome de se déplacer le long de l'ARNm, mais cela nécessite aussi de défaire les structures secondaires du messenger. L'extérieur du tunnel d'entrée du messenger est bordé par les protéines S4 et S5 sur le corps de la sous-unité 30S et par la protéine S3 sur la tête. Une portion de S5 faisant face à l'ARNm possède un domaine similaire au domaine de liaison à l'ARN double brin et il fut proposé que les protéines S4 et S5 interagissent avec un brin d'une structure secondaire du messenger et la protéine S3 interagit avec l'autre brin, le mouvement relatif entre le corps et la tête lors de la traduction pourrait servir à séparer les deux brins (Yusupova et al., 2001). Ce modèle est supporté par des études récentes démontrant que l'activité hélicase est une fonction inhérente du ribosome et que certaines mutations dans les protéines S3 ou S4 perturbent cette activité (Takyar et al., 2005).

1.4.3. La terminaison de la traduction et le recyclage des sous-unités ribosomiques

La fin de la traduction est signalée par l'un des trois codons de terminaison, aussi appelés codons non-sens : UAG, UGA et UAA. Ces codons ne sont pas reconnus par des ARNt, mais plutôt par des facteurs de terminaison : RF1 et RF2 (pour *Release Factor* 1 et 2). RF1 reconnaît les codons UAA et UAG, alors que RF2 reconnaît les codons UAA et UGA. Il a été montré que l'échange d'une séquence de trois acides aminés entre RF1 et RF2 inverse leur spécificité pour les codons de terminaison UGA et UAG (Ito et al., 2000). Lorsque RF1 ou RF2 reconnaissent un codon de terminaison au site A, ils déclenchent la réaction d'hydrolyse et la relâche du polypeptide. L'interaction de RF2 avec le ribosome a été caractérisée par des études de cryo-EM (Klaholz et al., 2003; Rawat et al., 2003) et il est

probable que RF1 interagisse d'une façon similaire avec le ribosome. Dans ces structures, une région de RF2 contenant une boucle de séquence SPF (serine-proline-phénylalanine) interagit avec le centre de décodage de la sous-unité 30S, notamment les hélice 18 et 44 de l'ARNr 16S et la protéine S12. Cette boucle sert manifestement à reconnaître le codon stop au site A, en accord avec les résultats de Ito et al. Une autre boucle de séquence GGQ (glycine-glycine-glutamine) interagit avec le centre peptidyltransférase sur la sous-unité 50S et est probablement impliquée dans la relâche du polypeptide synthétisé. Les structures de RF2 libre et lié au ribosome sont très différentes (revue par Nakamura & Ito, 2003). RF2 libre a une forme compacte, avec les boucles SPF et GGQ proches l'une de l'autre. La reconnaissance par RF2 d'un codon de terminaison au site A induirait une forme plus ouverte où la boucle GGQ de ce facteur interagit avec le centre peptidyltransférase sur la sous-unité 50S pour stimuler la relâche du polypeptide. Cette relâche se fait par hydrolyse du lien ester qui lie le polypeptide au pept-ARNt. Contrairement à la réaction de transpeptidation, cette hydrolyse ne se fait pas de façon spontanée en solution. Une étude récente a montré que des mutations à la position A2451 de l'ARNr 23S affectent la réaction d'hydrolyse nécessaire à la relâche de la chaîne polypeptidique (Youngman et al., 2004). Rappelons que le nucléotide A2451 de la cavité du CPT avait été impliqué dans un modèle de catalyse de la réaction de transpeptidation (voir section 1.4.2.2). Il est donc possible que ce nucléotide participe à une réaction acide-base, mais lors de la relâche du polypeptide plutôt que lors de la formation du lien peptidique. Quant au facteur de terminaison RF3, il s'agit d'une GTPase qui interagit avec RF1 et RF2 sur le ribosome. RF3 se lie au ribosome sous forme de complexe avec une molécule de GDP. Suite à l'hydrolyse du lien retenant la chaîne peptidique au pept-ARNt, un changement de conformation permet à RF3 d'échanger son GDP pour un GTP, ce qui entraîne la relâche de RF1/RF2 (Zavialov et al., 2001). L'hydrolyse du GTP par RF3 permet ensuite sa relâche du ribosome. RF3 ne semble être qu'un facteur accessoire, puisqu'il n'est pas indispensable chez les bactéries (revue par Kisselev & Buckingham, 2000). Un facteur de recyclage appelé RRF (*ribosome recycling factor*) va ensuite dissocier le ribosome en ses sous-unités. Cette étape requiert le concours

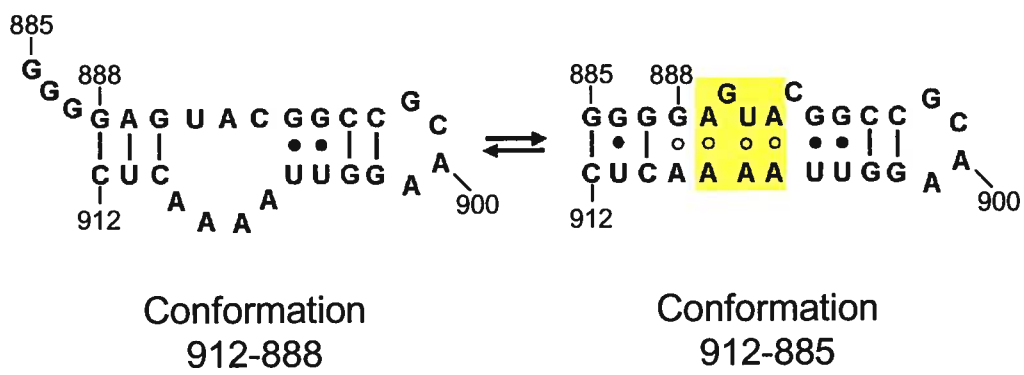
de EF-G et l'hydrolyse de GTP par ce facteur (Karimi et al., 1999). Finalement, le facteur d'initiation IF3 se lie à la sous-unité 30S et chasse l'ARNt désacylé du site P. Les autres facteurs d'initiation peuvent alors venir se lier à la sous-unité 30S pour débiter un nouveau cycle de traduction.

1.5. L'hélice 27 de l'ARNr 16S

Au moment où j'ai débuté mon projet de recherche, l'hélice 27 de l'ARNr 16S venait d'attirer l'attention des chercheurs travaillant sur le ribosome. Il avait été suggéré que cette hélice est impliquée dans un réarrangement conformationnel important pour le contrôle de la fidélité de traduction (Lodmell & Dahlberg, 1997). L'existence de ce réarrangement a ensuite été contestée, mais il est utile de présenter cette histoire en détail, car en plus d'être important pour la compréhension du projet de recherche, elle a grandement influencé la recherche sur le ribosome aux cours des dernières années.

L'hélice 27 de l'ARNr 16S est formée des nucléotides 885 à 912. Cette hélice est coiffée d'une tétraboucle GCAA extrêmement conservée. Cette boucle est formée des nucléotides 898 à 901 et c'est pourquoi on l'appelle tétraboucle 900. Les structures cristallographiques de la sous-unité 30S montrent que la base de l'hélice 27 est en contact avec l'hélice 44, près du centre de décodage (Schluenzen et al., 2000; Wimberly et al., 2000). La tétraboucle 900 interagit avec un récepteur à la base de l'hélice 24 de l'ARNr 16S et elle est aussi impliquée dans le pont B2c avec la sous-unité 50S (Yusupov et al., 2001). Il avait été observé que les trois nucléotides 910 à 912 sur un des brins à la base de l'hélice 27 ont la possibilité de s'apparier avec les nucléotides 888 à 890 ou avec les nucléotides 887 à 885 sur l'autre brin (Figure 1-30). Le premier arrangement (nommé appariement 912-888) avait été initialement proposé dans plusieurs modèles de l'ARNr 16S (Woese et al., 1983; Brimacombe et al., 1988). Le deuxième arrangement (nommé

Figure 1-30: Réarrangement de l'hélice 27 de l'ARNr 16S proposé par Lodmell et Dahlberg (1997). Le motif boucle E retrouvé dans la conformation 912-885 est indiqué par un carré jaune.



appariement 912-885) avait ensuite été prédit par analyse comparative de séquences (Gutell et al., 1994) et des expériences génétiques avaient montré que cet appariement est nécessaire pour l'activité du ribosome (Lodmell et al., 1995). Il est intéressant de noter que la forme 912-885 de l'hélice 27 contient un motif boucle E. Les motifs boucle E sont souvent impliqués dans des interactions ARN-protéine (Leontis & Westhof, 1998) et les structures cristallographiques du ribosome montrent d'ailleurs que l'hélice 27 est impliquée dans une interaction avec la protéine S12 à proximité de ce motif (Schluenzen et al., 2000; Wimberly et al., 2000).

Lodmell et Dahlberg (1997) montrèrent ensuite que les deux appariements suggérés pour l'hélice 27 sont tous les deux importants pour le fonctionnement du ribosome et proposèrent qu'ils correspondent à deux états fonctionnels. Ces chercheurs ont observé que des mutations qui favorisent l'un ou l'autre de ces appariements avaient des effets opposés sur la fidélité de traduction. Les mutations favorisant la forme 912-885 causaient un phénotype *ram*; c'est-à-dire que les ribosomes faisaient plus d'erreurs de traduction. Les mutations favorisant la forme 912-888 résultaient en un phénotype d'hyper-précision. Les mutations de l'hélice 27 favorisant la forme 912-888 étaient compatibles avec les mutations *ram* de la protéine S4, mais non-compatibles avec les mutants hyper-précis altérés dans la protéine S12. Les mutations favorisant la forme 912-885 avaient une compatibilité inverse. Par des études d'attaque par des agents chimiques, ils ont montré aussi que les mutations dans la région 912 entraînaient des changements conformationnels dans des régions impliquées dans la liaison de l'ARNm et des ARNt, notamment les hélices 2, 18, 26, 28, 34, 43 et 44. L'existence de ce réarrangement conformationnel fut supportée par des études de microscopie cryo-électronique montrant que les mutations dans la région 912 affectent la structure globale du ribosome (Gabashvili et al., 1999b). Les auteurs ont comparé la structure obtenue par cryo-EM de ribosomes de type sauvage avec celles de ribosomes contenant la mutation C912G ou la mutation C912G/G885U qui causent respectivement

des phénotypes hyper-précis et *ram*. Ces mutations provoquent des changements de conformation dans l'ensemble du ribosome, surtout dans la sous-unité 30S.

Dans les années qui suivirent, diverses observations vinrent contredire le modèle du réarrangement conformationnel de l'hélice 27. L'effet des mutations de la région 912 fut étudié chez la levure (Velichutina et al., 2000), mais à la différence des résultats obtenus précédemment chez *E. coli*, les mutations testées causaient toutes un phénotype d'hyper-précision, peu importe l'appariement qu'elles favorisaient. Ces résultats confirmaient l'importance de l'hélice 27 pour le contrôle de la fidélité de traduction, mais ne supportaient pas le modèle du réarrangement de l'hélice 27. À mesure que les données cristallographiques s'accumulaient, il fut observé que l'hélice 27 est toujours dans la forme 912-885, autant dans les cristaux de sous-unité 30S libres (Schluenzen et al., 2000; Wimberly et al., 2000) que de sous-unité 30S en complexe avec un ARNm et fragment d'ARNt correct (Ogle et al., 2001). Une structure cristallographique à faible résolution du ribosome d'*E. coli* contenant une mutation de la protéine S12 montrait l'hélice 27 sous-la forme 912-885 (Vila-Sanjurjo et al., 2003), alors que cette mutation hyper-précise aurait dû favoriser la forme 912-888. Il est cependant possible qu'une des deux formes de l'hélice 27 soit moins stable que l'autre, ce qui expliquerait qu'elle n'est jamais observée dans des cristaux de ribosomes. Dans l'article original de Lodmell & Dahlberg (1997), les ARNr mutants contenaient les mutations C1192U dans l'ARNr 16S et A2058G dans l'ARNr 23S. Ces mutations étaient couramment utilisées comme marqueurs pour faciliter les études génétiques avec les opérons d'ARN ribosomiques et elles étaient généralement considérées comme des mutations silencieuses. Le groupe de Dahlberg a étudié un mutant quadruple (C912G+C910G+G885C+G887C) qui empêche la formation de l'appariement 912-888 sans affecter l'appariement 912-885 (Rodriguez-Correa & Dahlberg, 2004). Ce mutant est viable en absence des mutations C1192U et A2058G, mais il n'est pas viable en présence de ces mutations. Ces résultats montrent que les mutations C1192U et A2058G peuvent avoir des effets insoupçonnés en présence de d'autres mutations.

La conformation 912-885 de l'hélice 27 a cependant été observée *in vitro* dans des expériences utilisant un ARN synthétique correspondant à l'hélice 27 (Hoerter et al., 2004). Par des expériences de RMN, de pontage à l'UV et de FRET, les auteurs ont montré qu'une hélice 27 isolée existait sous les formes 912-885 et 912-888 à proportion presque égale et que ces deux populations étaient en échange rapide. Ils ont aussi montré que la tétracycline, un antibiotique qui se lie près de A892 de l'hélice 27, inhibe ce réarrangement et favorise la forme 912-885. Ces expériences démontrent que l'hélice 27 isolée peut exister sous les deux formes et que ces deux formes semblent avoir des stabilités comparables. Cependant, cela ne dit pas si la forme 912-888 est importante pour le fonctionnement du ribosome. L'hélice 27 interagit avec de nombreuses régions, dont les hélices 1, 24, 44 et 45 de l'ARNr 16S et l'hélice 67 de l'ARNr 23S, et tous ces contacts pourraient restreindre la flexibilité conformationnelle de l'hélice 27 à l'intérieur du ribosome, de sorte que la forme 912-888 y soit beaucoup moins stable.

1.6. Description du projet de recherche

Mon projet fut entamé peu après la publication de l'article de Lodmell et Dahlberg (1997) présentant le modèle du réarrangement conformationnel de l'hélice 27 (voir section précédente). Nous avons porté notre attention sur la tétraboucle 900 qui coiffe l'hélice 27. Cette tétraboucle, de séquence GCAA, est parmi les régions les plus conservées de l'ARNr 16S, ce qui suggérait qu'elle joue un rôle important pour la fonction du ribosome. Nous avons supposé que cette tétraboucle forme un motif GNRA et qu'elle participe à des interactions ARN-ARN ou ARN-protéine. Des expériences de protection suggéraient que la tétraboucle 900 participe à un pont entre les sous-unités (Merryman et al., 1999b). À ce moment, les structures cristallographiques du ribosome n'étaient pas encore publiées et diverses spéculations étaient possibles quant à la structure de cette tétraboucle et à ses interactions. Notre hypothèse de départ était que la tétraboucle 900 participe à des

interactions importantes pour le contrôle de la fidélité de traduction et pour l'association entre les sous-unités. Notre outil de prédilection pour étudier la fonction des ARN ribosomique est la mutagenèse. Cependant, les techniques de mutagenèse conventionnelles sont d'une utilité limitée pour l'étude de régions hautement conservées, puisque les mutations à ces endroits sont souvent létales. Le groupe du Dr Phil Cunningham de la Wayne State University à Détroit avait mis au point une technique appelée évolution instantanée (Lee et al., 1997; Morosyuk et al., 2000; 2001b). Cette technique consiste à remplacer une portion de l'ARNr 16S par une séquence aléatoire, afin de créer simultanément toutes les séquences possibles. Les mutants fonctionnels sont ensuite sélectionnés *in vivo* en utilisant un système de ribosomes spécialisés, où la traduction d'un ARNm rapporteur codant pour la chloramphénicol acétyltransférase est assurée par les ARNr 16S mutants.

Nous avons entrepris une collaboration avec Phil Cunningham, afin d'appliquer cette technique d'évolution instantanée à l'étude de la tétraboucle 900. Dans l'étude publiée dans mon premier article, nous avons sélectionné des mutants fonctionnels de la tétraboucle 900 et nous avons étudié l'effet de ces mutations sur la fidélité de traduction et sur l'association entre les sous-unités. Les résultats de cette étude ont montré que les positions 899 et 900 de la tétraboucle 900 sont les plus importantes pour l'activité du ribosome et que les mutations de la tétraboucle 900 diminuent la fidélité de traduction et perturbent l'association entre les sous-unités. Entre-temps, les structures cristallographiques du ribosome et de ses sous-unités furent publiées. Ces structures ont montré que la tétraboucle 900 forme effectivement un motif GNRA et qu'elle interagit avec la région 768-770/809-811, à la base de l'hélice 24 (Schluenzen et al., 2000; Wimberly et al., 2000). Les positions 899 et 900 de la tétraboucle 900 sont responsables de la majorité de ces interactions. Par modélisation moléculaire, nous avons constaté que les mutations qui diminuaient le plus l'activité du ribosome sont celles qui perturbent le plus ces interactions observées dans le cristal.

Nous avons ensuite voulu savoir si l'interaction entre la tétraboucle 900 et la région 768-770/809-811 de l'hélice 24 observée dans les cristaux est une interaction fonctionnelle. Nous avons décidé d'étudier cette interaction par des expériences de complémentation génétique. Notre raisonnement était que si l'interaction entre la tétraboucle 900 et l'hélice 24 est fonctionnelle, des mutations complémentaires dans l'hélice 24 permettraient de réparer les défauts causés par les mutations dans la tétraboucle 900. Nous avons utilisé un des mutants les moins actifs de la tétraboucle 900, le mutant A900G. Nous avons appliqué la technique d'évolution instantanée à la région 768-770/809-811 de l'hélice 24 avec laquelle la tétraboucle 900 interagit. Nous avons ensuite sélectionné les mutants dont l'activité était augmentée par rapport à l'activité du mutant A900G seul. Deux mutations compensatoires ont ainsi été obtenues, toutes deux localisées dans la paire de bases 769/810 avec laquelle la position 900 interagit dans la structure cristalline de la sous-unité 30S. Ces mutations compensatoires corrigent les défauts de fidélité et d'association causés par la mutation A900. Des expériences de modélisation moléculaire ont montré que ces mutations doubles permettent de rétablir l'interaction entre la tétraboucle 900 et l'hélice 24, tout en conservant la stabilité de l'hélice 24. Cette étude, qui fut publiée dans mon deuxième article, démontre l'importance fonctionnelle de l'interaction entre la tétraboucle 900 et l'hélice 24 de l'ARNr 16S.

Puisque le ribosome est dynamique, il est possible que l'interaction avec l'hélice 24 ne soit pas la seule interaction fonctionnelle impliquant la tétraboucle 900. Dans le dernier volet de mon projet, j'ai fait des études de complémentations génétiques aléatoires, en introduisant des mutations au hasard dans la séquence complète de l'ARNr 16S et en sélectionnant celles qui complètent la mutation A900G. Les mutations ont été introduites dans le gène de l'ARNr 16S par deux méthodes indépendantes : une technique de PCR au manganèse qui favorise les erreurs, et l'utilisation d'une souche *E. coli* XL1-Red qui a un taux très élevé de mutations aléatoires. Deux mutations compensatoires furent

isolées à partir de ces bibliothèques aléatoires, toutes deux localisées dans l'hélice 1 de l'ARNr 16S. Ces mutations corrigent les défauts d'association et de fidélité causés par la mutation A900G, mais n'ont pas d'effet sur ces fonctions lorsqu'elles sont présentes seules. L'hélice 1 est située à proximité de l'hélice 27, mais trop loin de la tétaraboucle 900 pour qu'il puisse y avoir interaction directe entre ces régions, car une telle interaction nécessiterait un changement conformationnel beaucoup trop drastique. Les hélices 1 et 27 sont connectées par une structure appelée pseudonœud central. Nous suggérons que les mutations de l'hélice 1 déstabilisent le pseudonœud central, ce qui pourrait modifier l'orientation de l'hélice 27 et ainsi faciliter l'arrimage de la tétaraboucle 900 mutante à son récepteur.

Chapitre II

Functional studies of the 900 tetraloop capping helix 27 of 16S ribosomal RNA.

François Bélanger¹, Mélissa Léger¹, Ashesh A. Saraiya²,
Philip R. Cunningham² et Léa Brakier-Gingras¹.

¹Département de Biochimie
Université de Montréal
Montréal, Québec, Canada
H3T 1J4

²Department of Biological Sciences
Wayne State University
Detroit, MI, 48202, USA

Journal of Molecular Biology (2002) **320**, 979-989.

Abstract

The 900 tetraloop (positions 898-901) of *Escherichia coli* 16S rRNA caps helix 27, which is involved in a conformational switch crucial for the decoding function of the ribosome. This tetraloop forms a GNRA motif involved in intramolecular RNA-RNA interactions with its receptor in helix 24 of 16S rRNA. It is also involved in an intersubunit bridge, *via* an interaction with helix 67 in domain IV of 23S rRNA. Using a specialized ribosome system and an instant-evolution procedure, the four nucleotides of this loop were randomized and 15 functional mutants were selected *in vivo*. Positions 899 and 900, responsible for most of the tetraloop/receptor interactions, were found to be the most critical for ribosome activity. Functional studies showed that mutations in the 900 tetraloop impair subunit association and decrease translational fidelity. Computer modeling of the mutations allows correlation of the effect of mutations with perturbations of the tetraloop/receptor interactions.

Introduction

The ribosome is a dynamic entity. One well-known example of ribosome dynamics is the critical conformational switch involving helix 27 of 16S rRNA. As shown in Figure 2-1a and b, this helix is located at the subunit interface, in contact with the decoding center of helix 44 (Schluenzen et al., 2000; Wimberly et al., 2000). Helix 27 can exist in two different base-pair arrangements (Figure 1c), where bases 910-912 are paired either to bases 888-890, the 912-888 conformation, or bases 885-887, the 912-885 conformation (Lodmell & Dahlberg, 1997). The 912-888 conformation is characterized by a low affinity for tRNA in the A site and mutations favoring this form confer a hyperaccurate phenotype. Conversely, the 912-885 conformation has a high affinity for tRNA in the A site and mutations promoting this form confer an error-prone phenotype (*ram*). Mutations in the switch region of helix 27 affect reactivity to chemical attack of nucleotides distributed in many important regions of 16S rRNA such as the 530 stem-loop, helix 34 and helix 44 (Lodmell & Dahlberg, 1997). Moreover, cryo-electron microscopy revealed that the helix 27 switch is accompanied by large-scale rearrangements in both subunits (Gabashvili et al., 1999b), stressing the importance of this switch in ribosomal dynamics. The two conformations of helix 27 correspond to two different states of the ribosome during tRNA selection, but it is not known in which order these states occur. The crystal structure of the 30S subunit has the 912/885 conformation (Schluenzen et al., 2000; Wimberly et al., 2000).

During the elongation cycle of protein synthesis, an incoming aminoacyl-tRNA encounters the ribosome as a ternary complex with elongation factor EF-Tu and GTP. Control of tRNA selection occurs in two stages: initial selection prior to GTP hydrolysis, and proofreading after GTP hydrolysis but before accommodation in the A site and peptide bond formation (reviewed in Rodnina & Wintermeyer, 2001). Kinetic studies suggest that the decoding region alternates between a “binding” state and a “productive” state during tRNA selection (Pape et al., 2000b). In this model, the binding state is present during the

initial tRNA selection step and the codon-anticodon interaction is monitored by nucleotides A1492 and A1493, in the decoding center on top of helix 44, and by G530, in the loop capping helix 18 of 16S rRNA (Yoshizawa et al., 1999; Carter et al., 2000; Ogle et al., 2001). Selection of the correct aminoacyl-tRNA triggers a conformational rearrangement to the productive conformation. This rearrangement consists of a complex network of conformational changes, including the helix 27 switch, and is required for the accommodation of the incoming aminoacyl-tRNA in the A site. An attractive hypothesis is that the binding state corresponds to the hyperaccurate 912/888 conformation and the productive state to the error-prone 912/885 conformation (Pape et al., 2000a). Alternatively, it was proposed that the binding state could correspond to the 912/885 conformation (error-prone) and codon-anticodon interaction would cause the ribosome to switch to the 912/888 (hyperaccurate) conformation for proofreading control (Lodmell & Dahlberg, 1997).

Our aim was to investigate the role of the 900 tetraloop capping helix 27, a GNRA tetraloop (where N is any nucleotide and R is a purine) with an extremely conserved GCAA sequence. GNRA tetraloops are abundant in naturally occurring RNAs (Woese et al., 1990) and are involved in specific RNA-RNA interactions by docking in the shallow groove of other RNA motifs called receptors (reviewed in Conn & Draper, 1998; Moore, 1999; Westhof & Fritsch, 2000). Crystal structures of the 30S subunit show that the 900 tetraloop has the structure of a classical GNRA tetraloop, where G898 and A901 are involved in a non Watson-Crick base-pair (Schluenzen et al., 2000; Wimberly et al., 2000). Figure 2-1b shows the crystal structure of helix 27 and the neighboring regions with which it interacts, including the decoding center in helix 44, the receptor of the 900 tetraloop in the 770/810 region of helix 24 and helix 45. Moreover, the 70S crystal structure showed that the 900 tetraloop and its receptor in helix 24 are involved in an intersubunit bridge, B2c (Yusupov et al., 2001). This intersubunit bridge is also observed by cryo-electron microscopy (Gabashvili et al., 2000) and its existence is supported by protection studies (Merryman et

al., 1999b). To determine which bases of the 900 tetraloop are most important for ribosome activity, we studied this loop with the instant-evolution procedure (Lee et al., 1997; Morosyuk et al., 2000; 2001a; 2001b). Random mutations were introduced at the four positions of the tetraloop and functional mutants were selected *in vivo*, using a specialized ribosome system (Morosyuk et al., 2001b). We observed that the 900 tetraloop mutations impair subunit association and confer an error-prone phenotype. Computer modeling was used to assess how these mutations affect the tetraloop structure and its interaction with its receptor.

Results

Phylogenetic analysis of the 900 tetraloop

The 900 tetraloop is among the most conserved regions of rRNA. Table 2-1 presents a phylogenetic analysis of this tetraloop. Analysis of 13,005 prokaryotic 16S rRNA sequences revealed that each position is conserved over 99.5%. Every possible substitution is found at each of the four positions, but their frequency is very low and GCAA is the only consensus sequence. A similar pattern is found with the 4635 eukaryotic sequences that we analyzed. While some mutations found in the sequence database may result from sequencing errors, most identical mutant sequences were found only in related organisms, suggesting that they are true mutations originating from a common ancestor. The number of substitutions is too small to reveal any possible covariation within the tetraloop, but the large variety of the natural substitutions, along with their very low frequency, is consistent with a role of this region in RNA-RNA interactions. Since a mutation in a region involved in RNA-RNA interactions needs to be compensated by a mutation in the partner region, it will be very infrequent in nature. The low number of natural mutations in the 900 tetraloop

did not allow us to detect any covariation between the tetraloop and its receptor in the 770/810 region.

Selection of 900 tetraloop mutants

Mutations in regions involved in important RNA-RNA interactions are usually lethal and cannot be studied *in vivo* with conventional methods. In order to study the structure and function of the 900 tetraloop, we used the instant-evolution procedure (Lee et al., 1997; Morosyuk et al., 2000; 2001a; 2001b), which consists of randomizing the four positions of the 900 tetraloop and selecting for functional sequences *in vivo*. The selection of mutants and the assessment of their activity was done with a specialized ribosome system (Morosyuk et al., 2001b). This system uses pRNA123, a plasmid coding for the *rrnB* operon under control of an inducible *lacUV5* promoter, and for two reporter genes, the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) and the green fluorescent protein (GFP). The messenger binding site (MBS) of the plasmid-encoded 16S rRNA and the ribosome binding sites (RBS) of the reporter messengers are modified so that ribosomes containing plasmid-encoded 16S rRNA can bind to and translate the CAT and GFP mRNAs exclusively, which cannot be translated by ribosomes containing the chromosome-encoded 16S rRNA. Thus, the level of CAT and GFP reflects directly the activity of the ribosomes containing plasmid-encoded 16S rRNA, and mutations in the plasmid-encoded 16S rRNA sequence affect only the levels of CAT and GFP, without perturbing cell growth. Expression of the CAT gene confers resistance to chloramphenicol and can thus be used to select functional mutants in 16S rRNA in the presence of the drug. The production of GFP is measured readily by a fluorescence assay in whole cells, allowing for rapid and accurate quantification of mutant activity.

Random mutagenesis was applied to the four positions of the 900 tetraloop. A large number of transformants were produced and functional mutants were selected on the basis of chloramphenicol resistance. A total of 60 clones were picked at chloramphenicol concentrations of 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ (the minimal inhibitory concentration of chloramphenicol for the wild-type sequence is 600 $\mu\text{g/ml}$). These concentrations of chloramphenicol were found empirically to allow the selection of mutants with a wide range of activities, including low activity mutants. The clones were sequenced and 15 different mutant sequences were found. Most of the sequences occurred more than once, suggesting that the majority of the functional mutants had been isolated.

Table 2-2 presents the sequences and GFP activities of the 15 functional mutants. Clones with identical sequences gave identical GFP activities and the values in Table 2-2 indicate the mean activity of all the identical clones. The activity of the mutants covers a large range of values, but all mutants have a lower activity than the wild-type and, for several of them, the activity is very low. In fact, most mutations would likely be lethal in a non-specialized system. Eight mutants are single-site and seven are double-site. A comparable number of substitutions is found at all four positions but single mutations at positions 898 and 901 have relatively mild effects on the ribosomal activity, reducing activity to 39-56% of wild-type, whereas mutations at positions 899 and 900, the positions responsible for most interactions with the receptor, reduced activity to 9-26% of wild-type. Some substitutions are not tolerated. No C was found at position 898 or 900, and no U at position 899 or 901 in the single mutants. These substitutions are found in natural isolates (see Table 2-1), but with additional sequence variations, compared to *E. coli* 16S rRNA. For some double mutants, the activity is higher than would be predicted if the effect of each mutation was independent. For example, the single mutations G898U and A901G decreased activity to 56 and 39% of wild-type, respectively, while the double mutation G898U/A901G has an activity of 34%, supporting the known interaction between positions 898 and 901. Also, the A900C mutation, which was not found in the single mutants, is

found in double mutants C899A/A900C and C899G/A900C, suggesting an interplay between positions 899 and 900.

Functional studies of the 900 tetraloop mutants

The 900 tetraloop has two interesting characteristics: it caps helix 27, where a conformational switch is involved in the control of translational accuracy, and it is part of an intersubunit bridge, B2c. To gain additional information on the functional role of the 900 tetraloop, we investigated whether mutations in this tetraloop affect subunit association and translational fidelity. The effect of mutations in the 900 tetraloop on subunit association was studied by measuring the proportion of plasmid-encoded 16S rRNA in free 30S subunits, 70S ribosomes and polysomes fractionated from lysates of bacteria expressing mutant ribosomes. The proportion of the plasmid-encoded mutant 16S rRNA in each fraction was assessed by primer extension (Sigmund et al., 1988). For the wild-type sequence, a silent C1192U marker mutation, which does not affect subunit association, was introduced in the 16S rRNA gene (Sigmund et al., 1988; Lee et al., 1997). We assayed four representative mutants covering the range of activities that were observed (Table 2-3). For each mutant investigated, the proportion of plasmid-encoded mutant 16S rRNA was similar to that of wild-type in total cellular RNA. However, the proportion of mutant 16S rRNA in the 70S and polysome fractions was reduced when the GFP activity of the mutant decreases, suggesting that the 900 tetraloop mutants are defective in subunit association and that the detrimental effect of the 900 tetraloop mutations on protein synthesis results from this impairment of subunit association. An alternative explanation for the decreased proportion of mutant 16S rRNA in the 70S and polysome fractions could be that the mutant 30S are misassembled and that only a subpopulation of these mutant 30S succeeds in correctly assembling and thus in associating with the 50S subunits. Although this interpretation cannot be ruled out, the location of the 900 tetraloop at the subunit interface

and its involvement in an intersubunit bridge strongly support a subunit association defect. However, the mutant 30S subunits that are associated to the 50S subunits and are present in the polysomes have an activity defect. Indeed, examination of Table 2-3 reveals that the activity of the mutants is lower than what would be expected if it was directly proportional to the amount of mutant 30S subunits in the polysomes.

The same 900 tetraloop mutations that were studied for their effect on subunit association were investigated for their effect on translational fidelity by measuring how they influence the frequency of readthrough of stop codons and the frequency of frameshift errors. We first constructed pRNA_{luc2}, a pRNA₁₂₃-related plasmid, which contains a gene coding for the firefly luciferase, a very sensitive reporter gene, instead of the GFP and the CAT reporter genes. A mutation in the beginning of the coding sequence of the luciferase gene introduced an *Nsi*I restriction site that was used for the insertion of cassettes containing either nonsense or frameshift mutations. With these insertions, the synthesis of luciferase requires either a readthrough or a frameshift event and the level of luciferase produced parallels the frequency of miscoding events. Table 2-4 presents the results that were obtained. For all mutants, the readthrough level of UAG and UGA stop codons was increased in parallel with the decrease in protein synthesis that had been shown by measuring the GFP activity. The same 900 tetraloop mutations also increased -1 frameshifting, indicating that the mutations affect translational fidelity in general and not only the termination step.

Computer modeling of the 900 tetraloop mutants

The effect of 900 tetraloop mutations on ribosome activity can be analyzed in the light of the crystal structure of the 30S subunits (Wimberly et al., 2000). The 900 tetraloop forms a complex network of interactions, inside the loop itself, with its receptor in the

770/810 region of helix 24 and with helix 45 of 16S rRNA (Figure 2-2a). G898 and A901 are paired and C899, A900 and A901 are stacked, with their Watson-Crick edges pointing outside and interacting with the receptor, in the shallow groove of the 770/810 region at the base of helix 24. Positions 899 and 900 (the N and the R of the GNRA sequence) are responsible for most of the interactions with the receptor, accounting for the strong effect of mutations at these positions. The backbones of positions 900 and 901 in the 900 tetraloop and that of positions 770 and 771 in the 770/810 region contact the backbone of positions 1832-1833 in helix 67 of domain IV of 23S rRNA, thus forming bridge B2c (Yusupov et al., 2001). Moreover, the 2'OH of nucleotide 901 makes an interaction with the phosphate of A1513 of helix 45 of 16S rRNA, a helix whose capping loop also contributes with a portion of helix 24 to an intersubunit bridge, B2b, by interacting with helices 69 and 71 in domain IV of 23S rRNA (Yusupov et al., 2001).

Figure 2-2b presents the detailed structure of the G898-A901 base-pair. These two positions form a trans-Hoogsteen-shallow groove base-pair where the N2 of G898 interacts with the phosphate and N7 of A901. The N6 and N7 of position A900 make intra-loop contacts with the 2'OH of nucleotide G898, thus stabilizing the folding of the loop. A901 makes only one contact with the receptor, between its N6 and the 3'O of C811. The 2'OH of A901 contacts the phosphate of A1513 in the stem of helix 45. The N3 of C899 (Figure 2-2c) interacts with the 2'OH of C770 and its N4 with the O2 of C770 and the O2 and 2'OH of C810. The N1 of A900 (Figure 2-2d) interacts with the N2 of G769, and its N6 with the 4'O of C811.

We introduced representative 900 tetraloop mutations in the crystal structure of the 30S subunit and examined the effect of these substitutions on the interactions with the receptor. Single mutations C899A and C899G are presented in Figure 2-3a and b. Replacement of C899 with a purine produces an important steric clash and these mutations can only be accommodated in the receptor at the cost of some displacement of this

nucleotide. Such a steric clash may have deleterious effects on the tetraloop/receptor interactions, although accommodation is possible, since position 899 corresponds to the variable (N) position of a GNRA tetraloop, which is known to be the most flexible position (Nowakowski & Tinoco, 1999). The C899G mutation (Figure 2-3a) allows only interactions with the receptor that are very different from those of the wild-type and are likely unfavorable, judging by the weak activity of this mutant (14%). The C899A mutation (Figure 2-3b) can allow interactions with the receptor that are similar to those of the wild-type, explaining why this mutant is significantly more active than C899G (25% compared to 14%).

Figure 2-3c and d shows mutations A900G and A900U. A900G is the most deleterious single mutation selected (9%). The N1-H of G900 produces a steric clash with the N2 of G769 and needs to be displaced slightly in order to fit in the receptor. Interactions with C811 and G898 are lost, and, moreover, the flexibility of position 900 is low, since it is stacked between positions 899 and 901. Interactions between G900 and G769 are still possible but they differ from the wild-type, which may be a disadvantage. In the A900U mutant, interactions with G769 and the ribose of C811 are lost, but this mutation does not produce the steric clash observed in the A900G mutant, and therefore probably results in less distortion of the loop. This could explain why the A900G mutant has significantly less activity than that observed in the A900U mutant (26%). The A900C substitution was not found as a single mutation, but combined with mutations at position 899 (C899A or C899G). The resulting double mutant (modeling not shown) has an activity comparable to the corresponding single 899 mutant, suggesting an interdependence between positions 899 and 900. C900 could form interactions similar to those made by the wild-type A900, but the tetraloop would then need to be displaced. This displacement of the loop could be favorable to mutations at position C899, which also need to be displaced to fit in the receptor (see above).

Mutants in the G898-A901 pair conserve the highest level of activity. Figure 2-4 shows the modeled structure of the two double mutants of the G898-A901 base-pair. For mutant G898U/A901G, the activity is higher than predicted if the effect of each mutation was independent, suggesting an interaction between U898 and G901. Computer modeling shows that U898 and G901 can interact, provided nucleotide 901 is changed to a *syn* conformation (Figure 2-4a). This would allow formation of a U·G pair similar to that seen in UNCG tetraloops (Nowakowski & Tinoco, 1999). Interestingly, it is known that UNCG and GNRA tetraloops can be functionally interchangeable (Selinger et al., 1993). As for the G898A/A901C double mutant, where the effects of the two mutations are additive, there are no possible compensatory interaction between A898 and C901 (Figure 2-4b). However, there is still an interaction between A901 and the ribose of C811 of the receptor, albeit different from that seen in the wild-type.

Computer modeling can account for the effects of most of the 900 tetraloop mutations. However, while crystal structures are static pictures, the ribosome is a highly dynamic entity and alternate interactions can take place during protein synthesis. As an example, potential base-triples between the closing pair of the 900 tetraloop (positions 897 and 902) and either base 774 or 805 of helix 24 were predicted by novel statistical methods (Kelley et al., 2000). These interactions are not seen in the crystal structure of the 30S subunit, but cannot be excluded.

Discussion

Functional studies showed that mutations in the 900 tetraloop impair subunit association and translational fidelity, and computer modeling suggests that the effect of the mutations can be related to conformational changes in the loop and perturbations of the interactions between this loop and its receptor in helix 24 of 16S rRNA. The sequence of

events leading to the formation of several intersubunit bridges when ribosomal subunits associate is not well-known. Both subunits undergo conformational changes (Gabashvili et al., 2000; Yusupov et al., 2001), and it is likely that mutations at strategic positions directly perturb the formation of specific bridges but also interfere with conformational changes required for the formation of other bridges. We hypothesize that the 900 tetraloop is one of these strategic regions. Consequently, only a subpopulation of 30S subunits mutated in the 900 tetraloop succeeds in making the required conformational changes and in associating to the 50S subunits. Moreover, the activity of the mutants does not mirror the amount of mutant 30S in the polysomes, indicating that the mutant 30S subunits that are associated to the 50S subunits have an impaired activity. The less active mutants are mutated at positions 899 and 900, which control most of the interactions with the receptor, and these mutants are the most impaired in subunit association and translational accuracy. We can thus deduce that correct docking of the 900 tetraloop into its receptor on the 16S is important for functional intersubunit interaction. We suggest that, in the mutant 30S subunits that are associated to the 50S subunits, perturbations in the tetraloop/receptor interactions distort bridge B2c. This bridge could be involved in an intersubunit cross-talk required for accommodation of the incoming tRNA in the A site, and mutations in the 900 tetraloop could impair this intersubunit communication, which could account for the activity defect of the mutant 70S ribosomes. Intuitively, we would have predicted that such an impairment of the communication between the subunits would cause a hyperaccurate phenotype, since ribosomes then have more time for rejecting incorrect tRNAs before these tRNAs can be accommodated in the A site. What we observe, however, is the opposite phenotype: the mutants for which the association defect is the largest have the largest decrease in translational accuracy. Thus, if 900 tetraloop mutations impair the intersubunit cross-talk, which is very likely, other effects can mask the influence of this impairment on translational fidelity and contribute to decrease translational fidelity.

Various explanations can be put forward to explain how mutations in the 900 tetraloop decrease translational accuracy. These mutations, when perturbing bridge B2c through a distortion of loop-receptor interactions, could perturb the conformation of domain IV of 23S rRNA, a domain involved in most of the intersubunit bridges and, along with domain V, in many of the contacts with A-site, P-site and E-site tRNAs. Perturbations in domain IV could affect translational fidelity by increasing non-specific contacts with the incoming tRNA. In support of this possibility, it was observed that translational fidelity was decreased by mutations in the 1916 loop of domain IV (O'Connor & Dahlberg, 1995). This loop, which is involved in the formation of intersubunit bridges B2a and B2b through contacts with helix 44 and 45 of 16S rRNA, interacts with A-site and P-site tRNAs (Yusupov et al., 2001). Another possibility to account for the decrease in translational fidelity of ribosomes with mutated 900 tetraloop is that the same mutations that perturb the conformation of the tetraloop and tetraloop-receptor interactions promote a shift of helix 27 to the error-prone conformation. Ribosomal protein S12 is a likely candidate to contribute to this shift. Indeed, S12 makes a number of protein-protein and protein-RNA contacts (Schluzen et al., 2000; Wimberly et al., 2000; Brodersen et al., 2002), among which an interaction with the switch region of helix 27, and S12 binding to 16S rRNA is known to affect the conformation of the 900 tetraloop (Stern et al., 1988b). We can hypothesize that, conversely, mutations in the 900 tetraloop could perturb the interaction of S12 with the switch region and facilitate the shift to the error-prone conformation. A third possibility is that mutations in the 900 tetraloop could influence the decoding center and tRNA binding *via* the interaction of this tetraloop with helix 45. The capping loop of helix 45 interacts indeed with the decoding center in helix 44, and changes in this interaction were found to impair ribosome function (Vila-Sanjurjo & Dahlberg, 2001).

Movements of the decoding center also occur during translocation (Frank & Agrawal, 2000; VanLoock et al., 2000) and the helix 27 switch is likely involved in these conformational rearrangements, although the mechanism through which the switch affects

translocation is not clear (Lodmell & Dahlberg, 1997). Mutations in the 900 tetraloop could impair translocation *via* an effect on the helix 27 switch and/or a perturbation of the intersubunit bridge B2c, and such an impairment could contribute to the decreased activity of the mutant ribosomes. It is worth recalling here that agents that promote translation errors such as aminoglycosides antibiotics also interfere with translocation, stressing the interplay between the control of translation fidelity and translocation (Davies & Davis, 1968; Cundliffe, 1990).

In conclusion, random mutagenesis of the 900 tetraloop of 16S rRNA and analysis of the functional mutants show the importance of the tertiary interactions between the tetraloop and its receptor for the function of the ribosome. The tetraloop is not passively capping helix 27 but is actively involved in protein synthesis. Its contribution to subunit association and to the control of translational fidelity is in full agreement with its location in proximity of the decoding center and as a part of an intersubunit bridge. GNRA tetraloops are the most abundant capping loops in the rRNA and the elucidation of crystal structure of the ribosome has characterized the tertiary interactions in which they are involved. Mutagenesis of rRNA provides an important tool to investigate the role of these interactions in protein synthesis.

Materials and methods

Reagents

Restriction enzymes were from New England Biolabs, Fermentas and Pharmacia. Calf intestine alkaline phosphatase, T4 polynucleotide kinase and AMV reverse transcriptase were from Pharmacia and T4 DNA ligase was from Fermentas. DNA sequencing reactions were done with the Pharmacia T7 sequencing kit, using the T7

sequenase v2.0 from Pharmacia. Oligonucleotides were purchased from Gibco-BRL and Biocorp Inc.

Bacterial strains and plasmids

All plasmids were maintained and expressed in *E. coli* XL1-Blue or, when indicated, in MC140, a kind gift from Dr. Michael O'Connor (Brown University, Providence, RI). All cultures were grown in LB medium with 100 µg/ml ampicillin and 12.5 µg/ml tetracycline (LB-Ap100-Tc12.5) for XL1-Blue, and ampicillin only for MC140. The synthesis of plasmid-encoded rRNA was induced by addition of isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) to a final concentration of 1 mM. Transformations were done either by electroporation, using a Bio-Rad *E. coli* Pulser, or by a standard chemical method. Plasmid pRNA123, which was used to introduce mutations in the 900 tetraloop, was described elsewhere (Morosyuk et al., 2001b). It contains a copy of the *rrnB* operon from pKK3535 under regulation of the *lacUV5* promoter, and the CAT and GFP genes, each one under the control of a constitutive tryptophan promoter. The RBS of both CAT and GFP messengers have been changed to 5'-AUGCC and the MBS of the 16S rRNA has been changed to 5'-GGGAU. Plasmid pRNAluc2 has the same key features as pRNA123, except that it contains only one reporter gene, coding for the firefly luciferase. The luciferase gene was cloned from plasmid pGEM-luc (Promega). An *Nsi*I restriction site was created in the beginning of the luciferase coding sequence, between the initiator AUG and the second codon, and was used for the insertion of stop codon and frameshift cassettes. The sequence of the complementary oligonucleotides for the cassettes was as follows: for UAG, the upper strand was 5'-TGGGTATCTTTAGCTACGGGGCCCTAATGTGCA-3' and the lower strand, 5'-CATTAGGGCCCCGTAGCTAAAGATACCCATGCA-3'; for UGA, the upper strand was 5'-TGGGTATCTTTGACTACGGGGCCCTAATGTGCA-3' and the lower strand, 5'-CATTAGGGCCCCGTAGTCAAAGATACCCATGCA-3'. The nonsense

codons are in bold. For the -1 frameshift, the upper strand was 5'-TAGCTTGGG*ATAAGGATTCCCGTGCA-3' and the lower strand, 5'-CGGGAATCCTTAT*CCCAAGCTATGCA-3'. The frameshift cassette is such that only ribosomes that make a -1 frameshift synthesize luciferase. The asterisk indicates the position where or before which the frameshift must occur for luciferase to be produced.

Random mutagenesis of the 900 tetraloop and selection of functional mutants

Random mutagenesis of the 900 tetraloop was performed by PCR with two primers, and two *ApaI* restriction sites were used for cloning. The forward primer, 5'-TTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTAAACCNNNNGGCCGTA**CTCCCC**AGG-3', was designed to encompass the first *ApaI* restriction site (in bold) and the 900 region sequence in the 16S rRNA gene of pRNA123, and the sequence corresponding to the 900 tetraloop was randomized (underlined; N = A, T, C, and G). The reverse primer, 5'-GCTGTTAGCGGGCCCATTAAGTTC-3', encompassed the second *ApaI* restriction site (in bold), outside the *rrnB* operon. The PCR fragments were subcloned in pRNA123, using the two *ApaI* restriction sites. A pool of approximately 4000 transformants was obtained, the plasmids were purified by a large scale purification, and the pool of random plasmids was retransformed in the XL1-Blue strain. Transformants were grown in LB-Amp100-Tc12.5 and induced with 1mM IPTG for three and a half hours, before plating on LB-Amp100-Tc12.5 + 1 mM IPTG, with and without chloramphenicol. A total of 60 transformants which grew in the presence of chloramphenicol were randomly picked and sequenced.

GFP assays and luciferase assays

Overnight cultures from plasmid-containing cells grown in LB-Ap100-Tc12.5 were diluted to an optical density at 600 nm of 0.1 in 1 ml and incubated for one hour at 37°C under agitation. The cultures were then induced by adding IPTG to 1 mM and incubated for another five hours at 37°C for GFP and three and a half hours at 30°C for luciferase assays. The plasmids were pRNA123 and its derivatives mutated in the 900 tetraloop for GFP assays, and pRNALuc2 (or the derivatives with stop codon and frameshift cassettes) and its derivatives mutated in the 900 tetraloop for luciferase assays. These 900 tetraloop mutants of pRNALuc2 had been obtained by replacing the *ApaI-ApaI* fragment of pRNALuc2 with the corresponding fragment from mutant pRNA123. For GFP assays, cells were harvested by centrifugation, the pellet washed three times with 500 μ l HN buffer (20 mM HEPES-NaOH (pH 7.2), 145 mM NaCl) and resuspended in 1 ml HN buffer. Fluorescence was measured using a Packard FluoroCount plate reader at an excitation wavelength of 395 nm and an emission wavelength of 509 nm. Fluorescence activities were normalized for an equal number of cells and expressed as a percent of the activity with a wild-type 16S rRNA. For luciferase assays, 45 μ l of cultured cells were mixed with 5 μ l of buffer K (1 M K_2HPO_4 (pH 7.8), 20 mM EDTA, 1 mM benzamidine), followed by one cycle of freeze-thaw. Fifty microliters of lysozyme solution (5 mg/ml lysozyme in 1/10 buffer K) and 100 μ l of lysis solution (50 mM Tris-phosphate (pH 7.8), 4 mM DTT, 4 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol, 2% (v/v) Triton X-100) were then added to each sample, followed by incubation at room temperature for at least 10 minutes. Luciferase activities were measured with an EG&G Berthold Lumat LB9507 luminometer, with 2 μ l aliquots added to 50 μ l of a commercial luciferase assay reagent (Promega). The luciferase activities were normalized for an equal number of cells and the readthrough or frameshift level was calculated by dividing the luciferase activity of the stop codon or frameshift construct by that of the wild-type luciferase construct.

Analysis of mutant 16S rRNA distribution

Cells containing pRNA123 and its mutant derivatives were induced for three and a half hours, and ribosomal particles were isolated from cellular lysates prepared by freezing and thawing, as described (Ron et al., 1966). Lysates were applied onto a 15% to 40% (w/v) linear sucrose gradient in 20 mM Tris-HCl (pH 7.8), 5 mM MgCl₂, 100 mM NH₄Cl, 2 mM DTT, and centrifuged at 20,000 rpm for 20 hours in a Beckman SW28 rotor at 4°C. Fractions containing 30S subunits, 70S ribosomes and polysomes were collected using an ISCO gradient fractionator, and RNA was isolated from appropriate fractions and crude lysate by extraction with phenol. The proportion of plasmid and host-encoded 16S rRNA was determined by primer extension (Sigmund et al., 1988; Lee et al., 1997). For the plasmid with a wild-type tetraloop, a C to U mutation was introduced at position 1192 in the 16S rRNA sequence. The primers used were, for the wild-type sequence, 5'-CGTAAGGGCCATGATGACTTGA-3', which is complementary to nucleotides 1194 to 1215, and, for the mutants, 5'-CAATTCATTTGAGTTTTAAC-3', which is complementary to nucleotides 903 to 922. The resulting DNA fragments were resolved on a 20% (w/v) polyacrylamide gel. The relative band intensities from lightly exposed films (Biomax MR) were scanned and quantified using NIH Image 1.62.

Computer modeling

Mutations were inserted in the 30S subunit structure using Insight II (MSI, USA). Figures were prepared with WebLab ViewerPro 4.0 (MSI, USA).

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research to L.B.-G. and by NIH grants GM55745 and GM 52896 to P.C. We are grateful to François Dragon, Francis Robert and Sergey Steinberg for critical reading of this manuscript. We thank Sergey Steinberg and Matthieu Gagnon for their help with computer modeling.

Abbreviations

CAT: chloramphenicol acetyltransferase; GFP: green fluorescent protein; IPTG: isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside; MBS: messenger binding site; RBS: ribosome binding site.

References

- Brodersen D. E., Clemons W. M., Jr., Carter A. P., Wimberly B. T. and Ramakrishnan V. 2002. Crystal structure of the 30 S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16 S RNA. *J Mol Biol* 316:725-768.
- Carter A. P., Clemons W. M., Brodersen D. E., Morgan-Warren R. J., Wimberly B. T. and Ramakrishnan V. 2000. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* 407:340-348.
- Conn G. L. and Draper D. E. 1998. RNA structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8:278-285.

- Cundliffe E. 1990. Recognition sites for antibiotics within rRNA. In: Hill WE, Dahlberg A, Garrett RA, Moore PB, Schlessinger D, Warner JR, eds. *The Ribosome: Structure, Function and Evolution*. Washington, DC: ASM Press. pp 479-490.
- Davies J. and Davis B. D. 1968. Misreading of ribonucleic acid code words induced by aminoglycoside antibiotics. The effect of drug concentration. *J Biol Chem* 243:3312-3316.
- Frank J. and Agrawal R. K. 2000. A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature* 406:318-322.
- Gabashvili I. S., Agrawal R. K., Grassucci R., Squires C. L., Dahlberg A. E. and Frank J. 1999. Major rearrangements in the 70S ribosomal 3D structure caused by a conformational switch in 16S ribosomal RNA. *EMBO J.* 18:6501-6507.
- Gabashvili I. S., Agrawal R. K., Spahn C. M., Grassucci R. A., Svergun D. I., Frank J. and Penczek P. 2000. Solution structure of the *E. coli* 70S ribosome at 11.5 Å resolution. *Cell* 100:537-549.
- Gutell R. R. 1996. Comparative sequence analysis and structure of 16S and 23S rRNA. In: Zimmermann RA, Dahlberg A, eds. *Ribosomal RNA: Structure, Evolution, Processing and Function in Protein Biosynthesis*. Boca Raton: CRC. pp 111-128.
- Kelley S. T., Akmaev V. R. and Stormo G. D. 2000. Improved statistical methods reveal direct interactions between 16S and 23S rRNA. *Nucleic Acids Res* 28:4938-4943.
- Lee K., Varma S., SantaLucia J., Jr. and Cunningham P. R. 1997. *In vivo* determination of RNA structure-function relationships: analysis of the 790 loop in ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* 269:732-743.
- Lodmell J. S. and Dahlberg A. E. 1997. A conformational switch in *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA during decoding of messenger RNA. *Science* 277:1262-1267.
- Merryman C., Moazed D., McWhirter J. and Noller H. F. 1999. Nucleotides in 16S rRNA protected by the association of 30S and 50S ribosomal subunits. *J. Mol. Biol.* 285:97-105.
- Moore P. B. 1999. Structural motifs in RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 68:287-300.

- Morosyuk S. V., Cunningham P. R. and SantaLucia J., Jr. 2001a. Structure and function of the conserved 690 hairpin in *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA. II. NMR solution structure. *J. Mol. Biol.* 307:197-211.
- Morosyuk S. V., Lee K., SantaLucia J., Jr. and Cunningham P. R. 2000. Structure and function of the conserved 690 hairpin in *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA: analysis of the stem nucleotides. *J. Mol. Biol.* 300:113-126.
- Morosyuk S. V., SantaLucia J., Jr. and Cunningham P. R. 2001b. Structure and function of the conserved 690 hairpin in *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA. III. Functional analysis of the 690 loop. *J. Mol. Biol.* 307:213-228.
- Mueller F., Stark H., van Heel M., Rinke-Appel J. and Brimacombe R. 1997. A new model for the three-dimensional folding of *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA. III. The topography of the functional centre. *J Mol Biol* 271:566-587.
- Nowakowski J. and Tinoco I., Jr. 1999. RNA structure in solution. In: Neidle S, ed. *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure*. New York: Oxford University Press. pp 567-602.
- O'Connor M. and Dahlberg A. E. 1995. The involvement of two distinct regions of 23 S ribosomal RNA in tRNA selection. *J Mol Biol* 254:838-847.
- Ogle J. M., Brodersen D. E., Clemons W. M., Jr., Tarry M. J., Carter A. P. and Ramakrishnan V. 2001. Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science* 292:897-902.
- Pape T., Stark H., Matadeen R., Orlova E. V. and van Heel M. 2000a. Visualization of the translational elongation cycle by cryo-electron microscopy. In: Garrett RA, Douthwaite SR, Liljas A, Matheson AT, Moore PB, Noller HF, eds. *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics and Cellular Interactions*. Wahington, DC: ASM Press. pp 37-44.
- Pape T., Wintermeyer W. and Rodnina M. V. 2000b. Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome. *Nature Struct. Biol.* 7:104-107.

- Rodnina M. V. and Wintermeyer W. 2001. Fidelity of aminoacyl-tRNA selection on the ribosome: kinetic and structural mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* 70:415-435.
- Ron E. Z., Kohler R. E. and Davis B. D. 1966. Polysomes extracted from *Escherichia coli* by freeze-thaw-lysozyme lysis. *Science* 153:1119-1120.
- Schlutzen F., Tocilj A., Zarivach R., Harms J., Gluehmann M., Janell D., Bashan A., Bartels H., Agmon I., Franceschi F. and Yonath A. 2000. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution. *Cell* 102:615-623.
- Selinger D., Liao X. and Wise J. A. 1993. Functional interchangeability of the structurally similar tetranucleotide loops GAAA and UUCG in fission yeast signal recognition particle RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5409-5413.
- Sigmund C. D., Ettayebi M., Borden A. and Morgan E. A. 1988. Antibiotic resistance mutations in ribosomal RNA genes of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 164:673-690.
- Stern S., Powers T., Changchien L. M. and Noller H. F. 1988. Interaction of ribosomal proteins S5, S6, S11, S12, S18 and S21 with 16 S rRNA. *J. Mol. Biol.* 201:683-695.
- VanLoock M. S., Agrawal R. K., Gabashvili I. S., Qi L., Frank J. and Harvey S. C. 2000. Movement of the decoding region of the 16 S ribosomal RNA accompanies tRNA translocation. *J. Mol. Biol.* 304:507-515.
- Vila-Sanjurjo A. and Dahlberg A. E. 2001. Mutational analysis of the conserved bases C1402 and A1500 in the center of the decoding domain of *Escherichia coli* 16 S rRNA reveals an important tertiary interaction. *J Mol Biol* 308:457-463.
- Westhof E. and Fritsch V. 2000. RNA folding: beyond Watson-Crick pairs. *Structure Fold. Des.* 8:R55-65.
- Wimberly B. T., Brodersen D. E., Clemons W. M., Jr., Morgan-Warren R. J., Carter A. P., Vornrhein C., Hartsch T. and Ramakrishnan V. 2000. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* 407:327-339.
- Woese C. R., Winker S. and Gutell R. R. 1990. Architecture of ribosomal RNA: constraints on the sequence of "tetra-loops". *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8467-8471.

Yoshizawa S., Fourmy D. and Puglisi J. D. 1999. Recognition of the codon-anticodon helix by ribosomal RNA. *Science* 285:1722-1725.

Yusupov M. M., Yusupova G. Z., Baucom A., Lieberman K., Earnest T. N., Cate J. H. and Noller H. F. 2001. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* 292:883-896.

Table 2-1 : Nucleotide distribution in the 900 tetraloop in prokaryotes and eukaryotes.

A. Nucleotide distribution in prokaryotes				
Position	898	899	900	901
A	12	11	<u>12957</u>	<u>12983</u>
C	41	<u>12985</u>	27	12
G	<u>12944</u>	5	13	5
U	8	4	8	5

B. Nucleotide distribution in eukaryotes				
Position	898	899	900	901
A	37	2	<u>4626</u>	<u>4633</u>
C	10	<u>4629</u>	5	1
G	<u>4582</u>	2	3	0
U	6	2	1	1

Sequence alignments were done using the *Ribosomal Database Project II* (<http://rdp.cme.msu.edu>). The *E. coli* sequence is underlined.

Table 2-2 : Sequence and GFP activities of functional mutants of the 900 tetraloop.

A. Single-site mutants					B. Double-site mutants				
GFP activity (% of WT)	Position				GFP activity (% of WT)	Position			
	898	899	900	901		898	899	900	901
100	G	C	A	A	100	G	C	A	A
56 ± 4	U	C	A	A	34 ± 1	U	C	A	G
46 ± 2	A	C	A	A	22 ± 1	A	C	A	C
44 ± 2	G	C	A	C	19 ± 1	G	A	C	A
39 ± 4	G	C	A	G	15 ± 1	G	C	U	G
26 ± 1	G	C	U	A	12 ± 1	G	G	U	A
25 ± 2	G	A	A	A	10 ± 1	G	G	C	A
14 ± 1	G	G	A	A	8 ± 1	G	A	G	A
9 ± 1	G	C	G	A					

Mutated positions are boxed. Mutants are ordered by decreasing GFP activities. GFP activities are expressed in percent of wild-type (WT) activity and are the means ± standard deviation of three to five independent experiments.

Table 2-3 : Distribution of plasmid-encoded 16S rRNA in 30S subunits, 70S ribosomes and polysomes.

Sequence	GFP activity	% of plasmid-encoded 16S rRNA			
		Lysate	30S	70S	Polysomes
GCAA	100	45 ± 5	44 ± 2	39 ± 2	39 ± 4 (100)
<u>U</u> CAA	56	48 ± 6	59 ± 7	46 ± 5	29 ± 4 (74)
GC <u>A</u> C	44	32 ± 6	39 ± 2	18 ± 4	24 ± 1 (62)
GC <u>U</u> A	26	31 ± 5	38 ± 1	27 ± 2	27 ± 3 (69)
G <u>A</u> GA	8	30 ± 7	37 ± 3	9 ± 2	12 ± 3 (31)

Mutated positions in the 900 tetraloop are underlined. Percent of plasmid-encoded 16S rRNA in the bacterial lysate and in the 30S, 70S and polysome fraction was assessed by primer extension. For the wild-type sequence, a C1192U marker mutation was used. Numbers between parentheses in the last column indicate the amount of 30S subunits with plasmid-encoded 16S rRNA in the polysomes, when a value of 100 is arbitrarily ascribed to the wild-type sequence. Results are means ± standard deviation with two or three independent RNA preparations.

Table 2-4 : Effect of 900 tetraloop mutations on translational fidelity.

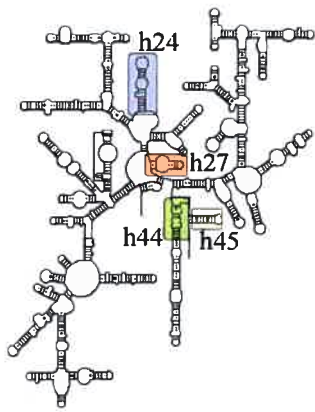
Sequence	Frequency (in %) of miscoding event		
	UAG	UGA	-1 frameshift
GCAA	2.7 ± 0.4	3.6 ± 0.5	0.32 ± 0.06
<u>U</u> CAA	4.4 ± 0.9	8.0 ± 0.6	0.54 ± 0.07
GC <u>C</u>	4.6 ± 0.7	6.1 ± 1.7	0.51 ± 0.09
GC <u>U</u> A	8.2 ± 1.1	11.7 ± 1.4	0.79 ± 0.12
<u>G</u> A <u>G</u> A	14.6 ± 1.2	11.7 ± 2.0	1.81 ± 0.47

Mutated positions are underlined. Experiments were done in *E. coli* XL1-Blue except for codon UAG where MC140 was used. The frequency of readthrough of nonsense codons and the frequency of frameshift were obtained by dividing the luciferase activity of the stop codon or frameshift construct by that of the wild-type luciferase construct. Results are the means ± standard deviation of three to five independent experiments.

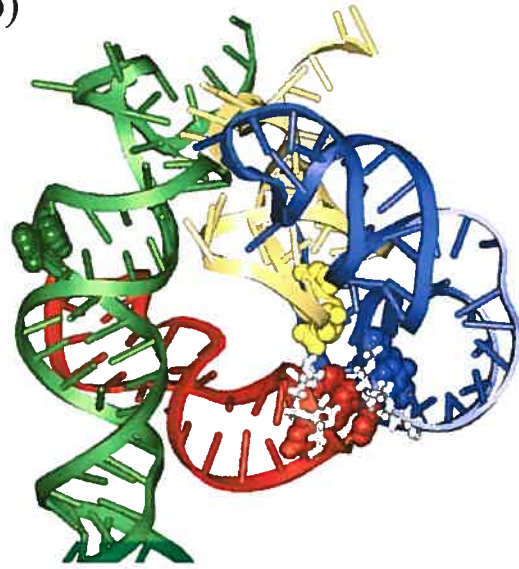
Figure 2-1: Location of the 900 tetraloop.

- A. Secondary structure of *E. coli* 16S rRNA (Gutell, 1996). Helices which are discussed in the text are boxed: helix 24 (blue), helix 27 (red), the portion corresponding to the decoding center in helix 44 (green) and helix 45 (yellow). Helices are named according to the Brimacombe numbering scheme (Mueller et al., 1997).
- B. Helices 24, 27, 44 and 45, as seen in the crystal structure of the 30S subunit (Wimberly et al., 2000), and colored as in (A). Bases of the 900 tetraloop (red), bases of the receptor region (blue), bases A1492 and A1493 of the decoding center (green), and nucleotide A1513 (yellow), which are discussed in the text, are shown in a space-filling model. The backbone of positions 900-901 and that of positions 770-771, which are involved in intersubunit bridge B2c (Yusupov et al., 2001), are represented as white sticks.
- C. The helix 27 accuracy switch. The 912/888 conformation (hyperaccurate), where bases 910-912 pair to bases 888-890, is on the left and the 912/885 conformation (error-prone), where bases 910-912 pair to bases 885-887, is on the right. Nucleotides involved in the switch are colored in blue and the 900 tetraloop is colored in red.

(a)



(b)



(c)

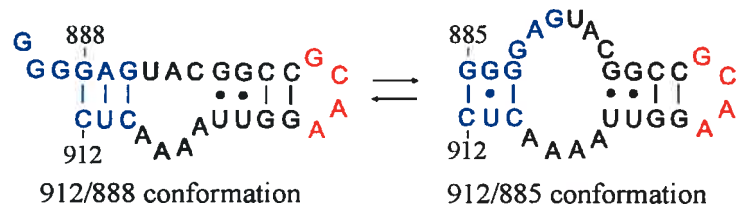


Figure 2-2 : Details of the 900 tetraloop structure and its interactions with its receptor and with position A1513, as seen in the crystal structure of the 30S subunit (Wimberly et al., 2000).

- A. Zoom-in on the 900 tetraloop and the neighboring regions. The 900 tetraloop nucleotides are colored in red, the 770/810 receptor region is colored in blue and position A1513, in helix 45, in yellow. Backbones of positions 900-901 of the 900 tetraloop and 770-771 of the receptor which are involved in intersubunit bridge B2c are colored in white. The bases of the 900 tetraloop are represented as transparent surfaces colored according to their importance for the interaction with the receptor: no contact (green), one contact (yellow) and more than one contact (red).
- B. Details on the pairing between G898 and A901 of the 900 tetraloop, and on the interaction of A901 with C811 of the receptor and with A1513. A900 (thin sticks) is stacked under A901 and interacts with the 2'OH of G898.
- C. Interaction of C899 with C810 and C770 of the receptor.
- D. Interaction of A900 with G769 and C811 of the receptor and with the 2'OH of G898. For the sake of clarity, only the riboses of nucleotides C811 and G898 are shown in this panel.

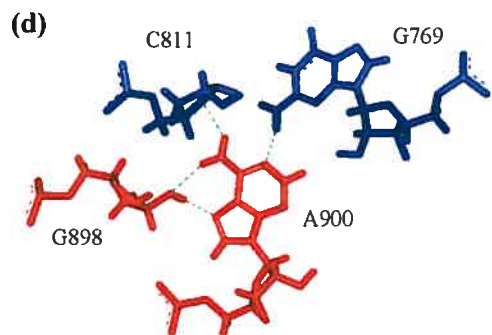
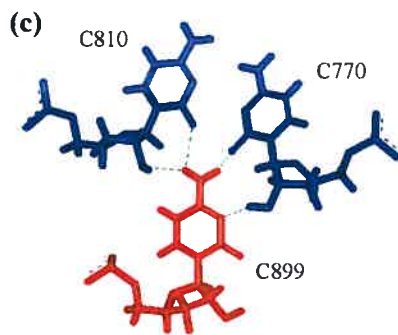
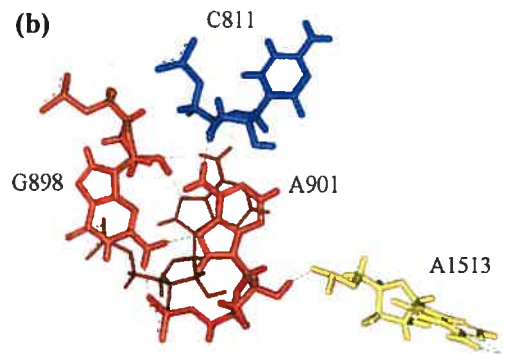
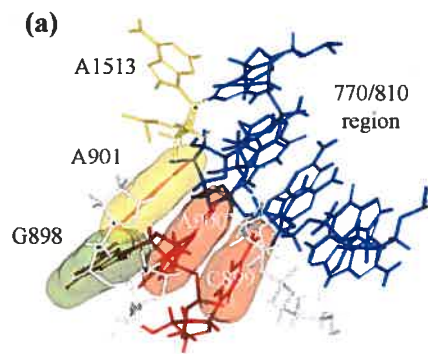


Figure 2-3: Modeled structures of the 900 tetraloop with mutations at position C899 and A900.

A. C899G mutation.

B. C899A mutation.

C. A900G mutation.

D. A900U mutation.

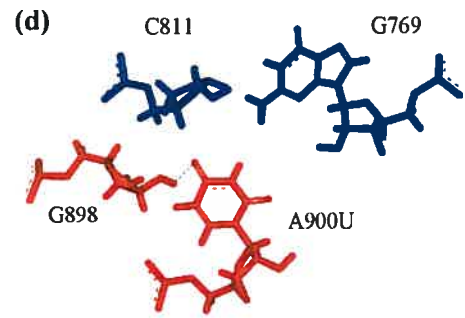
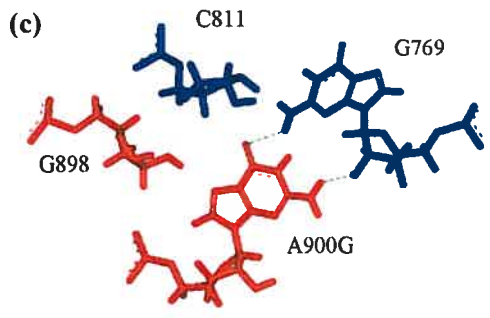
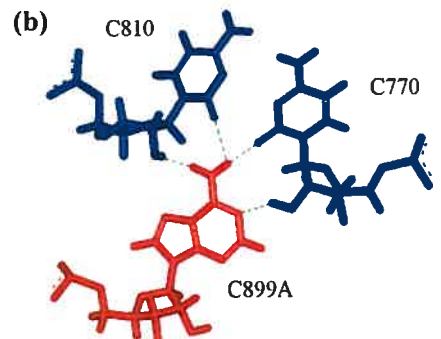
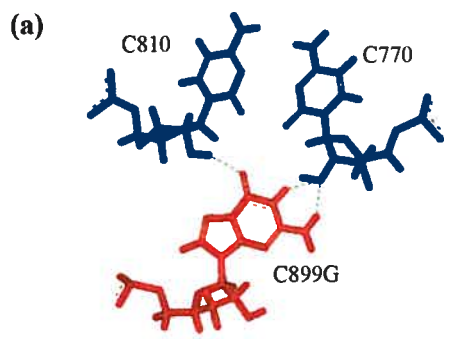
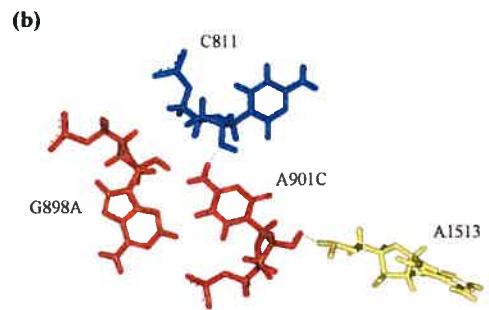
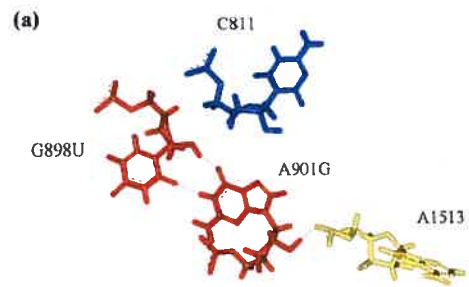


Figure 2-4 : Modeled structures of the 900 tetraloop with double mutations of the G898-A901 base-pair. For the sake of clarity, the interaction of A900 with the ribose of G898 is not shown.

A. G898U/A901G double mutation.

B. G898A/A901C double mutation.



Chapitre III

Study of the functional interaction of the 900 tetraloop of 16S ribosomal RNA with helix 24 within the bacterial ribosome.

François Bélanger¹, Matthieu G. Gagnon¹, Sergey V. Steinberg¹,
Philip R. Cunningham² et Léa Brakier-Gingras¹.

¹Département de Biochimie
Université de Montréal
Montréal, Québec, Canada
H3T 1J4

²Department of Biological Sciences
Wayne State University
Detroit, MI, 48202, USA

Journal of Molecular Biology (2004) **338**, 683-693

Abstract

The 900 tetraloop that caps helix 27 of 16S ribosomal RNA (rRNA) is amongst the most conserved regions of rRNA. This tetraloop forms a GNRA motif that docks into the minor groove of three base-pairs at the bottom of helix 24 of 16S rRNA in the 30S subunit. Both the tetraloop and its receptor in helix 24 contact the 23S rRNA, forming the intersubunit bridge B2c. Here, we investigated the interaction between the 900 tetraloop and its receptor by genetic complementation. We used a specialized ribosome system in combination with an *in vivo* instant evolution approach to select mutations in helix 24 compensating for a mutation in the 900 tetraloop (A900G) that severely decreases ribosomal activity, impairing subunit association and translational fidelity. We selected two mutants where the G769-C810 base-pair of helix 24 was substituted with either U-A or C-A. When these mutations in helix 24 were investigated in the context of a wild-type 900 tetraloop, the C-A but not the U-A mutation severely impaired ribosome activity, interfering with subunit association and decreasing translational fidelity. In the presence of the A900G mutation, both mutations in helix 24 increased the ribosome activity to the same extent. Subunit association and translational fidelity were also increased to the same level. Computer modeling was used to analyze the effect of the mutations in helix 24 on the interaction between the tetraloop and its receptor. This study demonstrates the functional importance of the interaction between the 900 tetraloop and helix 24.

Introduction

The elucidation of the crystal structures of the bacterial ribosome (Yusupov et al., 2001) and of its subunits (Ban et al., 2000; Schluenzen et al., 2000; Wimberly et al., 2000) has provided a wealth of information and important insights into the mechanisms that account for the function of the ribosome in protein synthesis. Cryo-electron microscopy (Cryo-EM) has proved extremely useful in providing information on the nature and the functional significance of conformational changes that occur in the ribosome during protein synthesis (Frank & Agrawal, 2000; van Heel, 2000). Although this structural information has already led to a deeper understanding of the underlying mechanisms of the ribosome, more functional studies are needed to fully understand how the ribosome works. The 900 tetraloop of 16S ribosomal RNA (sequence GCAA) that caps helix 27 (Figure 3-1a) is amongst the most conserved sequences of rRNA (Comparative RNA Web Site: <http://www.rna.icmb.utexas.edu>). The crystal structures of the 30S subunit from *Thermus thermophilus* showed that this tetraloop forms a GNRA motif (where N is any nucleotide and R is a purine) that docks into the minor groove of three base-pairs at the bottom of helix 24 (the pairs between nucleotides 768-770 and 809-811) in the platform of the 30S subunit (Schluenzen et al., 2000; Wimberly et al., 2000) (Figure 3-1b and c). The interactions between GNRA tetraloops and their receptors are stabilized by hydrogen bonds between the last three bases of the tetraloops and groups in the minor groove of the receptors, and they are known to play an important role in RNA structure and folding (Pley et al., 1994; Conn & Draper, 1998; Moore, 1999; Westhof & Fritsch, 2000). The bottom of helix 27 interacts with helix 44, close to the decoding center, and with ribosomal protein S12 (Figure 3-1b). In the crystal structure of the 70S ribosome from *T. thermophilus*, the backbone of positions 900 and 901 in the tetraloop and that of positions 770 and 771 in helix 24 contact the backbone of positions 1832-1833 of helix 67 in the 23S rRNA, forming the intersubunit bridge B2c (Yusupov et al., 2001). Phylogenetic analysis showed that this bridge is one of the most conserved in evolution (Mears et al., 2002). The involvement of

the 900 tetraloop in this intersubunit bridge was shown by chemical protection studies (Merryman et al., 1999b) and cryo-EM (Gabashvili et al., 2000).

Helix 27 had been proposed to alternate between two base-pair arrangements, where nucleotides 910-912 can either pair with nucleotides 885-887 (the 885-912 conformation) or with 888-890 (the 888-912 conformation), and this switch had been proposed to play a role in the control of translational fidelity (Lodmell & Dahlberg, 1997). However, in all the crystal structures available, helix 27 is always in the 885-912 conformation, whether in the isolated 30S subunit (Schluenzen et al., 2000; Wimberly et al., 2000), in the 30S subunit in the presence of an mRNA fragment and a cognate tRNA fragment (Ogle et al., 2001), as well as in the wild-type 70S ribosome (Yusupov et al., 2001) and in a hyper-accurate 70S ribosome with a S12 mutation (Vila-Sanjurjo et al., 2003). Furthermore, mutational studies in yeast and, more recently, in *Escherichia coli*, did not support the existence of this switch (Velichutina et al., 2000; Rodriguez-Correa & Dahlberg, 2004). Nevertheless, these studies clearly demonstrate the importance of helix 27 for the control of translational accuracy. The importance of helix 27 is also supported by cryo-EM studies showing that mutations in this helix cause long-range rearrangements that affect the whole structure of the ribosome (Gabashvili et al., 1999b).

During the first step of tRNA selection, the anticodon of an aminoacyl-tRNA (aa-tRNA), complexed with elongation factor EF-Tu and GTP, transiently interacts with the codon in the A site (Rodnina & Wintermeyer, 2001; Ramakrishnan, 2002; Ogle et al., 2003). Binding of a cognate tRNA causes a conformational change in the decoding center (Pape et al., 2000b; Ogle et al., 2001; Ogle et al., 2002), where bases A1492, A1493 and G530 monitor the structure of the minor groove of the codon-anticodon duplex. A correct codon-anticodon duplex triggers conformational rearrangements in the whole 30S subunit, which result in a transition from an open to a closed conformation of this subunit (Ogle et al., 2002; Vila-Sanjurjo et al., 2003), involving primarily a closer packing between the body

and the shoulder. In the second step of tRNA selection, a signal is transmitted to the 50S subunit, so as to stimulate the GTPase activity of EF-Tu and the release of EF-Tu·GDP, enabling the aa-tRNA to be accommodated in the A site of the 50S subunit. Non-cognate tRNAs do not promote the closed conformation of the 30S subunit and fail to trigger the activation of the GTPase of EF-Tu. Near-cognate tRNAs can activate the GTPase, albeit slowly. Those that succeed in escaping the initial selection are rejected at the proofreading step, following GTP hydrolysis by EF-Tu. How the transition of the 30S subunit from the open to the closed conformation leads to the activation of the GTPase center in the 50S subunit remains unclear. The tRNA itself contributes to the cross-talk between the subunits (Yarus & Smith, 1995; Piepenburg et al., 2000; Stark et al., 2002; Valle et al., 2002; Valle et al., 2003a). Also, the two ribosomal subunits are associated through a complex network of intersubunit bridges (Gabashvili et al., 2000; Yusupov et al., 2001) and several of these intersubunit bridges, including B2c, likely contribute to the cross-talk between the subunits. In addition to its role in tRNA selection, bridge B2c could be important for translocation. Indeed, cryo-EM showed that during translocation catalyzed by EF-G, the two subunits move in a ratchet-like fashion (Frank & Agrawal, 2000). The head and shoulder of the 30S subunit are displaced during this movement and the bridges connecting the head to the 50S subunit are disrupted. Bridge B2c, which connects the body of the 30S subunit to the 50S subunit, is not displaced and could contribute to the maintenance of the subunit association during the ratchet movement (Gao et al., 2003; Tama et al., 2003; Valle et al., 2003b).

In a previous study, we used an instant evolution procedure to obtain mutants of the 900 tetraloop (Bélanger et al., 2002). All the positions of the tetraloop were randomized and functional mutants were selected, using a specialized ribosome system (Lee et al., 1997; Morosyuk et al., 2000; Morosyuk et al., 2001b). We observed that mutations in the 900 tetraloop impair subunit association and translational fidelity, in agreement with the location of this tetraloop at the subunit interface and close to the decoding center. Here, we investigated the consequences of mutating helix 24, the receptor of the 900 tetraloop. We

obtained mutations in helix 24 by genetic complementation of the A900G mutation, a mutation of the 900 tetraloop that severely decreases ribosomal activity, interfering with subunit association and translational fidelity. The three base pairs that form the receptor of the 900 tetraloop at the bottom of helix 24 were randomized (Figure 3-1d) and mutations that increased the activity of ribosomes with the A900G mutation were selected *in vivo*, using the specialized ribosome system. We analyzed the effect of the complementary mutations in helix 24 on the structure of the 16S rRNA by computer modeling, and specific assays demonstrated the functional importance of the interaction between the 900 tetraloop and helix 24 for subunit association and for the control of translational fidelity.

Results

Instant evolution of the 900 tetraloop-receptor interaction

We used a specialized ribosome system (Lee et al., 1997; Morosyuk et al., 2000; Morosyuk et al., 2001b) to select for second-site mutations in helix 24 of *E. coli* 16S rRNA that compensate for the low ribosomal activity caused by the A900G mutation in the 900 tetraloop. This system uses plasmid pRNA123, which harbors a ribosomal RNA operon (*rrnB*) under control of an inducible *lac* promoter, and two reporter genes coding for the green fluorescent protein (GFP) and chloramphenicol acetyltransferase (CAT). The messenger binding site (MBS) in the plasmid-encoded 16S rRNA and the ribosome binding site (RBS) in the two reporter genes are mutated in a complementary fashion, so that only 30S subunits containing the plasmid-encoded 16S rRNA can initiate translation of the CAT and GFP reporter mRNAs. This system allows us to study mutations in 16S rRNA without affecting the host bacteria. The CAT reporter gene confers resistance to chloramphenicol and allows for *in vivo* selection of 16S rRNA mutants, based on their activity, whereas the GFP reporter gene allows for a rapid and accurate quantification of the activity of the

mutants. Random mutagenesis was applied to positions 768-770 and 809-811 of helix 24 (the three base pairs with which the 900 tetraloop interacts in the crystal structure of the 30S subunit), so as to generate all possible sequences for these six positions (Figure 3-1d). This was done with a two-step PCR approach, using an overlap extension procedure (Ho et al., 1989) on a pRNA123 template bearing the A900G mutation. A pool of about 3×10^4 transformants were plated in the presence of 150 $\mu\text{g/ml}$ of chloramphenicol, the minimal inhibitory concentration (MIC) for bacteria with the A900G mutation being 100 $\mu\text{g/ml}$ of chloramphenicol. A total of 44 survivors were picked and sequenced. Two different mutations were identified (Figure 3-2), each resulting in an MIC of 300 $\mu\text{g/ml}$ for chloramphenicol.

Interestingly, both mutations in helix 24 consist of a purine-pyrimidine inversion of the G769-C810 base pair, the pair with which A900 makes a base-base contact in the crystal structure of the 30S subunit. The G-C pair is replaced either with a Watson-Crick U-A pair or with a non-Watson-Crick C·A pair. We examined the effect of these mutations in helix 24 in the context of a wild-type 900 tetraloop, by reverting the A900G mutation to wild-type with a standard PCR approach. Figure 3-2 presents the GFP activities of the mutations in helix 24, with and without the A900G mutation. The A900G mutation alone decreased ribosomal activity to 10%, as previously observed (Bélanger et al., 2002). In the context of a wild-type 900 tetraloop, mutations in helix 24 affected ribosome activity to a different extent. The Watson-Crick U-A pair resulted in a 72% activity, when compared to the wild-type sequence, whereas the non-Watson-Crick C·A pair resulted in an activity of only 10%. This suggests that a Watson-Crick interaction at base pair 769-810 is important for ribosome function. However, when the mutations in helix 24 were studied in combination with the A900G mutation, similar activities (39% for the U-A pair and 32% for the C·A pair) were observed. The purine-pyrimidine inversion of the 769-810 pair consisting in the replacement of this pair with a C-G pair was not selected among the compensatory mutations. We created this mutant by site-directed mutagenesis, in the

presence and in the absence of the A900G mutation, and observed that the resulting activity was very low in both cases (about 5 %), accounting for the absence of this mutant among the mutants that can compensate for the A900G mutation. This implies that a Watson-Crick pair at positions 769 and 810 is not sufficient for the ribosomes to be active in protein synthesis.

Computer modeling

To further understand the effect of mutations in helix 24 in the presence or absence of the A900G mutation, we introduced these mutations *in silico* in the structure of the 16S rRNA from the crystal structure of the 30S subunit of *T. thermophilus* (Wimberly et al., 2000). The results of this modeling are presented in Figure 3-3. Figure 3-3a shows the contacts between C899 and A900 in the 900 tetraloop and the G769-C810 base pair of helix 24 in the wild-type structure of the 16S rRNA. C899 and A900 are the bases that make the most important contacts in the tetraloop/receptor interaction. C899 and A900 are stacked and the NH₂ group of C899 contacts the O2 and the 2'OH group of C810, whereas A900 makes a base-base interaction with G769, involving the N1 of A900 and the NH₂ group of G769. Position C899 also makes contacts with position C770 that have been described in detail in a previous study (Bélanger et al., 2002) and are omitted from this figure for clarity.

Despite the fact that GNRA tetraloop structures are generally known to enjoy some level of conformational flexibility (Correll & Swinger, 2003), within the ribosome, due to the tight structural context, the conformation of tetraloop 900 was quite rigid. In our computer experiments, none of nucleotides 899 and 900 was able to move from its position in the X-ray conformation for more than a fraction of an ångström. As a result, the conformational accommodations of the replacements of nucleotides 769, 810 and 900 involved mainly the position of nucleotide 769. This position was restricted almost

exclusively by its base pairing with nucleotide 810 and in some cases, was quite flexible. The presence of a G in position 900 (Figure 3-3b) is incompatible with the wild-type G769-C810 base pair in helix 24. The NH₂ group of G769 in the minor groove of helix 24 causes a steric clash with G900. This can explain the sharp loss of the activity of the ribosomes containing base pair G769-C810 and mutation A900G. The replacement of base pair G769-C810 by U769-A810 does not seem to create any problem for nucleotides C899 and A900 of tetraloop 900 (Figure 3-3c). The NH₂ group of C899 is always able to form a hydrogen bond with either O2 of a pyrimidine or with N3 of a purine in position 810, while the loss of the hydrogen bond between G769 and A900 is not expected to have a major effect on the stability of the complex. This can explain the mild loss of ribosomal activity in this case. However, the consecutive replacement of A900 by G would create problems for stability of base pair U769-A810 (Figure 3-3d). The two hydrogen atoms at the Watson-Crick edge of G900 must be involved in formation of hydrogen bonds, and the only way these bonds can be formed is with the 2'OH and O2 of U769. However, in the crystal conformation of the region, the distance between the two nucleotides is too high for the normal hydrogen bonding. As a result of the energy minimization of the region, U769 moved in the direction of G900 for about 2 Å, which resulted in the formation of reasonable hydrogen bonds between them, but also in the distortion of the hydrogen bonds between U769 and A810. This distortion can explain the about two-fold loss of the ribosome activity in the presence of the A900G mutation. Interestingly, when positions 769-810 are occupied by the C·A mismatch (Figure 3-3e-f), the effect of G900 seems to be the opposite, making this mutant three times more active than the mutant containing A900. Our modeling showed that, in the absence of a stable base pair 769-810, nucleotide 769 acquires a considerable conformational freedom, resulting in a destabilization of the receptor, which can severely perturb the tetraloop/receptor interaction. With mutation A900G, a tight interaction with G900 restricts the conformational freedom of C769, thus compensating for the loss of the stable base pair with A810. This compensation does not exist in the case of A900, however, which can explain the very low activity of the corresponding mutant. Therefore, mutation

A900G seems to have a dual effect on the stability of the structure. If base pair 769-810 is stable, G900 has a negative effect on the structure, and in the case of G769-C810 makes the tetraloop/receptor interaction sterically impossible. However, when the stability of base-pair 769-810 is compromised, the introduction of G900 becomes an important factor in stabilizing the position of C769. Lastly, we mentioned above that we did not select the C-G inversion (G769C/C810G) among the mutations in helix 24 that compensate for the A900G mutation. The presence of a G at position 810 would cause a steric clash between its NH₂ group and the NH₂ group of C899, impairing the docking of the tetraloop into the receptor. This would severely affect the ribosome activity, which was observed experimentally.

Functional studies of the tetraloop-receptor mutants

We previously observed that 900 tetraloop mutants are impaired in subunit association and in translational fidelity (Bélanger et al., 2002). In the present study, the effect of the mutations at positions 769-810 of helix 24 on these functions was investigated. The distribution of mutated 30S subunits was analyzed by assessing the proportion of plasmid-encoded 16S rRNA in the free 30S subunits, 70S ribosomes and polysomes fractionated by centrifugation of the lysate from the bacteria expressing mutant 16S rRNA, and also in the unfractionated bacterial lysate. This was done using a standard primer extension inhibition technique (Sigmund et al., 1988). Results are presented in Table 3-1. When the wild-type 16S rRNA was expressed from plasmid pRNA123, the level of the plasmid-encoded 16S rRNA was about 40-45% in each fraction. The A900G mutation decreased the proportion of the plasmid-encoded 16S rRNA in the 70S ribosomes and polysomes to about 10%, while this proportion was about 40% in the 30S subunits, suggesting that this mutation causes a subunit association defect. The C·A mutation decreased the proportion of the plasmid-encoded 16S rRNA in the 70S ribosomes and polysomes to about 15%, whereas the U-A mutation decreased this proportion only

slightly, compared to the wild-type. When mutations in helix 24 were combined with the A900G mutation, the same distribution of the mutated 30S subunits was observed (about 20% of the plasmid-encoded 16S rRNA was found in the 70S ribosomes and polysomes *versus* about 40% in the 30S subunits). To investigate the effect of the mutations on subunit association directly, the 30S subunits with the different mutations were isolated from the bacterial lysates and their capacity to associate with 50S subunits was analyzed by centrifugation through a sucrose gradient. The proportion of mutated 16S rRNA in the 30S subunits and in the 70S ribosomes was assessed by the primer extension inhibition technique (Table 3-2). As suggested by the analysis of the distribution of the plasmid-encoded mutant 16S rRNA in the bacterial lysate, the association assays demonstrate that the A900G mutation caused an association defect, which is shown by the decrease in the proportion of the plasmid-encoded 16S rRNA in the 70S ribosomes compared to the 30S subunits. The U-A mutation in helix 24 alone affected subunit association to a minor extent whereas the C-A mutation impaired subunit association, although less than the A900G mutation. The association defect caused by the A900G mutation was partly corrected by the G769C/C810A or the G769U/C810A mutation. Altogether, the results presented in Tables 3-1 and 3-2 show that there is a correlation between the activity of every combination of mutations and their effect on subunit association, in that a lower activity is paralleled by a lower association level. We conclude that the interaction between the 900 tetraloop and its receptor in helix 24 plays a major role in subunit association. The last two columns in Table 3-1 compare the activities predicted from the proportion of the mutant 30S subunits in the polysomes with the experimental activities assessed with the reporter GFP (see Figure 3-2). This comparison reveals that, except for the G769U/C810A mutation, the experimental activities are lower than predicted from the proportion of the mutant 30S subunits in the polysomes. This indicates that the decrease in protein synthesis activity caused by the mutations that were studied cannot be ascribed exclusively to a defect in subunit association. A defect in translocation could account for the decreased activity of the mutant ribosomes (see Discussion).

We had also previously observed that mutations in the 900 tetraloop impair translational fidelity. We investigated the effect of the mutations of helix 24 on translational fidelity, using derivatives of pRNAluc2, a pRNA123-related plasmid that contains a highly sensitive reporter gene coding for the firefly luciferase instead of CAT and GFP (Bélanger et al., 2002). Plasmids pRNAluc2/UGA and pRNAluc2/-1 contain an insertion at the beginning of the luciferase coding sequence with a UGA stop codon or a -1 frameshift mutation, respectively. A third plasmid, pRNAluc2/R218G, contains a mutation that replaces arginine 218 of the active center of the luciferase with a glycine, abolishing luciferase activity (Viviani et al., 2002). With these plasmids, the production of an active luciferase requires a readthrough, a frameshift or a misincorporation event. The effects on translational fidelity of the mutations in helix 24, in the absence or presence of the A900G mutation, are presented in Table 3-3. The A900G mutation increased the readthrough, frameshift and misincorporation levels two- to threefold, compared to the situation with the wild-type ribosomes. When the 900 tetraloop was wild-type, the Watson-Crick U-A mutation in helix 24 did not significantly decrease translational fidelity, whereas with the weakly active C·A mutant, the level of translational errors was increased about twofold. In the presence of the A900G mutation, with either mutation in helix 24, the level of translational errors was brought to values close to those of the wild-type.

Discussion

In the present study, we selected second-site mutations in helix 24 of the 16S rRNA that can rescue the weakly active A900G mutant, altered in the 900 tetraloop capping helix 27. Analysis of the sequence and activity of the helix 24 mutants corroborates the existence of the interaction of this helix with the 900 tetraloop observed in the crystal structure of the 30S subunit. Both interacting regions are extremely conserved. Position A900 is conserved at 99.8% in the three phylogenetic domains, while the G769-C810 base pair is conserved at

99.3% (these values were obtained from the Comparative RNA Web Site: <http://www.rna.icmb.utexas.edu>). The analysis of the few alternative sequences available did not allow us to observe any covariation between these two regions. However, it must be recalled that ribosomes with the complementary mutations are only moderately active and it is possible that the corresponding mutants are not viable in nature. Moreover, the complementary mutations in helix 24 require a double substitution, a sequence of events that is unlikely to occur frequently in natural evolution. The instant evolution procedure is thus a very powerful tool to identify or confirm interactions that cannot be detected by phylogenetic analysis.

Functional studies of the mutations of helix 24 in the absence and presence of the A900G mutation reveal a correlation between the activity of these mutants and the capacity of the mutated 30S subunit to form 70S ribosomes, as well as the translational fidelity of these ribosomes. This shows that the interaction between the 900 tetraloop and helix 24 is important for subunit association and for the control of translational accuracy. The effects of the mutations in helix 24 on subunit association can be readily explained by a perturbation of the formation of bridge B2c. Indeed, the crystal structure of the 70S ribosome shows that the backbone of positions 900 and 901 of the tetraloop and that of positions 770 and 771 of helix 24 contact the 23S rRNA, forming bridge B2c (Yusupov et al., 2001). Mutations that impair the interaction between the 900 tetraloop and helix 24 will perturb the structure of the ribose-phosphate backbones involved in the formation of this intersubunit bridge. The sequence of events leading to the formation of all the intersubunit bridges in the ribosome is not known, but it is assumed that there is a hierarchy in the formation of these bridges. It is probable that bridge B2c is among the first bridges in this hierarchy since impairing the formation of this bridge strongly interferes with subunit association. Mutation A900G results in a steric clash between the N1-H of G900 and the NH₂ group of G769, which prevents the docking of the tetraloop into its receptor, perturbing the formation of bridge B2c. Computer modeling showed that with the weakly

active G769C/C810A mutant, but not with the G769U/C810A mutant, the tetraloop/receptor interaction is severely perturbed, which, consequently, impairs the formation of bridge B2c. Obviously, a Watson-Crick interaction at positions 769-810 is important for the stability of the receptor. Indeed, the first base-pair at the bottom of helix 24, A768-C811, is an A·C mismatch (see Figure 3-1c). Replacing the neighbor G769-C810 pair with a mismatch strongly destabilizes the structure of helix 24, interfering with the docking of the 900 tetraloop. When A900 is substituted with a G, both mutants of helix 24 can form hydrogen bonds between positions 900 and 769. The bonds between G900 and position 769 stabilize helix 24 when it contains two mismatches, with the net result that the formation of the intersubunit bridge is favored with the C·A mutant, but these bonds between G900 and position 769 distort the receptor with the U·A mutant, disfavoring the formation of the intersubunit bridge. This is reflected by the fact that, in the presence of the A900G mutation, the 30S subunits harboring the C·A mismatch associate better with the 50S subunits, whereas the 30S subunits with the U·A mutation have a decreased capacity to associate with the 50S subunits.

Helix 27 is important for the control of tRNA selection and is intimately involved in the conformational movements of the 30S subunit during protein synthesis (Ramakrishnan, 2002). The transition from the open to the closed conformation of the 30S subunit following recognition of a cognate codon-anticodon interaction involves a closer packing of helices 27 and 44 in the body, and helix 18 and protein S12 in the shoulder of the 30S subunit (Ogle et al., 2002). Several mutations in 16S rRNA or in ribosomal proteins that perturb translational fidelity likely favor or disfavor the transition to the closed conformation. Mutations were found at the bottom of helix 27 that cause a hyper-accurate phenotype (Lodmell & Dahlberg, 1997; Velichutina et al., 2000). It is likely that these mutations disrupt contacts between helices 27 and 44, interfering with a tighter association between these helices and thus with the transition to the closed conformation. Also, mutations in S12 that change residues contacting helices 27 and 44 in the closed

conformation result in a hyper-accurate phenotype. On the other hand, the error-inducing drug streptomycin decreases translational fidelity by binding to helices 27, 44 and 18, and to protein S12, thus bringing these regions closer and favoring the closed conformation (Carter et al., 2000). The mutations we introduced in helix 24 and in the 900 tetraloop result in an error-prone phenotype. Disrupting the interaction between the 900 tetraloop and helix 24 could facilitate a displacement of helix 27 that favors a tighter interaction with helix 44, thus enhancing the transition to the closed form of the 30S subunit.

The effect of mutations in helix 24 and in the 900 tetraloop on translational fidelity could also be related to a perturbation of bridge B2c in the ribosomes containing the mutated 30S subunits that succeeded in associating to the 50S subunits. Indeed, after the transition of the 30S subunit from the open to the closed form, a signal must be transmitted to the 50S subunit to trigger the GTPase activity of EF-Tu so that the aa-tRNA can be accommodated in the A site of the 50S subunit. Helix 27 contacts both helix 44, at proximity of the decoding center, and the 23S rRNA, and, thus, can be a likely candidate for the transmission of a signal from the decoding center to the 50S subunit. We first reasoned that if the signal were transmitted through bridge B2c, the transmission would have been slowed down by mutations in the 900 tetraloop and helix 24, which impair the formation of this bridge. This would have made the mutants hyper-accurate, since they would have had more time to reject an incorrect tRNA before it had a chance to be accommodated in the A site. Since the mutants were found to be error-prone, we suggest that the decrease in translational fidelity is not related to the perturbation of bridge B2c. However, it can be alternatively envisaged that the transmission of the signal from the decoding center to the 50S subunit requires a cycle of docking-undocking of the tetraloop and its receptor, and that perturbing bridge B2c could lead to a less controlled transmission of information between the subunits, favoring the accommodation of the tRNA and decreasing translational fidelity. A deeper understanding of the mechanisms controlling the

transmission of information from the 30S to the 50S subunit will help to determine whether bridge B2c contributes to the control of translational fidelity.

Lastly, we observed that the activity of most mutated ribosomes investigated in this study is lower than predicted from the proportion of mutated 30S subunits in the polysomes, indicating that these ribosomes have an additional defect. An appealing hypothesis is that the corresponding mutations in 16S rRNA also affect translocation. As recalled in the Introduction, binding of EF-G·GTP to the ribosome triggers a ratchet-like rotation of the subunits, which requires the breaking of bridges connecting the head of the 30S subunit to the 50S subunit, while bridge B2c is not disrupted and would serve as an anchor point between the two subunits during this ratchet movement (Gao et al., 2003; Tama et al., 2003). A perturbation of the interaction between the 900 tetraloop and helix 24 could affect the ratchet movement of the subunits and thus the translocation step, through a perturbation of bridge B2c, contributing to the decrease in the activity of the mutated ribosomes.

In conclusion, we investigated mutations in helix 24 of the 16S rRNA that complement a mutation in the 900 tetraloop. Our results demonstrate the functional importance of the interaction between the 900 tetraloop and helix 24. It will be interesting to investigate whether there are mutations in other regions of rRNA that can compensate for the defects caused by mutations in the 900 tetraloop. This will help to understand how the different rRNA regions cooperate in the translating ribosome.

Materials and Methods

Reagents

Restriction enzymes were from New England Biolabs, Fermentas and Amersham Pharmacia Biotech. Calf intestine alkaline phosphatase and T4 polynucleotide kinase were from Amersham Pharmacia Biotech, T4 DNA ligase was from Fermentas and M-MLV reverse transcriptase was from Invitrogen. DNA sequencing reactions were done with the T7 sequenase v2.0 from Amersham Pharmacia Biotech. Oligonucleotides were purchased from Biocorp Inc. and Sigma.

Bacterial strains and plasmids

All plasmids were maintained and expressed in *E. coli* DH5 α . Cultures were grown in LB medium with 100 μ g/ml ampicillin (LB-Ap100). Plasmid pRNA123 was described elsewhere (Morosyuk et al., 2001b). It contains a copy of the *rrnB* operon from pKK3535 under control of the *lacUV5* promoter, and the CAT and GFP genes, each under the control of a constitutive tryptophan promoter. The RBS of both CAT and GFP messengers are changed to 5'-AUCCC and the MBS of the 16S rRNA is changed to 5'-GGGAU. The synthesis of plasmid-encoded rRNA was induced by addition of isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) to a final concentration of 1 mM. Plasmid pRNA_{luc2} is derived from pRNA123 and contains only one reporter gene coding for the firefly luciferase (Bélanger et al., 2002), with an altered RBS, exactly as it is the case for the CAT or GFP genes. Plasmids pRNA_{luc2}/UGA and pRNA_{luc2}/-1 contain a cassette in the beginning of the coding sequence of the luciferase that inserts a UGA stop codon or a frameshift mutation, respectively, as described elsewhere (Bélanger et al., 2002). Plasmid pRNA_{luc2}/R218G was constructed in this study by creating a mutation that replaces

arginine 218 with a glycine (R218G), resulting in an inactive luciferase (Viviani et al., 2002).

Mutagenesis of helix 24 and selection of compensatory mutations

Random mutagenesis of positions 768-770 and 809-811 of 16S rRNA was performed by a two-step PCR approach, using an overlap extension procedure (Ho et al., 1989) on a derivative of plasmid pRNA123 containing the A900G mutation (Bélanger et al., 2002). PCR1, that randomized positions 768-770, used primers 770-*Bg*III-Rev: 5'-GCCACACTGGAAGTGGAGACACGG-3' and 770-*Bg*III-Fwd: 5'-CCAGGGTATCTAA-TCCTGTTTGCTCCCCACNNNTTCGCACCTGAGCG-3'. PCR2, that randomized positions 809-811, used primers 810-*Bst*EII-Rev: 5'-CGAAGGGGACACGAAAAT-TGCTTATCACG-3' and 810-*Bst*EII-Fwd: 5'-GCAAACAGGATTAGATACCCTGGT-AGTCCACNNNGTAAACGATGTCG-3' (bold N = A, T, C and G; the overlapping sequence between PCR1 and PCR2 is underlined). PCR3 was done with PCR1 and PCR2 as the template, with primers 770-*Bg*III-Rev and 810-*Bst*EII-Rev. PCR3 was cloned in pRNA123 using the unique *Bg*III and *Bst*EII restriction sites. A pool of approximately 3 x 10⁴ transformants were obtained. These transformants were induced for three and a half hours with 1 mM IPTG at 37°C and plated on LB-Agar-Ap100 plus 1 mM IPTG plus 150 µg/ml of chloramphenicol. A total of 44 survivors were picked and sequenced. Site-directed mutation G769C/C810G was done with a two-step PCR approach, as with the random mutagenesis described above, except that the forward primers were, for PCR1: 5'-CCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGGTTTCGCACCTGAGCG-3', and for PCR2: 5'-GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGGCGTAAACGATGTCG-3' (mutated positions are in bold and the overlapping sequence between PCR1 and PCR2 is underlined). The A900G mutation of the complementary mutants was reverted back to wild-type by a standard PCR. The PCR product was cloned in pRNA123, using the two

ApaI sites, one located in the 16S rRNA and the other located outside the *rrnB* operon. The forward primer was 5'-CCACCGCTTGTGCGGGCCCGTCAATTCATTTGAGTTT-TAACCTTGC GGCCGTACTCC-3' (*ApaI* site is underlined and position A900 is in bold) and the reverse primer was 5'-GGCACAACA ACTGGCGGGCAAACAGTCG-3', located downstream from the second *ApaI* site.

GFP and luciferase assays

Overnight cultures from plasmid-containing cells grown in LB-Ap100 were diluted to an optical density of 0.1 at 600 nm in 1 ml and incubated for one hour at 37°C under agitation. The cultures were induced by adding 1 mM IPTG and incubated for another five hours at 37°C for GFP and three and a half hours at 37°C for luciferase assays. GFP and luciferase assays were carried out as described (Bélanger et al., 2002).

Computer modeling

The models are based on the crystal structure (PDB accession number: 1FJF) of the 30S subunit of *T. thermophilus* (Wimberly et al., 2000). Helices 24 and 27 were taken from the X-ray structure and used as a starting conformation. The mutations that were studied were introduced in the sequence of these helices. Modeling was done interactively, using the InsightII/Discover package (Version 2000; Molecular Simulations Inc., San Diego, CA). Each model was submitted to restrained energy minimization, using the AMBER force field (Pearlman, 1995) until an energy minimum was reached. In each case, unrestrained nucleotides were 897-902 of helix 27 and 768-770 and 809-811 of helix 24. Visualizations were done in a Silicon Graphics O2 computer. Figures were prepared with WebLab ViewerPro 4.0 (Molecular Simulations Inc., San Diego, CA).

Analysis of mutant 16S rRNA distribution

Cells containing pRNA123 and its mutant derivatives were induced for three and a half hours, and ribosomal particles were isolated from bacterial lysates obtained by freezing and thawing, following a standard procedure. Lysates were applied onto a 15% to 40% (w/v) linear sucrose gradient in 20 mM Tris-HCl (pH 7.8), 5 mM MgCl₂, 100 mM NH₄Cl, 2 mM DTT, and centrifuged at 20,000 rpm for 20 hours in a Beckman SW28 rotor at 4°C. Fractions containing 30S subunits, 70S ribosomes and polysomes were detected at 260 nm and collected with an ISCO gradient fractionator. RNA was isolated from appropriate fractions and from the crude lysate by extraction with phenol. The proportion of plasmid-encoded 16S rRNA was determined by primer extension (Sigmund et al., 1988). For the plasmid with a wild-type 16S rRNA, a C to U mutation was introduced at position 1192 in the 16S rRNA sequence. The primers used were, for the wild-type sequence, 5'-CGTAAGGGCCATGATGACTTGA-3', which is complementary to nucleotides 1194-1215; for the A900G mutants, 5'-CAATTCATTTGAGTTTTAACC-3', which is complementary to nucleotides 902-922, and for the helix 24 mutants, 5'-CTAATCCTGTTTGCTCCCCAC-3', which is complementary to nucleotides 771-791. The resulting DNA fragments were resolved on a 20% (w/v) polyacrylamide gel. Bands from lightly exposed films (Biomax MR) were scanned and quantified.

Subunit association assays

The 30S and 50S subunits were isolated by centrifugation of the bacterial lysates on a 10% to 30% (w/v) sucrose gradient in the same buffer as described above except that the MgCl₂ concentration was lowered to 1 mM. Subunits were heat-reactivated and associated by incubation at 37°C for 30 min in a molar ratio of 1:1 in 200 µl of 20 mM Tris-HCl (pH 7.8), 100 mM NH₄Cl, 6 mM MgCl₂, 2 mM DTT. Samples were analyzed by centrifugation

through a 15% to 40% (w/v) sucrose gradient, the fractions containing free 30S subunits and 70S ribosomes were collected and the distribution of the plasmid-encoded 16S rRNA was assessed by primer extension as described above.

Acknowledgments

We are grateful to Pascale Legault, Mélissa Léger, Jim Omichinski and Francis Robert for critical reading of this manuscript and for stimulating comments. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research to L.B.-G. S.V.S acknowledges fellowships from the Canadian Institutes of Health Research and from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. F.B. held a scholarship from the Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) and a travel grant from the Gouvernement du Québec. M.G.G. held scholarships from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

Abbreviations

CAT: chloramphenicol acetyltransferase; GFP: green fluorescent protein; IPTG: isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside; MBS: messenger binding site; MIC: minimal inhibitory concentration; RBS: ribosome binding site.

References

- 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.
- Bélangier F., Léger M., Saraiya A. A., Cunningham P. R. and Brakier-Gingras L. 2002. Functional studies of the 900 tetraloop capping helix 27 of 16S ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* **320**:979-989.
- Carter A. P., Clemons W. M., Brodersen D. E., Morgan-Warren R. J., Wimberly B. T. and Ramakrishnan V. 2000. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **407**:340-348.
- Conn G. L. and Draper D. E. 1998. RNA structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**:278-285.
- Correll C. C. and Swinger K. 2003. Common and distinctive features of GNRA tetraloops based on a GUAA tetraloop structure at 1.4 Å resolution. *RNA* **9**:355-363.
- Frank J. and Agrawal R. K. 2000. A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature* **406**:318-322.
- Gabashvili I. S., Agrawal R. K., Grassucci R., Squires C. L., Dahlberg A. E. and Frank J. 1999. Major rearrangements in the 70S ribosomal 3D structure caused by a conformational switch in 16S ribosomal RNA. *EMBO J.* **18**:6501-6507.
- Gabashvili I. S., Agrawal R. K., Spahn C. M., Grassucci R. A., Svergun D. I., Frank J. and Penczek P. 2000. Solution structure of the *E. coli* 70S ribosome at 11.5 Å resolution. *Cell* **100**:537-549.
- Gao H., Sengupta J., Valle M., Korostelev A., Eswar N., Stagg S. M., Van Roey P., Agrawal R. K., Harvey S. C., Sali A., Chapman M. S. and Frank J. 2003. Study of the structural dynamics of the *E. coli* 70S ribosome using real-space refinement. *Cell* **113**:789-801.
- Ho S. N., Hunt H. D., Horton R. M., Pullen J. K. and Pease L. R. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**:51-59.

- Lee K., Varma S., SantaLucia J., Jr. and Cunningham P. R. 1997. *In vivo* determination of RNA structure-function relationships: analysis of the 790 loop in ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* **269**:732-743.
- Lodmell J. S. and Dahlberg A. E. 1997. A conformational switch in *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA during decoding of messenger RNA. *Science* **277**:1262-1267.
- Mears J. A., Cannone J. J., Stagg S. M., Gutell R. R., Agrawal R. K. and Harvey S. C. 2002. Modeling a minimal ribosome based on comparative sequence analysis. *J. Mol. Biol.* **321**:215-234.
- Merryman C., Moazed D., McWhirter J. and Noller H. F. 1999. Nucleotides in 16S rRNA protected by the association of 30S and 50S ribosomal subunits. *J. Mol. Biol.* **285**:97-105.
- Moore P. B. 1999. Structural motifs in RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **68**:287-300.
- Morosyuk S. V., Lee K., SantaLucia J., Jr. and Cunningham P. R. 2000. Structure and function of the conserved 690 hairpin in *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA: analysis of the stem nucleotides. *J. Mol. Biol.* **300**:113-126.
- Morosyuk S. V., SantaLucia J., Jr. and Cunningham P. R. 2001. Structure and function of the conserved 690 hairpin in *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA. III. Functional analysis of the 690 loop. *J. Mol. Biol.* **307**:213-228.
- Ogle J. M., Brodersen D. E., Clemons W. M., Jr., Tarry M. J., Carter A. P. and Ramakrishnan V. 2001. Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science* **292**:897-902.
- Ogle J. M., Carter A. P. and Ramakrishnan V. 2003. Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures. *Trends Biochem. Sci.* **28**:259-266.
- Ogle J. M., Murphy F. V., Tarry M. J. and Ramakrishnan V. 2002. Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell* **111**:721-732.
- Pape T., Wintermeyer W. and Rodnina M. V. 2000. Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome. *Nature Struct. Biol.* **7**:104-107.

- Pearlman D. A. 1995. AMBER 4.1. University of California, San Francisco.
- Piepenburg O., Pape T., Pleiss J. A., Wintermeyer W., Uhlenbeck O. C. and Rodnina M. V. 2000. Intact aminoacyl-tRNA is required to trigger GTP hydrolysis by elongation factor Tu on the ribosome. *Biochemistry* **39**:1734-1738.
- Pley H. W., Flaherty K. M. and McKay D. B. 1994. Model for an RNA tertiary interaction from the structure of an intermolecular complex between a GAAA tetraloop and an RNA helix. *Nature* **372**:111-113.
- Ramakrishnan V. 2002. Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* **108**:557-572.
- Rodnina M. V. and Wintermeyer W. 2001. Fidelity of aminoacyl-tRNA selection on the ribosome: kinetic and structural mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* **70**:415-435.
- Rodriguez-Correa D. and Dahlberg A. E. 2004. Genetic evidence against the 16S ribosomal RNA helix 27 conformational switch model. *RNA* **10**:28-33.
- Schlueder F., Tocilj A., Zarivach R., Harms J., Gluehmann M., Janell D., Bashan A., Bartels H., Agmon I., Franceschi F. and Yonath A. 2000. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution. *Cell* **102**:615-623.
- Sigmund C. D., Ettayebi M., Borden A. and Morgan E. A. 1988. Antibiotic resistance mutations in ribosomal RNA genes of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **164**:673-690.
- Stark H., Rodnina M. V., Wieden H. J., Zemlin F., Wintermeyer W. and van Heel M. 2002. Ribosome interactions of aminoacyl-tRNA and elongation factor Tu in the codon-recognition complex. *Nature Struct. Biol.* **9**:849-854.
- Tama F., Valle M., Frank J. and Brooks C. L., 3rd. 2003. Dynamic reorganization of the functionally active ribosome explored by normal mode analysis and cryo-electron microscopy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**:9319-9323.
- Valle M., Sengupta J., Swami N. K., Grassucci R. A., Burkhardt N., Nierhaus K. H., Agrawal R. K. and Frank J. 2002. Cryo-EM reveals an active role for aminoacyl-tRNA in the accommodation process. *EMBO J.* **21**:3557-3567.

- Valle M., Zavialov A., Li W., Stagg S. M., Sengupta J., Nielsen R. C., Nissen P., Harvey S. C., Ehrenberg M. and Frank J. 2003a. Incorporation of aminoacyl-tRNA into the ribosome as seen by cryo-electron microscopy. *Nature Struct. Biol.* **10**:899-906.
- Valle M., Zavialov A., Sengupta J., Rawat U., Ehrenberg M. and Frank J. 2003b. Locking and unlocking of ribosomal motions. *Cell* **114**:123-134.
- van Heel M. 2000. Unveiling ribosomal structures: the final phases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**:259-264.
- Velichutina I. V., Dresios J., Hong J. Y., Li C., Mankin A., Synetos D. and Liebman S. W. 2000. Mutations in helix 27 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* 18S rRNA affect the function of the decoding center of the ribosome. *RNA* **6**:1174-1184.
- Vila-Sanjurjo A., Ridgeway W. K., Seymaner V., Zhang W., Santoso S., Yu K. and Cate J. H. 2003. X-ray crystal structures of the WT and a hyper-accurate ribosome from *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**:8682-8687.
- Viviani V. R., Uchida A., Viviani W. and Ohmiya Y. 2002. The influence of Ala243 (Gly247), Arg215 and Thr226 (Asn230) on the bioluminescence spectra and pH-sensitivity of railroad worm, click beetle and firefly luciferases. *Photochem. Photobiol.* **76**:538-544.
- Westhof E. and Fritsch V. 2000. RNA folding: beyond Watson-Crick pairs. *Structure Fold. Des.* **8**:R55-65.
- Wimberly B. T., Brodersen D. E., Clemons W. M., Jr., Morgan-Warren R. J., Carter A. P., Vornheim C., Hartsch T. and Ramakrishnan V. 2000. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407**:327-339.
- Yarus M. and Smith D. 1995. tRNA on the ribosome: a waggle theory. In: Söll D, RajBhandary U, eds. *tRNA: Structure, Biosynthesis and Function*. Washington, DC: American Society for Microbiology. pp 443-468.
- Yusupov M. M., Yusupova G. Z., Baucom A., Lieberman K., Earnest T. N., Cate J. H. and Noller H. F. 2001. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* **292**:883-896.

Table 3-1 : Distribution of plasmid-encoded 16S rRNA in 30S subunits, 70S ribosomes and polysomes.

16S rRNA sequence	Plasmid-encoded 16S rRNA (%)					
	Lysate	30S	70S	Poly	(a)	(b)
Wild-type	45 ± 5	44 ± 4	39 ± 3	39 ± 4	100%	100%
A900G	28 ± 2	41 ± 4	8 ± 1	10 ± 1	26%	10%
G769C / C810A	42 ± 4	59 ± 4	15 ± 1	14 ± 2	36%	10%
G769U / C810A	41 ± 4	47 ± 4	36 ± 3	29 ± 2	75%	72%
A900G / G769C / C810A	30 ± 2	39 ± 3	20 ± 3	20 ± 2	51%	32%
A900G / G769U / C810A	27 ± 2	38 ± 3	19 ± 3	20 ± 3	51%	39%

The proportion of plasmid-encoded 16S rRNA in the bacterial lysate and in the 30S, 70S and polysome (Poly) fractions was assessed by primer extension. For the wild-type sequence, a C1192U marker mutation was used (see Material and Methods). Results are the means ± standard error of experiments performed with three independent RNA preparations. The last two columns compare (a) the activities (%) predicted from the proportion of 30S subunits with plasmid-encoded 16S rRNA in the polysomes and (b) the activities (%) measured when translating the GFP reporter mRNA.

Table 3-2: Effect of mutations in the 900 tetraloop and in helix 24 on subunit association.

16S rRNA sequence	Plasmid-encoded 16S rRNA (%)	
	30S subunits	70S ribosomes
Wild-type	41 ± 3	41 ± 3
A900G	40 ± 4	5 ± 1
G769C / C810A	45 ± 4	15 ± 2
G769U / C810A	41 ± 3	33 ± 2
A900G / G769C / C810A	39 ± 4	21 ± 4
A900G / G769U / C810A	40 ± 5	24 ± 5

The 30S and 50S subunits were isolated by centrifugation through a sucrose gradient and re-associated in a 1:1 molar ratio, as described in Materials and Methods. The proportion of plasmid-encoded 16S rRNA in the 30S subunits and in the 70S ribosomes was assessed by primer extension as described in Table 3-1. Results are the means ± standard error of experiments performed with three independent RNA preparations.

Table 3-3 : Effect of mutations in the 900 tetraloop and in helix 24 on translational fidelity.

16S rRNA sequence	Frequency of miscoding events		
	Readthrough	-1 Frameshift	Misincorporation
Wild-type	1.0	1.0	1.0
A900G	2.3 ± 0.4	2.2 ± 0.2	2.9 ± 0.3
G769C / C810A	2.0 ± 0.2	1.7 ± 0.2	2.5 ± 0.2
G769U / C810A	1.2 ± 0.2	0.9 ± 0.1	1.3 ± 0.2
A900G / G769C / C810A	1.0 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.6 ± 0.2
A900G / G769U / C810A	1.0 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.6 ± 0.2

The frequencies of readthrough of the UGA stop codon, of -1 frameshifting and of aminoacid misincorporation were obtained by dividing the luciferase activity with the UGA, -1 frameshift or R218G construct by that obtained with a wild-type luciferase construct. A value of 1.0 was arbitrarily ascribed to the wild-type 16S rRNA (experimental values in percent were, respectively, 2.0(±0.2), 0.22(±0.06) and 0.19(±0.02) × 10⁻³ for readthrough, frameshifting and misincorporation). Results are the means ± standard error of three to five independent experiments.

Figure 3-1 : Interaction between helix 24 and the 900 tetraloop of *E. coli* 16S rRNA.

- A. Location of the 900 tetraloop and its receptor in a portion of the secondary structure of *E. coli* 16S rRNA (central domain and part of the 5' domain), adapted from the Comparative RNA Web Site (<http://www.rna.icmb.utexas.edu>). The 900 tetraloop capping helix 27 and its receptor in helix 24 are boxed in red and blue, respectively.
- B. Crystal structure of the 30S subunit of *T. thermophilus*, in complex with an mRNA fragment (Ogle et al., 2001). RNA is in light gray and proteins in dark gray. The RNA helices to which we refer in the text are shown in space-filling model. The 900 tetraloop capping helix 27 and its receptor at the base of helix 24 are in red and dark blue, respectively. Ribosomal protein S12 and the mRNA fragment in the A site are also shown.
- C. Schematic of the interactions between the 900 tetraloop and helix 24, as seen in the crystal structure of the 30S subunit. The 900 tetraloop docks into the minor groove of helix 24. The major contacts involve positions C899 and A900 (boxed) that interact with the boxed positions in helix 24. The ribose-phosphate of positions 900 and 901 in the 900 tetraloop and that of positions 770 and 771 in helix 24 (in blue) interact with the 23S rRNA, forming the intersubunit bridge B2c (Yusupov et al., 2001).
- D. Selection of compensatory mutations for the A900G mutation with the instant evolution approach. The 900 tetraloop contains the A900G mutation, shown in red. The three base pairs at the base of helix 24 (in red) were randomized and sequences that compensate for the decreased

activity caused by the A900G mutation were selected *in vivo*, using a specialized ribosome system (Lee et al., 1997; Morosyuk et al., 2000; Morosyuk et al., 2001b).

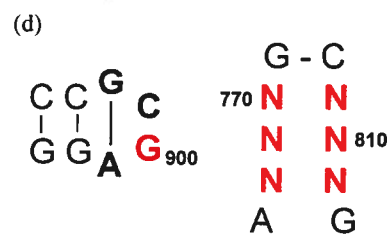
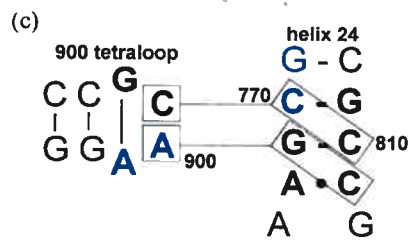
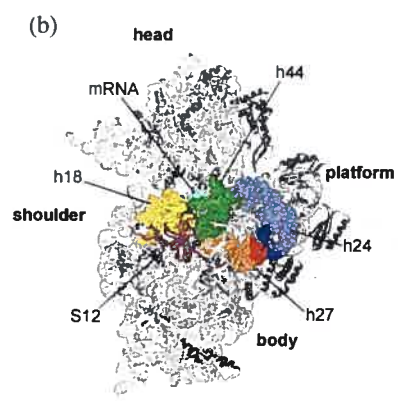
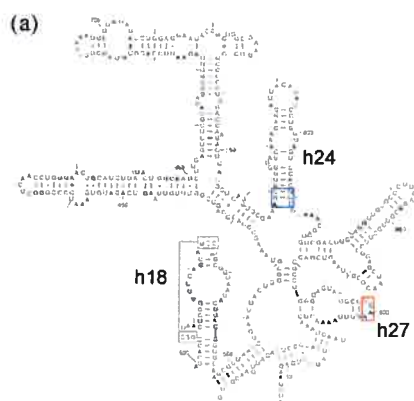


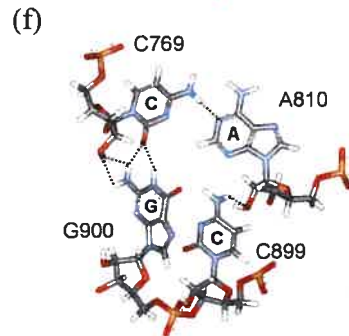
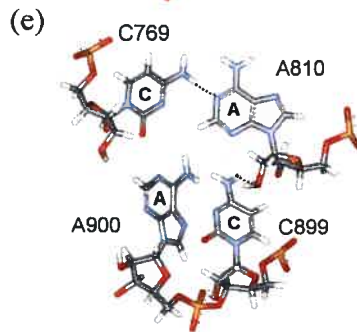
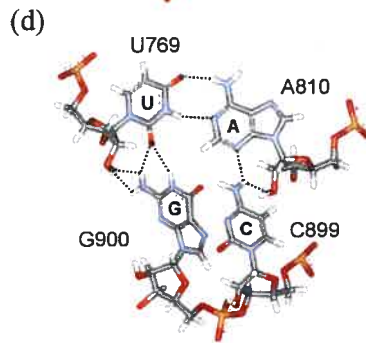
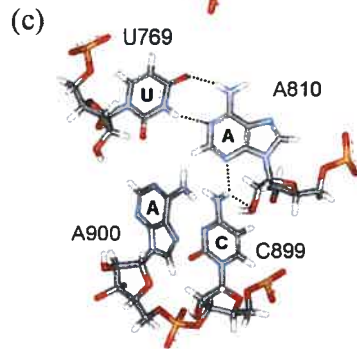
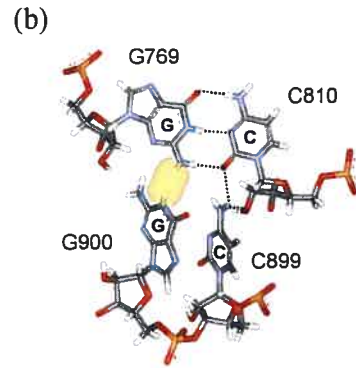
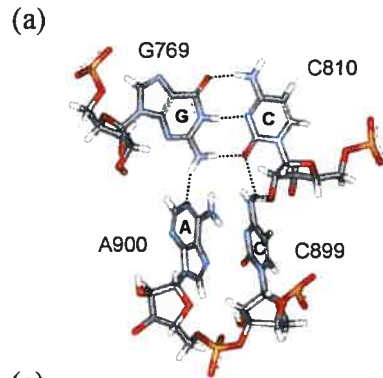
Figure 3-2 : Second-site mutations in helix 24 that compensate for the A900G mutation and activities of the mutated ribosomes. The top panel shows the wild-type sequence in helix 24, along with the two compensatory mutations that were selected. Mutated positions are shown in red. GFP activities for each sequence in the absence or presence of the A900G mutation are indicated (in %). Results are the means \pm standard error of three to five independent experiments.

Helix 24

	C - G ⁷⁶⁹ G - C ⁸¹⁰ A • C WT	C - G C • A A • C G769C/C810A	C - G U - A A • C G769U/C810A
A900	100	10 ± 1	72 ± 5
A900G	10 ± 1	32 ± 2	39 ± 2

Figure 3-3 : Computer modeling of the 900 tetraloop/receptor mutations, using the crystal structure of the 30S subunit of *T. thermophilus* (Wimberly et al., 2000) (PDB accession number: 1FJF).

- A. Interaction of C899 and A900 with base pair G769-C810 in the wild-type structure.
- B. A900G mutation.
- C. G769U/C810A mutation.
- D. A900G/G769U/C810A mutation.
- E. G769C/C810A mutation.
- F. A900G/G769C/C810A mutation.



Chapitre IV

A functional relationship between helix 1 and the 900 tetraloop of 16S ribosomal RNA within the bacterial ribosome.

François Bélanger¹, Gabriel Théberge-Julien¹, Philip R. Cunningham²
et Léa Brakier-Gingras^{1*}.

¹Département de Biochimie
Université de Montréal
Montréal, Québec, Canada
H3T 1J4

²Department of Biological Sciences
Wayne State University
Detroit, MI, 48202, USA

RNA (2005) 11, sous presse

Abstract

The conserved 900 tetraloop that caps helix 27 of 16S ribosomal RNA (rRNA) interacts with helix 24 of 16S rRNA and also with helix 67 of 23S rRNA, forming the intersubunit bridge B2c, proximal to the decoding center. In previous studies, we investigated how the interaction between the 900 tetraloop and helix 24 participates in subunit association and translational fidelity. In the present study, we investigated if the 900 tetraloop is involved in other undetected interactions with different regions of the *Escherichia coli* 16S rRNA. Using a genetic complementation approach, we selected mutations in 16S rRNA that compensate for a 900 tetraloop mutation, A900G, which severely impairs subunit association and translational fidelity. Mutations were randomly introduced in 16S rRNA, using either a mutagenic XL1-Red *E. coli* strain or an error-prone PCR strategy. Gain-of-function mutations were selected *in vivo* with a specialized ribosome system. Two mutations, the deletion of U12 and the U12C substitution, were thus independently selected in helix 1 of 16S rRNA. This helix is located in the vicinity of helix 27, but does not directly contact the 900 tetraloop in the crystal structures of the ribosome. Both mutations correct the subunit association and translational fidelity defects caused by the A900G mutation, revealing an unanticipated functional interaction between these two regions of 16S rRNA.

Introduction

The ribosome is a complex ribonucleoprotein responsible for protein synthesis in all organisms. The elucidation of crystal structures of the ribosome and of its subunits has given unprecedented insights into the intricate folding of ribosomal RNA (rRNA) and its interaction with ribosomal proteins (Ban et al., 2000; Schlutzen et al., 2000; Wimberly et al., 2000; Harms et al., 2001; Yusupov et al., 2001). However, high-resolution X-ray structures provide only static pictures of the ribosome, which undergoes important conformational changes during the different steps of protein synthesis. Cryo-electron microscopy (cryo-EM) has proven very useful to study the structure of the ribosome in different functional states (Frank & Agrawal, 2000; van Heel, 2000), but its resolution is limited to 7 Å. Detailed structures of all the functional states of the ribosome will be required to understand its dynamics and the interplay between the different rRNA regions as well as between rRNA and proteins.

The study of the crystal structure of the 30S subunit from *Thermus thermophilus*, complexed with mRNA and cognate tRNA fragments or with paromomycin, an error-inducing antibiotic, revealed how the decoding center of the 30S subunit recognizes cognate tRNAs, using an induced-fit mechanism (Ogle et al., 2001; 2002; 2003). Upon binding of a tRNA to the ribosome, nucleotides A1492 and A1493 flip out of helix 44, while nucleotide G530 of helix 18 switches from a *syn* to an *anti* conformation, so as to interact with the minor groove of the codon-anticodon duplex. Recognition of a cognate codon-anticodon interaction triggers a conformational rearrangement of the whole 30S subunit, which changes from an open conformation to a more compact one, the closed conformation, with the head and shoulder closing around the A-site tRNA (Ogle et al., 2001; 2002; 2003). In an independent crystallographic study of the *Escherichia coli* 70S ribosome, the movement of the head was related to subunit association (Vila-Sanjurjo et al., 2003).

Another important player in tRNA selection is helix 27 of 16S rRNA. Helix 27 is capped by a highly conserved GCAA tetraloop, the 900 tetraloop, which docks into the minor groove of the 769-810 region, in helix 24 of 16S rRNA (Schlunzen et al., 2000; Wimberly et al., 2000). The other end of helix 27 contacts helix 44, close to the decoding center (Schlunzen et al., 2000; Wimberly et al., 2000). Helix 27 was previously proposed to undergo a base-pairing rearrangement during tRNA selection (Lodmell & Dahlberg, 1997). Further studies did not support that this rearrangement is associated with tRNA selection (Velichutina et al., 2000; Vila-Sanjurjo et al., 2003; Rodriguez-Correa & Dahlberg, 2004), but did not exclude the possibility that it could occur during translation. Nevertheless, a role for helix 27 and its capping loop in translational accuracy is supported by mutagenesis studies (Velichutina et al., 2000; Bélanger et al., 2002). The 900 tetraloop is also involved in the formation of the intersubunit bridge B2c (Yusupov et al., 2001).

We previously showed that mutations in the 900 tetraloop or mutations in its receptor in helix 24 decrease ribosome activity, impair translational accuracy and interfere with subunit association. The simultaneous presence of these mutations restore ribosome activity, translational accuracy and subunit association, indicating that these mutations are complementary (Bélanger et al., 2004). This work demonstrated the functional importance of the interaction between helix 24 and the 900 tetraloop that is detected in the crystal structure of the 30S subunit. Since the structure of the ribosome is dynamic, it can be suggested that the 900 tetraloop could be involved in alternative interactions during protein synthesis, in addition to its interaction with helix 24. In order to identify direct or indirect interactions not detected in the crystal structures, we carried out genetic complementation experiments where we selected random mutations in the 16S rRNA that complement a deleterious mutation in the 900 tetraloop. We used the weakly active A900G mutant of the 900 tetraloop and introduced random mutations in 16S rRNA, using either an XL1-Red mutator strain or an error-prone PCR technique. Gain-of-function mutations were selected

in vivo, using a specialized ribosome system (Lee et al., 1997; Morosyuk et al., 2000; 2001b). Mutations that compensate for the A900G mutation were thus selected in helix 1 of 16S rRNA.

Results

Selection of mutations in 16S rRNA that complement a mutation in the 900 tetraloop

In the present study, we first selected random mutations in the 16S rRNA of *E. coli* that can compensate for the deleterious effect of the A900G mutation in the 900 tetraloop capping helix 27. This selection was made *in vivo* with the specialized plasmid pASS2-GFP2, which contains a copy of the 16S rRNA gene, under control of an inducible *lac* promoter. It also contains two reporter genes, one coding for chloramphenicol acetyltransferase (CAT) and the other for the green fluorescent protein (GFP). The Shine-Dalgarno sequence of the reporter genes and the anti-Shine-Dalgarno sequence of the plasmid-encoded 16S rRNA are mutated, so that only the ribosomes containing the plasmid-encoded 16S rRNA are able to bind to and translate the CAT and GFP messengers. The CAT reporter gene confers resistance to chloramphenicol and is used to select functional mutants that grow on chloramphenicol. The GFP reporter gene allows for an accurate quantification of the activity of the mutants. For the genetic complementation assays, we used pASS2-GFP2/A900G, a pASS2-GFP2 derivative containing the A900G mutation in the 16S rRNA gene. Random mutations were introduced in the 16S rRNA gene with two independent approaches. The first approach used an XL1-Red mutator strain from Stratagene, which has a rate of mutation 5000 times higher than a wild-type *E. coli* strain. Plasmid pASS2-GFP2/A900G was propagated in the XL1-Red strain, a pool of randomly mutated plasmids was obtained (see Materials and Methods for details) and was introduced into wild-type *E. coli* DH5 cells. The second approach used to generate a pool of random

mutants was an error-prone PCR method. The 16S rRNA gene from plasmid pASS2-GFP2/A900G was amplified by PCR with the *Taq* DNA polymerase in the presence of 0.2 mM MnCl₂. Under these conditions, one or two random mutations were introduced per PCR product (data not shown). The PCR products were then used to replace the corresponding 16S rRNA sequence in pASS2-GFP2/A900G. Ligation reactions were electroporated into *E. coli* DH5 cells and complementary mutations were selected in *E. coli* DH5 cells from the pools of random mutations obtained with both mutagenesis approaches. The cells were incubated with isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) to induce expression of the 16S rRNA gene. Cells were plated in the presence of 175 μg/ml of chloramphenicol and surviving clones were picked (the minimal inhibitory concentration of chloramphenicol for the A900G mutant is 100 μg/ml). The 16S rRNA sequence from surviving clones was sub-cloned in the original pASS2-GFP2/A900G plasmid, so as to eliminate any possible mutation outside the 16S rRNA sequence. Clones that conserved the phenotype of complementation were sequenced.

With the pool obtained with the XL1-Red strain, about 2 million clones were screened and 15 surviving clones were sequenced. Nine clones were true revertants, for which A900G was reverted to wild-type, and six clones contained a U12C substitution in addition to the A900G mutation. With the pool obtained with the PCR approach, a total of approximately 50,000 transformants were screened and 17 clones were sequenced. Ten of these clones were true revertants but, in seven clones, in addition to the A900G mutation, a U at position 12 was deleted. Both complementary mutations obtained are located in helix 1. As shown in Figure 1, helix 1 contains three Watson-Crick base pairs followed by an irregular part, containing a stretch of three adjacent Us corresponding to nucleotides 12-14. The deletion mutation was designated ΔU12, though any of the three Us could be considered as deleted. No other mutation was found, suggesting that helix 1 may be the only region of the 16S rRNA where a single mutation can complement the A900G mutation. Complementary mutations in helix 24 that were previously obtained by site-

directed mutagenesis (Bélanger et al., 2004) were not selected in the present study. These are double mutations and the probability that they occur among the pool of random mutations is very low. It is important to point out that the irregular portion of helix 1 is a part of an important structure called the central pseudoknot of 16S rRNA. As illustrated in Figure 1, this pseudoknot is made of helices 1 and 2, helix 2 being formed by the interaction between residues 913-920, adjacent to helix 27, and the loop of helix 1. The existence of helix 2 had been first predicted by phylogenetic analysis, which revealed Watson-Crick base pairs between residues 17-19 and 916-918 (Gutell et al., 1994). The crystal structure confirmed these base pairs and showed that helix 2 is longer than initially proposed, with residues 913-915 and 919-920 making non-Watson-Crick base pairs with residues 20-22 and 15-16, respectively. The importance of the central pseudoknot will be addressed in the Discussion. The stretch of three Us at positions 12-14, where mutations were selected, is highly conserved. The identity of each of these positions is conserved by more than 98% (Comparative RNA Web Site: <http://www.rna.icmb.utexas.edu>).

Functional studies of mutations in helix 1 of the 16S rRNA.

The effect of the U12C and Δ U12 mutations of 16S rRNA helix 1 on ribosome activity was examined both in the presence and in the absence of the A900G mutation. Ribosomal activities were measured with the GFP reporter gene of plasmid pASS2-GFP2 (Table 1). As reported previously, the A900G mutation severely decreases the ribosomal activity relative to wild-type (7%). In the presence of the complementary U12C or Δ U12 mutation, the GFP activity is increased to 47% and 37% relative to wild-type, respectively. When these mutations of helix 1 are present alone, they only mildly affect ribosomal activity. The U12C mutant is almost as active as the wild-type (90%), while the Δ U12 deletion lowers the ribosomal activity to 70% of the wild-type. Our group previously characterized the U13A mutation at a neighboring position, using a plasmid that contains an

rrnB operon under the control of a thermoinducible promoter. It was found that this mutation confers resistance to streptomycin, an error-inducing antibiotic, and increases translational fidelity (Pinard et al., 1993; 1994). We decided to investigate whether the U13A mutation also compensates for the A900G mutation. We introduced this mutation in plasmid pASS2-GFP2, using a standard PCR approach, and examined its effect on ribosomal activity in the presence and absence of the A900G mutation. As shown in Table 1, the U13A mutation alone has a small effect on ribosomal activity (69%). When it is combined with the A900G mutation, the resulting activity is 22%, showing that the U13A mutation can also compensate for the A900G mutation, albeit not as efficiently as U12C or Δ U12.

Mutations in the 900 tetraloop decrease translational fidelity and impair subunit association. We investigated the effect of mutations in helix 1 on these two ribosomal functions in the presence or absence of the A900G mutation. The effect of the mutations on subunit association was assessed as previously reported (Bélanger et al., 2002; 2004). The populations of free 30S subunits, 70S ribosomes and polysomes were fractionated from cells expressing the various rRNA mutants. RNA was extracted from each fraction and the proportion of plasmid-encoded 16S rRNA was measured using a primer extension inhibition technique (Sigmund et al., 1988). The results are presented in Figure 2. With a wild-type 16S rRNA sequence, the proportion of plasmid-encoded 16S rRNA is about 50% in each fraction. With the A900G mutation, the proportion of plasmid-encoded 16S rRNA in 70S ribosomes and polysomes drops to about 10%, and we previously demonstrated that this decrease is caused by a defect in subunit association (Bélanger et al., 2004). When the A900G mutation is combined with a complementary mutation in helix 1, the proportion of plasmid-encoded 16S rRNA in the 70S and polysome fractions increases to levels close to that in the free 30S fraction. When mutations in helix 1 are present in the context of a wild-type 900 tetraloop, the plasmid-encoded 16S rRNA distribution is equivalent in each fraction, as it is the case for the wild-type. From these observations, we conclude that the

mutations in helix 1 correct the subunit association defect caused by the A900G mutation, but have no effect on subunit association on their own.

To study the effect of mutations in helix 1 on translational fidelity, we used derivatives of plasmid pRNAluc2 (Bélanger et al., 2004), a specialized plasmid similar to pASS2-GFP2, except that it contains a copy of the whole *rrnB* operon and not only the 16S rRNA gene. It also harbors a very sensitive reporter gene coding for the firefly luciferase. Plasmid pRNAluc2/UGA and pRNAluc2/-1 contain cassettes in the beginning of the coding sequence of the luciferase gene that introduce a UGA stop codon and a -1 frameshift mutation, respectively. With these plasmids, the production of luciferase requires either a readthrough or -1 frameshift. A third plasmid, pRNAluc2/R218G, contains a R218G mutation in the active center of the luciferase, so that synthesis of active luciferase requires an aminoacid misincorporation at this codon. The U12C, Δ U12 and U13A mutations, with or without the A900G mutation, were introduced in the sequence of the 16S rRNA gene of these derivatives and values for the luciferase activities were measured. The results in Figure 3 show that the A900G mutation causes a large increase in the level of misincorporation, frameshift and readthrough. The presence of the complementary mutations in helix 1 restores translational fidelity close to the wild-type level in the miscoding and frameshifting assays. However, for readthrough assays, only the U12C mutation significantly decreases the readthrough caused by the A900G mutation, whereas the Δ U12 and U13A mutations do not, or only slightly, decrease the readthrough levels. When mutations in helix 1 are examined in the context of a wild-type 900 tetraloop, they do not affect miscoding or frameshift levels but the Δ U12 and U13A mutations increase the readthrough levels. An increased level of readthrough can result from either a decrease in translational fidelity or a defect in the termination step (Murgola et al., 1995). Since the Δ U12 and U13A mutations do not change the miscoding and frameshift levels, it is likely that their effect on readthrough is independent of the decoding function. We conclude that mutations in helix 1 do not alter translational fidelity, although they can correct the fidelity

defect caused by the A900G mutation. The lack of effect of the U13A mutation on translational fidelity is in disagreement with the study by Pinard *et al* (1994), who reported that this mutation increases translational fidelity. This discrepancy will be addressed in the Discussion.

Discussion

In the present study, we showed that mutations in helix 1 of 16S rRNA can compensate for the deleterious effect of the A900G mutation in the 900 tetraloop capping helix 27, implying a functional relationship between these two regions. To get further insight into the relationship between helix 1 and the 900 tetraloop, we examined these regions in the crystal structure of the 30S subunit from *T. thermophilus* (Wimberly *et al.*, 2000). Figure 4 presents the structure of helices 1 and 27, and also that of helix 24, which contains the receptor for the 900 tetraloop. Helix 1 is located in the center of the 30S subunit, at the junction of the head, body and platform, helix 24 is on the platform of the 30S subunit at the subunit interface and helix 27 is positioned perpendicularly to and between helix 1 and helix 24. The 900 tetraloop interacts with the 768-770/809-811 base pairs of helix 24. The backbone of nucleotides 900-901 and that of 770-771 contact helix 67 of 23S rRNA, forming the intersubunit bridge B2c (Yusupov *et al.*, 2001). We showed previously that the A900G mutation causes a steric clash between G900 and G769, which impairs the docking of the 900 tetraloop into its receptor and interferes with the formation of intersubunit bridge B2c (Bélanger *et al.*, 2004). At the other extremity of helix 27, the adjacent segment encompassing nucleotides 913-920 interacts with the loop of helix 1, forming helix 2, as described above, which creates the central pseudoknot of the 30S subunit. Mutations that disrupt the central pseudoknot destabilize the 30S subunit and impair subunit association, demonstrating the importance of the central pseudoknot for ribosome function (Brink *et al.*, 1993; Poot *et al.*, 1996). It had been suggested that the

central pseudoknot is subject to conformational rearrangements involving alternate base pairings, during protein synthesis (Kössel et al., 1990; Leclerc & Brakier-Gingras, 1991), but these rearrangements were not supported by mutagenesis experiments (Pinard et al., 1993; Poot et al., 1998). It can also be observed that helix 1 is packed between ribosomal proteins S5 and S12. Protein S5 is located on the solvent side of the 30S subunit and interacts with residues at position 15, 18 and 19 of helix 1. Protein S12 is located at the subunit interface and interacts with residues at position 909 in helix 27, and at position 913 at the junction of helix 27 and the central pseudoknot. Additional interactions involving helix 1 are revealed by the analysis of the crystal structure but are not shown on Figure 4 for the sake of clarity. Helix 1 forms a co-axial stack with helix 28, which connects the head of the 30S subunit to its body. Nucleotides U12 and G15 contact, respectively, nucleotide C526 of helix 18 and nucleotide A1396 at the junction of helices 28 and 44. Also, the crystal structure of the 30S subunit complexed with streptomycin showed that the phosphate of U14 is involved in the binding of streptomycin (Carter et al., 2000).

As illustrated in Figure 4, the 900 tetraloop and the central pseudoknot are positioned on the opposite ends of helix 27, indicating that the complementation between mutations in helix 1 and in the 900 tetraloop cannot result from a direct interaction. Site-directed crosslinking studies with 4-thiouridine identified a crosslink between residue U14 of helix 1 and the 903-904 region of helix 27, very close to the 900 tetraloop (Juzumiene & Wollenzien, 2001), but such a crosslink is incompatible with the crystal structure of the 30S subunit. It is known that the top of helix 44 and neighboring helices, such as helices 1 and 27, have some conformational flexibility (VanLoock et al., 2000; Gabashvili et al., 2003; Druzina & Cooperman, 2004), but a direct contact between nucleotides U14 and 902-903 would require the disruption of helix 2 and a drastic displacement of helices 1 and 27. We rather propose that mutations in helix 1 affect the 900 tetraloop indirectly. Nucleotides 12 to 14 are involved in base-triple interactions with a portion of helix 2 (see Figure 1). It was previously shown that the U13A mutation causes a small increase in the binding of a probe

complementary to the 915-921 region and in the reactivity of G917 to kethoxal (Pinard et al., 1995). The increased accessibility of residues within the central pseudoknot indicates that the U13A mutation destabilizes helix 2, making this pseudoknot more flexible. We hypothesize that the U12C and Δ U12 mutations have a similar effect. The U12C and U13A mutations introduce potential Watson-Crick base pairs whereas the Δ U12 mutation, by removing one nucleotide from the apical loop of helix 1 may be expected to stabilize this loop. It is likely that the increased flexibility of the central pseudoknot results from an increased rigidity of helix 1 and its capping loop, favoring a transient disruption of helix 2. The increased flexibility of the central pseudoknot caused by the U12C, Δ U12 and U13A mutations could decrease some of the constraints on the spatial orientation of helix 27, this effect being communicated via the connecting 913-915 segment. The increased mobility of helix 27 could facilitate the docking of the mutated 900 tetraloop into its receptor, by avoiding the steric clash between G900 and G769 of helix 24. Restoring the interaction between the 900 tetraloop and helix 24 would then favor the formation of the intersubunit bridge B2c, correcting the defect in subunit association caused by the A900G mutation. One could suggest that other mutations in the central pseudoknot could also increase its flexibility and compensate for the A900G mutation. However, no mutation was selected at positions other than 12 to 14, possibly because such mutations severely perturb the structure of the pseudoknot, thus strongly impairing the ribosome function. Proteins S5 and S12 also interact with the central pseudoknot, as described above. It is interesting to recall that the binding of either S5 or S12 to the 16S rRNA induces protection of bases A900 and A901 against dimethylsulfate attack (Stern et al., 1988b). One likely interpretation of this protection, in light of the X-ray structure of the 30S subunit, is that these proteins, when interacting with 16S rRNA, help the reorientation of helix 27 so as to facilitate the docking of the tetraloop into its receptor. Proteins S5 and S12 could also contribute to the coupling of a movement of helix 27 with structural perturbations in the central pseudoknot. This appears to be especially true for protein S12 that interacts simultaneously with residue 909 in helix 27 and 913 in the central pseudoknot.

We previously proposed that the A900G mutation promotes the transition from the open to the closed conformation of the 30S subunit upon tRNA binding (Bélanger et al., 2004). If mutations in helix 1 facilitate the docking of the 900 tetraloop into its receptor, they also antagonize the effect of the A900G mutation on the transition from the open to the closed 30S conformation. This would explain how the mutations in helix 1 correct the fidelity defect caused by the A900G mutation. In the absence of the A900G mutation, mutations in helix 1 do not impair the control of translational accuracy. This contrasts with poly(U)-directed *in vitro* assays that previously showed that the U13A mutation increases the control of translational fidelity (Pinard et al., 1994). It is likely that the slower kinetics of translation *in vitro* make the ribosomes more sensitive to subtle structural changes that do not have a significant effect *in vivo*. We also observed that the U13A and Δ U12 mutations increase the levels of UGA readthrough although they do not change the level of miscoding or frameshift. As mentioned above, a change in the readthrough level can reflect either a change in translational fidelity or a perturbation of the termination process (Murgola et al., 1995). The latter situation could account for the effect of the U13A and Δ U12 mutations on the level of a stop codon readthrough.

Lastly, we observed that mutations in helix 1 alone mildly decrease the translational activity of the ribosome. This decrease in activity cannot be ascribed to a defect in the initiation of translation since, in that case, the proportion of mutant 30S subunits in the 70S and polysome populations would have been decreased. An attractive hypothesis is that these mutations could slightly perturb the translocation step. The central pseudoknot is indeed located at the junction of head, body and platform of the 30S subunit, close to the axis of rotation of the ratchet-like movement that occurs between the two ribosomal subunits during translocation (Frank & Agrawal, 2000; Gao et al., 2003; Valle et al., 2003b). The increased flexibility conferred to the central pseudoknot by mutations in helix 1 could alter the dynamics of the conformational movements that occur during translocation, resulting in the observed decrease in ribosome activity.

To conclude, our study reveals an indirect functional relationship between helix 1 and the 900 tetraloop capping helix 27 of 16S rRNA. It will be interesting to investigate whether mutations in helix 1 can complement other mutations in helix 27 or in other regions of the 16S rRNA. Unanticipated functional relationships can be readily detected with genetic complementation studies, as illustrated by the present work. The application of this approach to various strategic rRNA regions, combined with the information provided by high-resolution X-ray structures, can efficiently contribute to further increase our understanding of ribosome function.

Materials and Methods

Reagents

Restriction enzymes were from New England Biolabs, Fermentas and Amersham Biosciences. Calf intestine alkaline phosphatase and T4 polynucleotide kinase were from Amersham Biosciences, T4 DNA ligase was from Fermentas and M-MLV reverse transcriptase was from Invitrogen. Oligonucleotides were purchased from Integrated DNA Technology.

Bacterial strains and plasmids

All plasmids were maintained in *E. coli* DH5. Cultures were grown in LB medium with 100 µg/ml ampicillin (LB-Ap100). Plasmid pASS2-GFP2 was constructed in the laboratory of P. R. Cunningham and will be described elsewhere. Briefly, it contains a copy of the 16S rRNA gene under control of the *lacUV5* promoter, and the CAT and GFP genes, each under the control of a constitutive tryptophan promoter. The Shine-Dalgarno

sequences of both CAT and GFP messengers are changed to 5'-AUCCC and the anti-Shine-Dalgarno sequence of the 16S rRNA is changed to 5'-GGGAU. The synthesis of plasmid-encoded 16S rRNA was induced by addition of IPTG to a final concentration of 1 mM. Plasmid pRNAluc2 contains a copy of the *rrnB* operon under control of the inducible *lacUV5* promoter and a reporter gene coding for the firefly luciferase (Bélanger et al., 2002). Plasmids pRNAluc2/UGA and pRNAluc2/-1 contain a cassette in the beginning of the coding sequence of luciferase with a UGA stop codon or a -1 frameshift mutation. Plasmid pRNAluc2/R218G contains a mutation that replaces arginine 218 of luciferase with a glycine (R218G), a mutation that inactivates luciferase (Viviani et al., 2002).

Random mutagenesis of 16S rRNA and selection of compensatory mutations

Plasmid pASS2-GFP2 bearing the A900G mutation was introduced into *E. coli* XL1-Red strain (Stratagene), following the manufacturer's instructions. Cells were plated on LB-Agar-Ap100 and grown for 24 hours at 37°C. About 200 colonies were picked into a single culture that was grown overnight at 37°C, followed by a plasmid preparation. The pool of randomly mutated plasmids thus obtained was introduced into *E. coli* DH5. The culture was induced with 1 mM IPTG for three and a half hours before plating on LB-Agar-Ap100 supplemented with 1mM IPTG and 175 µg/ml of chloramphenicol. After 24 hours of incubation at 37°C, surviving colonies were picked. To ensure that the complementary mutation is located in the 16S rRNA gene, *BglII-BstEII* or *ApaI-ApaI* fragments of the plasmids extracted from the surviving cells were cloned into pASS2-GFP2/A900G. Clones that conserved the complementation phenotype were sequenced

Amplification of the 16S rRNA gene from pASS2-GFP2/A900G was made with an error-prone PCR, using *Taq* DNA polymerase in the presence of 0.2 mM MnCl₂. Primers were 16S-5': 5'-CCAAGTCTCAAGAGTGAACACG-3' and 16S-1542REV:

5'-TAATCCCATGATCCAACCGC-3'. The PCR fragments were cloned back into pASS2-GFP2/A900G, using the unique *Bst*EII and *Bcl*I restriction sites located at each extremity of the 16S rRNA sequence. Ligation products were electroporated in *E. coli* DH5 cells and gain-of-function mutations were selected as described above.

The double U13A/A900G mutation was introduced into plasmid pASS2-GFP2 with a two-step PCR approach, using an overlap extension procedure (Ho et al., 1989). The final PCR product was cloned in pASS2-GFP2, using the two *Apa*I sites. PCR1 used primer U13A-REV 5'-AATTGAAGAGTATGATCATGGCTCAGATTGAACG-3' (the U13A mutation is in bold) and primer A900G-FWD 5'-CCACCGCTTGTGCGG-GCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTCGCGGCCGTACTCC-3' (*Apa*I site is underlined and the A900G mutation is in bold). PCR2 used primer U13A-FWD 5'-GCGTTCAATCTGAGCCATGATC-3' and primer *Apa*I-REV 5'-GGCACAACAACCTG-GCGGGCAAACAGTCG-3', located downstream from the second *Apa*I site. The final PCR was made using PCR1 and PCR2 as the template and primers A900G-FWD and *Apa*I-REV. A single mutant for which A900G is reverted to wild-type was constructed with a standard PCR approach from each double mutant. The primers used were A900WT-FWD 5'-CCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGC GGCCGTACTCC-3' (*Apa*I site is underlined and position 900 is in bold) and *Apa*I-REV described above. The PCR product was cloned in plasmid pASS2-GFP2, using the two *Apa*I sites.

GFP and luciferase assays

Overnight cultures from plasmid-containing cells grown in LB-Ap100 were diluted to an optical density of 0.1 at 600 nm in 2 ml and incubated for one hour at 37°C. The cultures were then induced by adding 1 mM IPTG and incubated for another five hours at

37°C for GFP assays and three and a half hours at 37°C for luciferase assays. GFP and luciferase assays were carried out as described (Bélanger et al., 2002).

Analysis of mutant 16S rRNA distribution

Cells containing pASS2-GFP2 and its mutant derivatives were induced for three and a half hours, and ribosomal particles were isolated from bacterial lysates obtained by freezing and thawing, following a standard procedure. Lysates were applied onto a 15% to 40% (w/v) linear sucrose gradient in 20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 5 mM MgCl₂, 100 mM NH₄Cl, 2 mM DTT, and centrifuged at 20,000 rpm for 20 hours in a Beckman SW28 rotor at 4°C. Fractions containing free 30S subunits, 70S ribosomes and polysomes were detected at 260 nm and collected with an ISCO gradient fractionator. The proportion of plasmid-encoded 16S rRNA in RNA isolated from these fractions and from the crude lysate was determined by primer extension, as described (Sigmund et al., 1988; Bélanger et al., 2002).

Acknowledgments

We wish to thank Pascale Legault, Mélissa Léger, Stephen Michnick and Sergey Steinberg for critical reading of this manuscript and for stimulating comments. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to L.B.-G. and National Institutes of Health (NIH) grant GM52896 to P.R.C. F.B. held a scholarship from the Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche (FCAR) and a travel grant from the Gouvernement du Québec.

Abbreviations

CAT: chloramphenicol acetyltransferase; GFP: green fluorescent protein; IPTG: isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside.

References

- 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.
- Bélanger, F., Gagnon, M.G., Steinberg, S.V., Cunningham, P.R. and Brakier-Gingras, L. 2004. Study of the functional interaction of the 900 Tetraloop of 16S ribosomal RNA with helix 24 within the bacterial ribosome. *J. Mol. Biol.* **338**: 683-693.
- Bélanger, F., Léger, M., Saraiya, A.A., Cunningham, P.R. and Brakier-Gingras, L. 2002. Functional studies of the 900 tetraloop capping helix 27 of 16S ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* **320**: 979-989.
- Brink, M.F., Verbeet, M.P. and de Boer, H.A. 1993. Formation of the central pseudoknot in 16S rRNA is essential for initiation of translation. *EMBO J.* **12**: 3987-3996.
- Carter, A.P., Clemons, W.M., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T. and Ramakrishnan, V. 2000. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **407**: 340-348.
- Druzina, Z. and Cooperman, B.S. 2004. Photolabile anticodon stem-loop analogs of tRNA^{Phe} as probes of ribosomal structure and structural fluctuation at the decoding center. *RNA* **10**: 1550-1562.
- Frank, J. and Agrawal, R.K. 2000. A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature* **406**: 318-322.

- Gabashvili, I.S., Whirl-Carrillo, M., Bada, M., Banatao, D.R. and Altman, R.B. 2003. Ribosomal dynamics inferred from variations in experimental measurements. *RNA* **9**: 1301-1307.
- Gao, H., Sengupta, J., Valle, M., Korostelev, A., Eswar, N., Stagg, S.M., Van Roey, P., Agrawal, R.K., Harvey, S.C., Sali, A., Chapman, M.S. and Frank, J. 2003. Study of the structural dynamics of the *E. coli* 70S ribosome using real-space refinement. *Cell* **113**: 789-801.
- Gutell, R.R., Larsen, N. and Woese, C.R. 1994. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol Rev.* **58**: 10-26.
- Harms, J., Schlutzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F. and Yonath, A. 2001. High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell* **107**: 679-688.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. and Pease, L.R. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51-59.
- Juzumiene, D.I. and Wollenzien, P. 2001. Arrangement of the central pseudoknot region of 16S rRNA in the 30S ribosomal subunit determined by site-directed 4-thiouridine crosslinking. *RNA* **7**: 71-84.
- Kössel, H., Hoch, B. and Zeltz, P. 1990. Alternative base pairing between 5'- and 3'-terminal sequences of small subunit RNA may provide the basis of a conformational switch of the small ribosomal subunit. *Nucleic Acids Res.* **18**: 4083-4088.
- Leclerc, D. and Brakier-Gingras, L. 1991. A conformational switch involving the 915 region of *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA. *FEBS Lett.* **279**: 171-174.
- Lee, K., Varma, S., SantaLucia, J., Jr. and Cunningham, P.R. 1997. *In vivo* determination of RNA structure-function relationships: analysis of the 790 loop in ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* **269**: 732-743.

- Lodmell, J.S. and Dahlberg, A.E. 1997. A conformational switch in *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA during decoding of messenger RNA. *Science* **277**: 1262-1267.
- Morosyuk, S.V., Lee, K., SantaLucia, J., Jr. and Cunningham, P.R. 2000. Structure and function of the conserved 690 hairpin in *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA: analysis of the stem nucleotides. *J. Mol. Biol.* **300**: 113-126.
- Morosyuk, S.V., SantaLucia, J., Jr. and Cunningham, P.R. 2001. Structure and function of the conserved 690 hairpin in *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA. III. Functional analysis of the 690 loop. *J. Mol. Biol.* **307**: 213-228.
- Murgola, E.J., Pagel, F.T., Hijazi, K.A., Arkov, A.L., Xu, W. and Zhao, S.Q. 1995. Variety of nonsense suppressor phenotypes associated with mutational changes at conserved sites in *Escherichia coli* ribosomal RNA. *Biochem. Cell Biol.* **73**: 925-931.
- Ogle, J.M., Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Jr., Tarry, M.J., Carter, A.P. and Ramakrishnan, V. 2001. Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science* **292**: 897-902.
- Ogle, J.M., Carter, A.P. and Ramakrishnan, V. 2003. Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures. *Trends Biochem. Sci.* **28**: 259-266.
- Ogle, J.M., Murphy, F.V., Tarry, M.J. and Ramakrishnan, V. 2002. Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell* **111**: 721-732.
- Pinard, R., Cote, M., Payant, C. and Brakier-Gingras, L. 1994. Positions 13 and 914 in *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA are involved in the control of translational accuracy. *Nucleic Acids Res.* **22**: 619-624.
- Pinard, R., Payant, C. and Brakier-Gingras, L. 1995. Mutations at positions 13 and/or 914 in *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA interfere with the initiation of protein synthesis. *Biochemistry* **34**: 9611-9616.
- Pinard, R., Payant, C., Melancon, P. and Brakier-Gingras, L. 1993. The 5' proximal helix of 16S rRNA is involved in the binding of streptomycin to the ribosome. *FASEB J.* **7**: 173-176.

- Poot, R.A., Pleij, C.W. and van Duin, J. 1996. The central pseudoknot in 16S ribosomal RNA is needed for ribosome stability but is not essential for 30S initiation complex formation. *Nucleic Acids Res.* **24**: 3670-3676.
- Poot, R.A., van den Worm, S.H., Pleij, C.W. and van Duin, J. 1998. Base complementarity in helix 2 of the central pseudoknot in 16S rRNA is essential for ribosome functioning. *Nucleic Acids Res.* **26**: 549-553.
- Rodriguez-Correa, D. and Dahlberg, A.E. 2004. Genetic evidence against the 16S ribosomal RNA helix 27 conformational switch model. *RNA* **10**: 28-33.
- Schlutzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F. and Yonath, A. 2000. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution. *Cell* **102**: 615-623.
- Sigmund, C.D., Ettayebi, M., Borden, A. and Morgan, E.A. 1988. Antibiotic resistance mutations in ribosomal RNA genes of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **164**: 673-690.
- Stern, S., Powers, T., Changchien, L.M. and Noller, H.F. 1988. Interaction of ribosomal proteins S5, S6, S11, S12, S18 and S21 with 16 S rRNA. *J. Mol. Biol.* **201**: 683-695.
- Valle, M., Zavialov, A., Sengupta, J., Rawat, U., Ehrenberg, M. and Frank, J. 2003. Locking and unlocking of ribosomal motions. *Cell* **114**: 123-134.
- van Heel, M. 2000. Unveiling ribosomal structures: the final phases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**: 259-264.
- VanLoock, M.S., Agrawal, R.K., Gabashvili, I.S., Qi, L., Frank, J. and Harvey, S.C. 2000. Movement of the decoding region of the 16 S ribosomal RNA accompanies tRNA translocation. *J. Mol. Biol.* **304**: 507-515.
- Velichutina, I.V., Dresios, J., Hong, J.Y., Li, C., Mankin, A., Synetos, D. and Liebman, S.W. 2000. Mutations in helix 27 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* 18S rRNA affect the function of the decoding center of the ribosome. *RNA* **6**: 1174-1184.

- Vila-Sanjurjo, A., Ridgeway, W.K., Seymaner, V., Zhang, W., Santoso, S., Yu, K. and Cate, J.H. 2003. X-ray crystal structures of the WT and a hyper-accurate ribosome from *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**: 8682-8687.
- Viviani, V.R., Uchida, A., Viviani, W. and Ohmiya, Y. 2002. The influence of Ala243 (Gly247), Arg215 and Thr226 (Asn230) on the bioluminescence spectra and pH-sensitivity of railroad worm, click beetle and firefly luciferases. *Photochem. Photobiol.* **76**: 538-544.
- Wimberly, B.T., Brodersen, D.E., Clemons, W.M., Jr., Morgan-Warren, R.J., Carter, A.P., Vornrhein, C., Hartsch, T. and Ramakrishnan, V. 2000. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407**: 327-339.
- Yusupov, M.M., Yusupova, G.Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T.N., Cate, J.H. and Noller, H.F. 2001. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* **292**: 883-896.

Table 4-1: Effect of mutations in helix 1 of 16S rRNA on ribosome activity, in the presence and absence of the A900G mutation.

Mutation in helix 1	GFP activity (%)	
	A900G	A900 (wild-type)
None	7 ± 1	100
U12C	47 ± 2	90 ± 4
ΔU12	37 ± 2	70 ± 3
U13A	22 ± 1	69 ± 5

Ribosomal activities were assessed using a GFP reporter gene and are expressed as a percentage of wild-type activity. Values are the means ± standard error of three to five independent experiments.

Figure 4-1 : Central portion of the secondary structure of *E. coli* 16S rRNA, showing helix 1 and helix 27 in bold. The strand 3' to helix 27 base pairs with the loop of helix 1, forming helix 2, and the central pseudoknot is made of helices 1 and 2. The secondary structure shown here is derived from the crystal structure of the 30S subunit of *T. thermophilus*. The A900G mutation, the U12C and Δ U12 complementary mutations that were selected in this study, and the U13A mutation are indicated

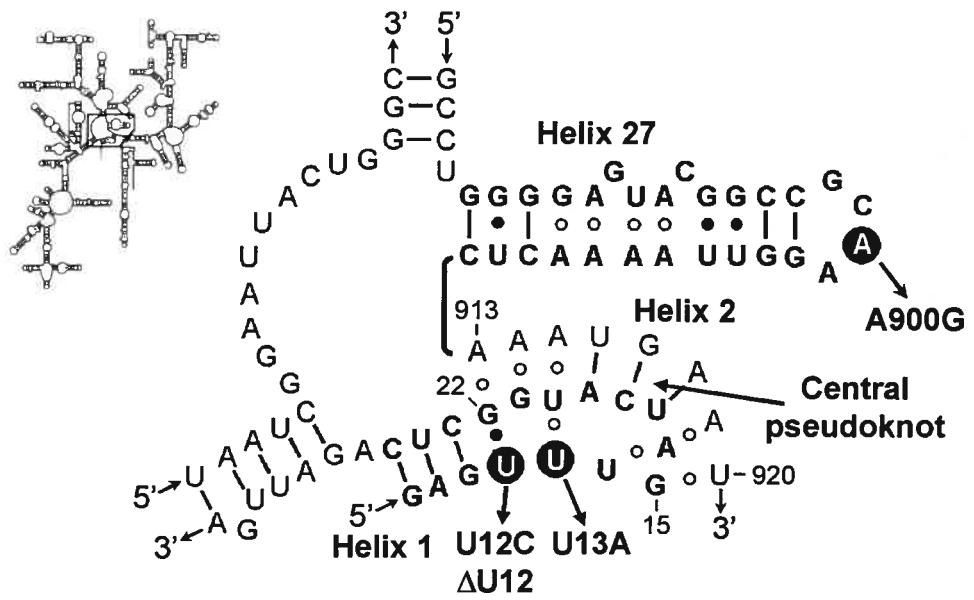


Figure 4-2 : Effect of mutations in helix 1 and in the 900 tetraloop on subunit association. The proportion of plasmid-encoded 16S rRNA in the bacterial lysate and in the free 30S subunit, 70S ribosome and polysome fractions was assessed by a standard primer extension assay (see Materials and Methods). Results are the means \pm standard error of three independent experiments.

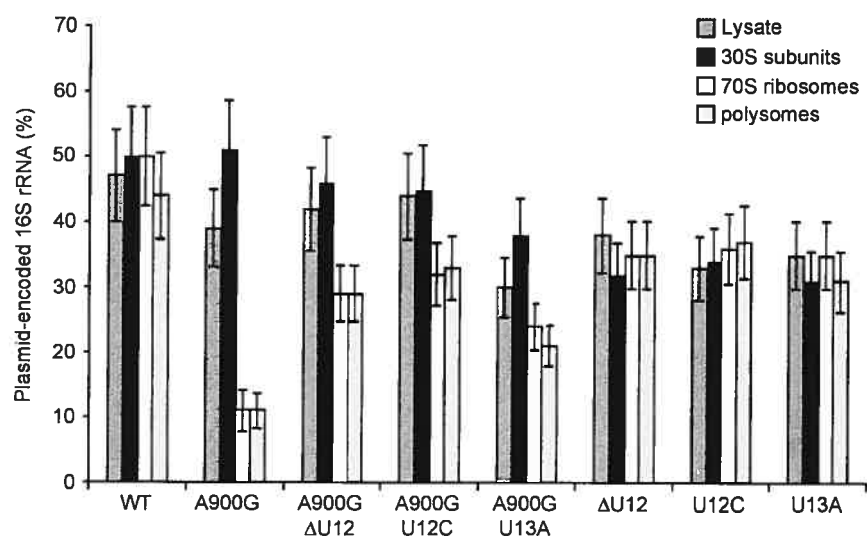


Figure 4-3: Effect of mutations in helix 1 and in the 900 tetraloop on translational fidelity. For each 16S rRNA mutation investigated, the levels of misincorporation, -1 frameshift and UGA readthrough were determined by dividing the luciferase activity with the derivatives of plasmid pRNALuc2/R218G, pRNALuc2/-1 or pRNALuc2/UGA by that obtained with a wild-type luciferase construct. A value of 1.0 was arbitrarily ascribed to the levels measured with wild-type 16S rRNA (experimental values in percent were, respectively, $0.31 (\pm 0.05) \times 10^{-3}$, $0.13 (\pm 0.02)$ and $1.0 (\pm 0.1)$ for wild-type misincorporation, frameshift and readthrough). Results are the means \pm standard error of three to five independent experiments.

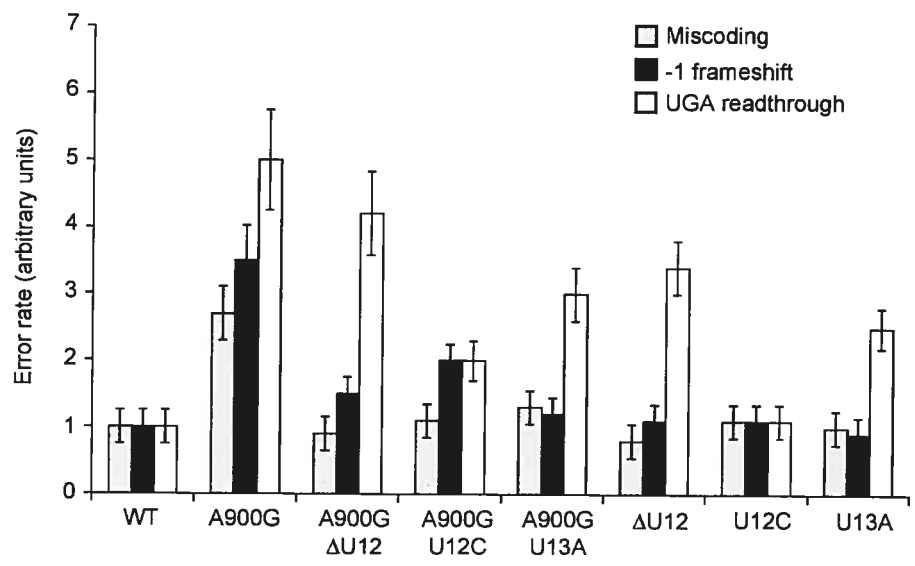
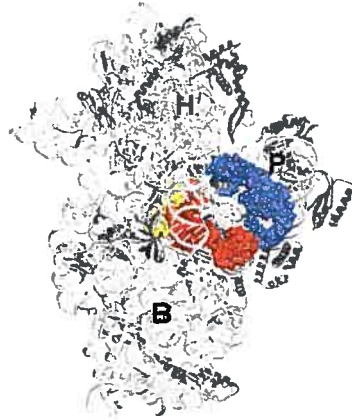


Figure 4-4 : Structure of helix 27 and neighboring regions in the crystal structure of the *T. thermophilus* 30S subunit (Wimberly et al., 2000, PDB accession number 1FJF).

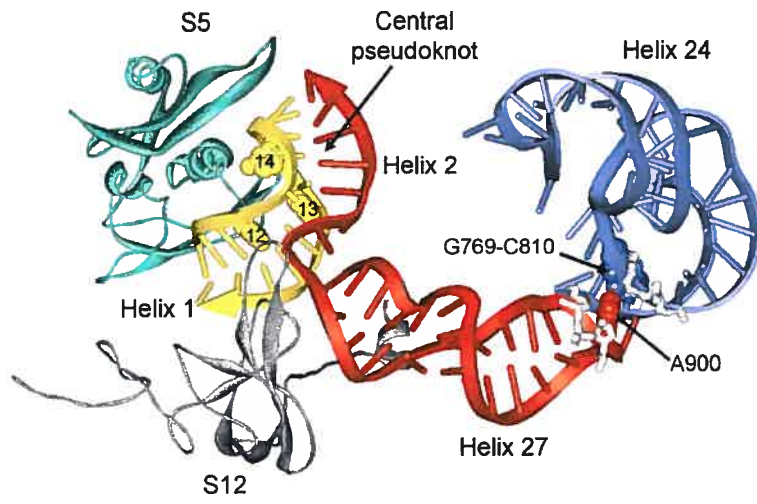
- A. Structure of the 30S subunit viewed from the interface. The letters H, P and B indicate, respectively, the head, platform and body of the subunit. RNA is shown in light gray and proteins in dark gray. Helix 1 is colored in yellow, helix 24 in purple and helix 27 in red.

- B. Details of the structure of helices 24 and 27 and of the central pseudoknot made by helices 1 and 2. Helices are colored as in (A). Nucleotides U12-U14, nucleotide A900 and the G769-C810 base pair of helix 24 are shown in space-filling models (yellow, red and purple, respectively). Ribosomal proteins S5 and S12 are shown in cyan and gray, respectively. The backbone portion of the 900 tetraloop and that of helix 24 involved in intersubunit bridge B2c are represented as white sticks.

A



B



Chapitre V

Discussion

Comprendre le fonctionnement du ribosome nécessite non seulement une connaissance détaillée de sa structure, mais aussi des études approfondies des différentes étapes de la traduction. La tétraboucle 900 est une tétraboucle de type GNRA qui coiffe l'hélice 27, située dans le corps de la sous-unité 30S et à proximité du centre de décodage. Le but de mon projet de recherche a été de comprendre comment cette tétraboucle 900 participe au fonctionnement du ribosome. Nous avons étudié cette question en combinant des études de génétique moléculaire, des essais fonctionnels du ribosome et de la modélisation moléculaire. Dans les deux premiers articles que nous avons publiés, nous avons démontré l'importance fonctionnelle de l'interaction entre la tétraboucle 900 et son récepteur, localisé dans la région 768-770/809-811 de l'hélice 24 de l'ARNr 16S, dans la plate-forme de la sous-unité 30S. Dans le troisième article, nous avons découvert une interaction fonctionnelle indirecte entre la tétraboucle 900 et l'hélice 1 de l'ARNr 16S, localisée elle aussi dans le corps de la sous-unité 30S. Les sections qui suivent font le bilan de l'apport de nos travaux à la compréhension du fonctionnement du ribosome. Ces études ont aussi soulevé de nouvelles interrogations et les dernières sections présentent des expériences qui permettront de répondre à ces questions et de continuer à améliorer notre connaissance du ribosome.

5.1. Justification de l'approche expérimentale

Les expériences présentées dans nos trois articles ont comme base la mutagenèse de l'ARNr 16S et reposent sur l'emploi d'un système de ribosomes spécialisés. Avant de discuter des résultats proprement dits, il est utile de comparer les avantages et les inconvénients de ce système. L'étude des ARNr par mutagenèse est compliquée par le fait que la plupart des organismes procaryotes possèdent plusieurs opérons codant pour leurs ARNr (*E. coli* possède sept de ces opérons). De nombreuses méthodes ont été développées pour étudier l'effet de mutations dans l'ARNr. La méthode la plus simple consiste à

introduire dans des bactéries un plasmide présent en plusieurs copies et contenant un des opérons codant pour les ARNr sous le contrôle d'un promoteur constitutif ou inductible (revue par Brakier-Gingras et al., 2003). Les mutations à étudier sont introduites dans le gène de l'ARNr plasmidique et les ARNr mutants transcrits à partir du plasmide s'associent avec les protéines ribosomiques pour former des ribosomes. Il en résulte une population hétérogène de ribosomes contenant soit des ARNr mutants transcrits à partir du plasmide, soit des ARNr de type sauvage, transcrits à partir du chromosome bactérien. Avec cette approche, l'effet des mutations est donc dilué. Afin d'étudier l'effet de mutations en absence de traduction par les ribosomes de type sauvage, des mutations additionnelles ont été introduites dans les ARNr plasmidiques. Ces mutations, C1192U dans l'ARNr 16S et A2058G dans l'ARNr 23S, confèrent respectivement la résistance à la spectinomycine et à l'érythromycine, des antibiotiques qui inhibent la synthèse protéique. Il est alors possible d'inactiver spécifiquement les ribosomes de type sauvages par l'addition de ces antibiotiques. Mise à part la résistance aux antibiotiques, ces mutations ne semblent pas affecter le fonctionnement du ribosome, mais il a été observé qu'elles ont parfois des effets imprévisibles lorsqu'elles sont combinées avec d'autres mutations (Dragon et al., 1996; Rodriguez-Correa & Dahlberg, 2004). Une autre approche a été développée par le groupe de Squires, qui a sélectionné une souche d'*E. coli* appelée $\Delta 7$ prrn, où les sept opérons codant pour les ARNr sont inactivés (Asai et al., 1999). Dans cette souche, les ARNr sont produits à partir d'un plasmide introduit dans la cellule, ce qui permet d'étudier l'effet de mutations de l'ARNr avec une population homogène de ribosomes mutants. Le principal défaut de ces différentes approches est que la production des protéines cellulaires dépend, soit totalement, soit en grande partie, de l'activité des ribosomes mutants, ce qui ne permet pas d'étudier les mutations qui inhibent trop fortement l'activité du ribosome.

Les systèmes de ribosomes spécialisés utilisent un plasmide qui code pour les ARNr et il y a donc une population hétérogène de ribosomes mutants et sauvages. Cependant, la séquence anti-Shine-Dalgarno de l'ARNr 16S plasmidique est mutée de sorte que les

ribosomes contenant cet ARNr 16S plasmidique ne peuvent pas traduire les ARNm bactériens. Le plasmide code aussi pour des gènes rapporteurs dont la séquence Shine-Dalgarno est complémentaire à la séquence anti-Shine-Dalgarno mutante de l'ARNr 16S plasmidique. Il est ainsi possible d'étudier l'effet de mutations de l'ARNr 16S *in vivo* sans affecter la croissance cellulaire. Ce type de système avait été développé initialement par le groupe de de Boer (Hui & de Boer, 1987; Brink et al., 1995). Cependant, la séquence anti-Shine-Dalgarno mutante des ARNr 16S utilisée par le groupe de de Boer avait un effet toxique sur les cellules hôtes, probablement en favorisant l'initiation de la traduction sur des ARNm ayant normalement un faible niveau de traduction (Lee et al., 1996). Le système de ribosomes spécialisés que nous avons utilisé dans nos études a été développé par le groupe de Phil Cunningham. La séquence anti-Shine-Dalgarno mutante a été optimisée pour sa spécificité et pour son absence d'effet toxique sur les cellules hôtes. Le gène rapporteur CAT (chloramphénicol acétyltransférase) codé par le plasmide permet de sélectionner des mutants de l'ARNr 16S d'après leur croissance sur chloramphénicol (Lee et al., 1997; Morosyuk et al., 2000; 2001b). Le système de ribosomes spécialisés est donc un outil puissant pour l'étude de mutations dans l'ARNr 16S. Le seul désavantage de ce système est qu'il ne permet d'étudier que des mutations dans l'ARNr 16S et non dans les autres ARNr.

Certaines fonctions du ribosome sont difficiles à étudier *in vivo* et il est souvent utile de faire des expériences *in vitro*, qui permettent de décortiquer les différentes étapes de la synthèse protéique. Des méthodes de reconstitution *in vitro* de sous-unités ribosomiques ont été utilisées pour obtenir des populations homogènes de ribosomes mutants (Krzyzosiak et al., 1987; Melançon et al., 1987; Green & Noller, 1999; Khaitovich et al., 1999). Avec ces méthodes, les sous-unités sont formées à partir d'ARNr mutants transcrits *in vitro* et des protéines ribosomiques isolées. Ce processus a le désavantage d'être long et laborieux. De plus, les ARNr transcrits *in vitro* ne contiennent pas les modifications naturelles et les ribosomes ainsi reconstitués ne sont pas aussi actifs que des

ribosomes naturels. Plus récemment, des méthodes d'étiquetage ont été développées, afin d'isoler les sous-unités mutantes à partir d'une population hétérogène de ribosomes provenant d'un lysat bactérien (Leonov et al., 2003; Hesslein et al., 2004; Youngman et al., 2004). Les ribosomes sont produits *in vivo*, en utilisant un plasmide codant pour les ARNr. L'ARNr mutant contient une insertion correspondant à un site de liaison à une protéine comme la streptavidine, la protéine U1A du complexe d'épissage ou la protéine MS2 de l'enveloppe du phage. Cette étiquette est localisée à un endroit exposé au solvant et où elle ne perturbe pas le repliement et la fonction de l'ARNr. Avec cette étiquette, il est possible de purifier les sous-unités ribosomiques mutantes par chromatographie d'affinité. Un avantage du système de ribosomes spécialisés que nous avons utilisé est que la séquence anti-Shine-Dalgarno mutante de l'ARNr 16S peut être utilisée pour purifier les sous-unités 30S mutantes par chromatographie d'affinité.

5.2. Une interaction fonctionnelle entre la tétraboucle 900 et l'hélice 24 de l'ARNr 16S.

Les structures cristallographiques de la sous-unité 30S révèlent une interaction entre la tétraboucle 900 et la région 768-770/809-811 de l'hélice 24 de l'ARNr 16S. Les articles présentés dans les chapitres II et III de cette thèse démontrent l'importance fonctionnelle de cette interaction. Le système de ribosomes spécialisés que nous avons utilisé nous a permis d'étudier la tétraboucle 900 et la région 768-770/809-811 par la méthode dite d'évolution instantanée. Nous avons créé des bibliothèques de séquences aléatoires et nous avons utilisé le gène rapporteur CAT pour sélectionner des mutants fonctionnels à partir de ces bibliothèques. Dans un premier temps, nous avons sélectionné les mutants fonctionnels de la tétraboucle 900. Seulement 15 des 256 mutants possibles étaient suffisamment actifs pour être sélectionnés, même avec la faible concentration de chloramphénicol que nous avons utilisée pour la sélection. Ces mutants ont des activités relativement faibles, variant entre 8 et 56%

par rapport au type sauvage. Le fait qu'aucun des mutants ne soit aussi actif que le type sauvage montre l'importance de la séquence GCAA de cette tétraboucle. Il est intéressant de noter qu'une tétraboucle GCGA du site d'initiation interne (IRES) du virus de l'encéphalomyocardite a été étudiée grâce à une technique analogue à celle que nous avons utilisée (Robertson et al., 1999). Dans cette étude, un gène rapporteur codant pour une protéine ciblée à la membrane était placé sous le contrôle de l'IRES. La tétraboucle GCGA de l'IRES était remplacée par une séquence aléatoire et les cellules où l'IRES mutant permettait la synthèse de la protéine rapportrice ciblée à la membrane ont été sélectionnées en utilisant un anticorps se liant spécifiquement à cette protéine. Il a été observé que la séquence de cette tétraboucle est très importante pour l'activité de cet IRES. En ce qui concerne la tétraboucle 900, les structures cristallographiques de la sous-unité 30S avaient montré qu'elle interagit avec le sillon mineur de la région 768-770/809-811, dans l'hélice 24. Par évolution instantanée, nous avons sélectionné des mutations dans cette région qui compensent l'effet délétère d'une mutation de la tétraboucle 900, la mutation A900G. Les deux mutations que nous avons obtenues sont G769C/C810A et G769U/C810A, localisées dans la paire de bases 769/810. Nous avons observé que les mutations dans la tétraboucle 900 ou dans la paire de bases 769/810 diminuent l'activité ribosomique, perturbent l'association des sous-unités et diminuent la fidélité de traduction. Plus l'activité des ribosomes mutants est faible, plus l'effet sur l'association et sur la fidélité est prononcé. Lorsque les mutations sont présentes simultanément dans la tétraboucle 900 et dans la paire 769/810, ces défauts sont partiellement corrigés. Par modélisation moléculaire, nous avons observé que les mutations qui ont l'effet le plus drastique sur l'activité des ribosomes sont celles qui perturbent le plus l'interaction entre la tétraboucle 900 et son récepteur dans la région 768-770/809-811. La mutation A900G cause un encombrement stérique important entre la tétraboucle 900 et son récepteur et les mutations compensatoires dans l'hélice 24 restaurent l'activité des ribosomes en éliminant cet encombrement stérique.

La formation du pont B2c nécessite l'interaction préalable entre la tétraboucle 900 et son récepteur. Les squelettes de ribose-phosphate de la tétraboucle 900 et de son récepteur interagissent alors avec l'hélice 67 du domaine IV de l'ARNr 23S. Les mutations qui déstabilisent l'interaction tétraboucle/récepteur vont par le fait même déstabiliser la formation du pont B2c. Il est important de rappeler que le pont B2c est l'un des ponts les plus conservés entre les sous-unités ribosomiques (Mears et al., 2002) et qu'il est l'un des premiers à se former lors de l'association des sous-unités (Hennelly et al., 2005). Nos résultats soulignent l'importance du pont B2c dans la hiérarchie de formation des ponts, puisque des mutations qui perturbent la formation de ce pont inhibent presque complètement l'association des sous-unités. En ce qui concerne l'effet des mutations de la tétraboucle 900 et de l'hélice 24 sur la fidélité de traduction, nous avons d'abord envisagé l'hypothèse selon laquelle le pont B2c serait impliqué dans la communication entre les sous-unités lors de la sélection des aa-ARNt. En effet, tel que décrit dans l'introduction de cette thèse (section 1.4.2.1), quand le centre de décodage de la sous-unité 30S a reconnu un aa-ARNt correct, la sous-unité 30S passe d'une conformation ouverte à une conformation fermée, ce qui entraîne l'activation de la GTPase de EF-Tu via le centre associé à la GTPase (GAC) de la sous-unité 50S. Ceci permet l'hydrolyse du GTP, le départ de EF-Tu et finalement l'accommodation de l'aa-ARNt au site A. Cependant, quand le pont B2c est fragilisé, cela devrait perturber la communication entre les sous-unités et ralentir l'activation de la GTPase. Le centre de décodage aurait ainsi plus de temps pour analyser la géométrie des interactions codon-anticodon avant que l'aa-ARNt puisse être accommodé au site A et cela devrait augmenter la précision de la traduction, et non la réduire comme nous l'avons observé expérimentalement. Une autre explication serait que la tétraboucle 900 alterne entre une forme liée à son récepteur et une forme libre, où le pont B2c serait temporairement défait. La rupture du pont B2c pourrait être le signal qui mène à l'activation de la GTPase et cela expliquerait pourquoi les mutations qui fragilisent le pont B2c rendent le ribosome moins précis. Cette hypothèse est cependant peu probable. En effet, le pont B2c est localisé au centre de la sous-unité 30S et toutes les données

structurales actuelles suggèrent que ce pont est stable et qu'il contribue à maintenir les sous-unités solidement associées (Gao et al., 2003; Valle et al., 2003b). Les expériences récentes de cryo-EM ont montré que la communication entre le centre de décodage et la GTPase de EF-Tu est effectuée par l'ARNt lui-même (Stark et al., 2002; Valle et al., 2002; 2003a; revue par Frank et al., 2005). Un rôle des ponts dans cette communication ne peut être totalement exclu, mais il n'y a pas de données concernant ce rôle pour le moment. Quoiqu'il en soit, l'interaction entre la tétraboucle 900 et l'hélice 24 est une interaction cruciale entre le corps et la plate-forme de la sous-unité 30S, et les mutations présentées dans nos études ont sûrement des effets importants sur les changements de conformation que subit cette sous-unité. L'explication que nous proposons est que ces mutations favorisent la transition de la sous-unité 30S de la forme ouverte à la forme fermée lors de la sélection des aa-ARNt. Le passage à la forme fermée implique une interaction plus forte entre l'hélice 44, la protéine S12 et la base de l'hélice 27. Si l'interaction de la tétraboucle 900 avec son récepteur est diminuée, nous pouvons suggérer que l'hélice 27 aurait une liberté de mouvement accrue, ce qui pourrait favoriser ses interactions avec l'hélice 44 et la protéine S12. Nous pensons donc que la tétraboucle 900 participe à des interactions qui forment le cœur de la sous-unité 30S et qui sont cruciales pour les changements conformationnels de cette sous-unité. Finalement, nos résultats ont montré que le défaut d'association des sous-unités n'est pas suffisant pour expliquer l'effet des mutations sur l'activité ribosomique. Par exemple, le mutant A900G a moins de 10% d'activité par rapport au type sauvage, mais la proportion de sous-unité 30S mutantes dans les ribosomes 70S et dans les polysomes devrait résulter en un taux de synthèse protéique d'environ 26% par rapport au type sauvage (voir Tableau 3-1). Cet effet peut être en partie expliqué par le taux d'erreur supérieur des mutants, mais il est très probable que d'autres étapes de la synthèse protéique sont également affectées, notamment la translocation.

5.3. Une interaction fonctionnelle indirecte entre la tétraboucle 900 et l'hélice 1 de l'ARNr 16S.

Le ribosome est dynamique et il est possible que la tétraboucle 900 interagisse avec plus d'un récepteur au cours de la synthèse protéique. Dans la troisième partie de mon projet de recherche, le but initial était de trouver un ou des récepteurs alternatifs de la tétraboucle 900. Nous avons utilisé le mutant A900G, qui a une faible activité, et nous avons appliqué une mutagenèse aléatoire à toute la séquence de l'ARNr 16S. Nous avons ensuite sélectionné des mutations qui complètent la mutation A900G, en utilisant le gène rapporteur CAT. Les résultats obtenus étaient inattendus, car nous avons identifié une relation fonctionnelle entre la tétraboucle 900 et l'hélice 1. Dans la structure de la sous-unité 30S, ces deux régions sont séparées par plus de 40 Å. Il est très peu probable que ces deux régions interagissent ensemble, car une telle interaction nécessiterait des changements de conformation trop drastiques. L'hélice 1 n'est donc probablement pas un récepteur alternatif de la tétraboucle 900 et la relation entre ces deux régions est fort probablement indirecte. Les mutations compensatoires à la paire de bases 769/810 de l'hélice 24 n'ont pas été sélectionnées. Cela s'explique par le fait qu'il s'agit de mutations doubles et que la probabilité de les obtenir avec une mutagenèse aléatoire de l'ARNr 16S complet est très faible. Il est donc possible qu'il existe des récepteurs alternatifs de la tétraboucle 900 que nous n'ayons pas détectés pour la même raison. Les mutations de l'hélice 1 que nous avons étudiées (U12C, Δ U12 et U13A) corrigent les défauts d'association et de fidélité de traduction causés par la mutation A900G. Notre hypothèse initiale était que les mutations dans l'hélice 1 corrigent les défauts du mutant A900G en causant un phénotype opposé. Cependant, ces mutations de l'hélice 1 n'ont pas d'effet détectable sur l'association des sous-unités et sur la fidélité de traduction lorsqu'elles sont présentes dans le contexte d'une tétraboucle 900 de type sauvage. Cette observation est en contradiction avec une étude précédente de notre équipe qui avait montré que la mutation U13A rend les ribosomes plus

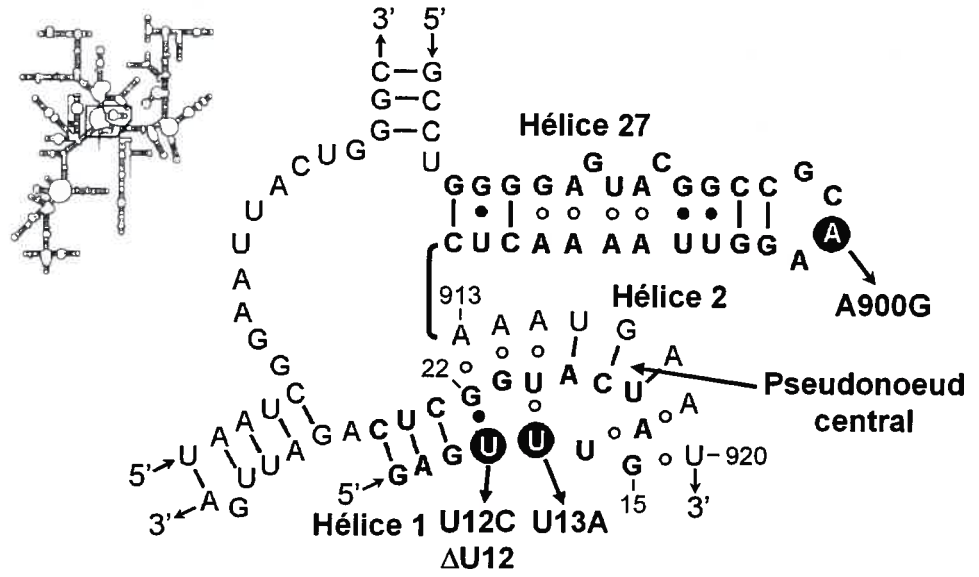
précis dans des essais *in vitro* (Pinard et al., 1994). Les études de Pinard et al avaient été faites en présence de la mutation C1192U dans l'ARNr 16S. Nous avons comparé l'effet de la mutation U13A avec nos essais de fidélité *in vivo*, en présence et en absence de la mutation C1192U. Nous n'avons pas observé de différence en présence de la mutation C1192U (résultats non publiés), et le phénotype d'hyper-précision observé par Pinard et al n'étaient donc pas causé par la présence de cette mutation. Nous pensons plutôt que la divergence entre nos résultats et ceux de Pinard et al s'explique par la différence entre les cinétiques de traduction *in vitro* et *in vivo*. La traduction *in vitro* est plus lente et, dans ces conditions, il est parfois possible d'observer des effets subtils qui ne sont pas détectables *in vivo*.

Comme indiqué plus haut, nos travaux de modélisation moléculaire avaient montré que la mutation A900G cause un encombrement stérique qui perturbe la liaison de la tétraboucle 900 avec son récepteur, ce qui nuit à la formation du pont B2c. Les mutations complémentaires de l'hélice 1 corrigent le défaut d'association causé par la mutation A900G et nous en concluons que ces mutations rétablissent l'interaction entre la tétraboucle 900 et son récepteur. L'encombrement stérique entre la tétraboucle 900 mutante et son récepteur pourrait être évité par un léger changement d'orientation de la tétraboucle. Les hélices 1 et 27 sont connectées par le pseudonoeud central de l'ARNr 16S (voir Figure 5-1A). Il a été montré précédemment que la mutation U13A augmente légèrement la liaison d'une sonde d'ADN complémentaire à la région 915-921 de l'ARNr 16S et augmente aussi la réactivité de G917 au kéthoxal (Pinard et al., 1995). Ces résultats indiquent que la mutation U13A déstabilise le pseudonoeud central et il est probable que les mutations U12C et Δ U12 ont un effet semblable. En déstabilisant ainsi le pseudonoeud central, les mutations de l'hélice 1 pourraient influencer la jonction entre l'hélice 27 et le pseudonoeud central, et ainsi augmenter la liberté de mouvement de l'hélice 27. Cette liberté de mouvement accrue permettrait de positionner la tétraboucle 900 mutante dans une orientation plus favorable pour qu'il y ait interaction avec son récepteur et éviter

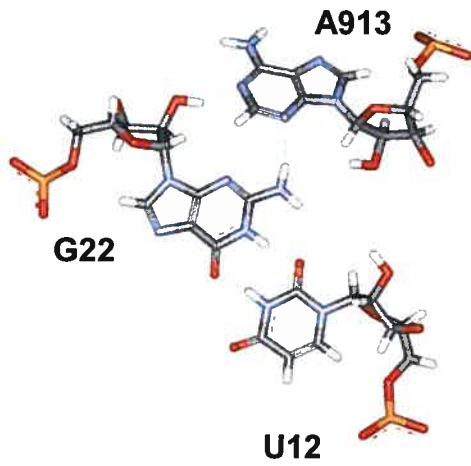
Figure 5-1 : Structure des bases triples du pseudonoeud central impliquant les nucléotides U12 et U13 de l'hélice 1 de l'ARNr 16S.

- A. Portion centrale de la structure secondaire de l'ARNr 16S, montrant l'hélice 27 et les hélices 1 et 2 qui forment le pseudonoeud central. Les mutations de l'hélice 1 et de la tétraboucle 900 que nous avons étudiées sont indiquées.
- B. Structure de la base triple entre les nucléotides U12, G22 et A913.
- C. Structure de la base triple entre les nucléotides U13, U20 et A915.

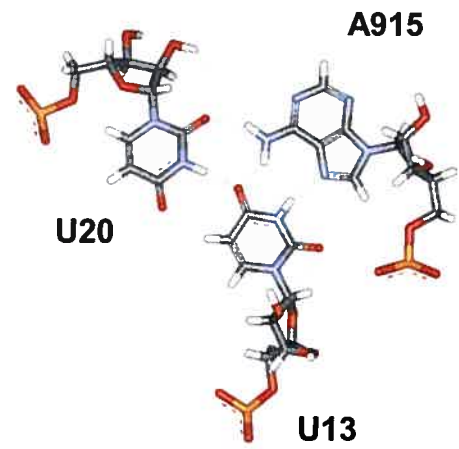
A



B



C



l'encombrement stérique. Une fois l'interaction entre la tétraboucle 900 et son récepteur restaurée, les effets néfastes de la mutation A900G sur le pont B2c et sur les changements conformationnels de la sous-unité 30S seraient également corrigés.

En analysant la structure à haute résolution de la sous-unité 30S, il est possible d'expliquer comment les mutations de l'hélice 1 affectent la stabilité du pseudonoeud central. La Figure 5-1A présente la structure secondaire du pseudonoeud central, telle qu'elle est observée dans la structure de la sous-unité 30S de *T. thermophilus* (Schluenzen et al., 2000; Wimberly et al., 2000). Certains appariements non-Watson-Crick de cette structure diffèrent des appariements prédits par analyse phylogénétique (voir la Figure 1-2A). Les nucléotides qui forment le pseudonoeud central sont extrêmement conservés (souvent à plus de 99%), et l'analyse phylogénétique ne permet donc pas de prédire avec certitude tous les appariements dans cette région. Dans la structure cristalline, les positions U12 et U13 sont impliquées dans des bases triples situées immédiatement à la jonction entre l'hélice 27 et le pseudonoeud central (Figure 5-1A). Les nucléotides U12 et G22 forment une paire U•G et G22 interagit avec A913 (Figure 5-1B). La mutation U12C remplace la paire U•G par une paire C-G. Cette substitution permet de conserver la base triple, tout en introduisant un léger changement conformationnel, puisque les paires U•G et C-G n'ont pas une géométrie identique. Cette paire de bases U•G est très conservée, mais il est intéressant de noter que, chez les eucaryotes, elle est remplacée par une paire G-C dans 94% des cas (Comparative RNA Web Site: <http://www.rna.icmb.utexas.edu>). Cette inversion purine/pyrimidine doit modifier la géométrie de la base triple et il serait intéressant de voir quel est l'effet de cette mutation chez *E. coli*. Quant au nucléotide U13, il forme une base triple avec U20 et A915. La mutation U13A cause un encombrement stérique qui doit affecter de façon importante la base triple entre U13, U20 et A915. L'effet de la mutation U13A sur la structure de cette base triple pourrait cependant être diminué en plaçant A13 dans une conformation *syn*, ce qui éliminerait l'encombrement stérique. L'effet sur la structure du pseudonoeud est quand même plus importante avec la mutation

U13A qu'avec la mutation U12C, ce qui explique pourquoi le mutant U13A est moins actif que le mutant U12C (70% contre 90% par rapport au type sauvage). En ce qui concerne la mutation de délétion, son effet sur la structure du pseudonoeud est plus difficile à prédire. Bien que nous nommions cette mutation $\Delta U12$, il est impossible de préciser lequel des trois U aux positions 12-14 est délété. Notre hypothèse est que cette délétion rend la boucle coiffant l'hélice 1 plus rigide, ce qui pourrait déstabiliser la formation du pseudonoeud central. Les résultats de mon travail de thèse soulignent la complémentarité des études structurales et fonctionnelles. Sans les structures détaillées du ribosome, il aurait été impossible d'expliquer l'effet de ces mutations. Réciproquement, sans données fonctionnelles les structures ne seraient que des casse-tête indéchiffrables.

5.4. Perspectives à court terme

Nos études ont montré que des mutations complémentaires dans la tétraboucle 900 de l'ARNr 16S, ou dans son récepteur, restaurent l'interaction entre ces régions, et nous avons proposé que les mutations dans l'hélice 1 font de même. Nous avons utilisé la modélisation moléculaire pour interpréter nos résultats, mais il serait intéressant de vérifier directement l'effet de ces mutations sur la structure du ribosome. Il serait possible d'examiner l'interaction entre la tétraboucle 900 et son récepteur dans des sous-unités 30S mutantes avec des expériences d'attaque par des agents chimiques. Des mutations qui perturbent l'interaction entre la tétraboucle 900 et son récepteur devraient évidemment rendre ces régions plus sensibles à des attaques. Si les mutations compensatoires restaurent l'interaction tétraboucle/récepteur, elles devraient plutôt réduire la sensibilité de ces régions aux attaques. Ces expériences d'attaques aux agents chimiques permettraient aussi de vérifier directement si les mutations U12C et $\Delta U12$ augmentent la flexibilité du pseudonoeud central, comme le fait la mutation U13A.

Rappelons que l'interaction entre la tétraboucle 900 et son récepteur dans l'hélice 24 est un prérequis à la formation du pont B2c. Ce pont est l'un des premiers ponts à se former lors de l'association des sous-unités et nous avons démontré que les mutations dans la tétraboucle 900 affectent fortement l'association entre les sous-unités, ce qui nous a conduit à proposer qu'elles perturbent la formation du pont B2c. Il serait intéressant de caractériser plus en détail l'effet des mutations de la tétraboucle 900 et de son récepteur sur la formation des ponts entre les sous-unités. Il est possible que les ponts se forment moins rapidement chez les mutants que chez le type sauvage et il se peut aussi que ces ponts soient moins stables une fois formés. Une méthode sophistiquée a été utilisée récemment pour étudier la formation des ponts entre les sous-unités en temps réel (Hennelly et al., 2005). Cette technique sonde la formation des ponts par l'attaque de l'ARNr au DMS sur des périodes de temps très courtes, en utilisant un appareil de *quench flow*. Cette méthode pourrait être employée pour étudier directement l'effet des mutations de la tétraboucle 900 ou de l'hélice 24 sur la formation des ponts entre les sous-unités. En parallèle, il serait aussi intéressant de faire des expériences de dissociation des ribosomes mutants, ce qui permettrait d'étudier la stabilité des ponts en présence de mutations dans la tétraboucle 900. Les ribosomes se dissocient à faible concentration en ions magnésium. En utilisant des ribosomes 70S mutants, et en diminuant la concentration d'ions magnésium, il serait possible de déterminer si les mutations de la tétraboucle 900 ou de son récepteur favorisent la dissociation des ribosomes. Il faut ajouter ici que, lors de l'initiation de la traduction, l'association entre les sous-unités est précédée par la formation d'un complexe entre la sous-unité 30S, un fMet-ARNt^{fMet} initiateur et l'ARNm. Des expériences non publiées, dites de *toeprint*, nous ont permis d'observer que les mutations de la tétraboucle 900 n'affectent pas la formation de ce complexe. Des sous-unités 30S mutantes ont été incubées avec l'ARNt^{fMet} initiateur et un fragment d'ARNm, et la formation du complexe sur l'ARNm a été mesurée par une technique d'extension d'amorce. Il serait cependant utile de refaire ces expériences dans des conditions plus physiologiques, en présence des facteurs d'initiation.

Il sera également utile de continuer la caractérisation de l'effet des mutations sur la fidélité de traduction. Les essais de fidélité que nous avons faits ont fourni des informations intéressantes et nous avons proposé que les mutations dans la tétraboucle 900 favorisent la transition à la forme fermée de la sous-unité 30S lors de la sélection des aa-ARNt. Il serait intéressant de faire des études cinétiques complètes de la sélection des aa-ARNt avec des mutants de la tétraboucle 900. Comme expliqué dans l'Introduction (section 1.4.2.1), le groupe de Rodnina et Wintermeyer a mis au point des méthodes *in vitro* pour étudier en détail la cinétique de chacune des étapes de la sélection des aa-ARNt. Ces méthodes ont déjà permis de mieux comprendre le mode d'action d'antibiotiques comme la paromomycine et la streptomycine, et pourraient également être appliquées à l'étude des mutants de la tétraboucle 900 ou de l'hélice 24. Ces études permettraient de déterminer exactement quelles étapes de la sélection sont perturbées par ces mutations. Par exemple, si les mutations favorisent le passage de la sous-unité 30S à la forme fermée, elles devraient augmenter la vitesse d'activation de la GTPase en présence d'un ARNt presque correct. La cristallographie aux rayons X ou la cryo-EM de ribosomes mutants pourrait être employées pour déterminer directement si les mutations favorisent la forme fermée de la sous-unité 30S. Tel que décrit à la section 1.5, la cristallographie a déjà été utilisée pour étudier l'effet d'une mutation de la protéine S12 (Vila-Sanjurjo et al., 2003) et la cryo-EM avait quant à elle permis d'observer que des mutations à la base de l'hélice 27 entraînent des changements conformationnels dans le ribosome (Gabashvili et al., 1999b).

Comme nous l'avons dit plus haut, il est probable que les mutations de la tétraboucle 900 ou de son récepteur affectent la translocation. Il est difficile d'étudier l'étape de la translocation *in vivo*, mais cela peut être réalisé par différentes méthodes *in vitro*. L'efficacité et la fidélité de la translocation peuvent être étudiées par des techniques dites de *toeprint*, qui utilisent une extension d'amorce pour mesurer le déplacement du ribosome sur l'ARNm (Joseph & Noller, 1998). La cinétique des étapes de la translocation peut être étudiée par des méthodes semblables à celles utilisées pour la sélection des aa-

ARNt. La cinétique de la réaction d'hydrolyse du GTP par EF-G peut être déterminée par *quench-flow*. La cinétique du déplacement des ARNt dans le ribosome peut être étudiée par des expériences utilisant des ARNt portant un fluorophore (Rodnina et al., 1997; Savelsbergh et al., 2003) ou un fragment d'ARNm portant un fluorophore à son extrémité 3' (Studer et al., 2003). La fluorescence émise par ces fluorophores varie en fonction de la position des ARNt ou de l'ARNm marqués sur le ribosome, ce qui permet de mesurer la cinétique rapide de la translocation. Ces méthodes permettraient de déterminer si les mutations utilisées dans nos études affectent l'efficacité ou la fidélité de la translocation.

Nous avons également noté un effet particulier des mutations $\Delta U12$ et $U13A$ sur la suppression du codon de terminaison UGA. Puisque le maintien du cadre de lecture et la sélection des aa-ARNt ne sont pas affectés par ces mutations de l'hélice 1, nous avons proposé qu'elles affectent spécifiquement l'étape de terminaison. Des expériences de cryo-EM ont montré que le facteur de terminaison RF2 lié au ribosome interagit avec le site A de la sous-unité 30S, à proximité de l'hélice 1 (Klaholz et al., 2003; Rawat et al., 2003). Il est possible que certaines mutations de l'hélice 1 perturbent la liaison ou l'activité du facteur RF2. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait étudier l'effet de ces mutations sur la terminaison avec les trois différents codons de terminaison (UGA, UAG et UAA). Cela permettrait de déterminer s'il y a un effet spécifique au facteur RF2 ou si la terminaison est affectée pour les facteurs RF1 et RF2. Des essais de liaison des facteurs de terminaison au ribosome et des essais fonctionnels permettraient de mieux caractériser l'effet de mutations de l'hélice 1 sur la terminaison.

Pour obtenir plus d'information sur les interactions entre différentes régions du ribosome, il serait intéressant d'examiner si les mutations de l'hélice 1 peuvent compenser l'effet d'autres mutations localisées dans la tétraboucle 900, dans son récepteur ou même dans d'autres régions de l'ARNr 16S. En fait, les expériences de complémentations génétiques que nous avons effectuées pourraient être appliquées à n'importe quelles régions

fonctionnelles de l'ARNr 16S. L'hélice 1 interagit avec de nombreux éléments de la sous-unité 30S, comme la tige-boucle 530 de l'ARNr 16S et les protéines ribosomiques S5 et S12. Une expérience intéressante serait d'employer la méthode d'évolution instantanée pour sélectionner des mutants fonctionnels de l'hélice 1. Ceci permettrait de déterminer quels éléments de cette hélice sont importants pour la fonction du ribosome. Il serait ensuite possible de sélectionner des mutations aléatoires dans l'ARNr 16S qui peuvent compenser l'effet de mutations dans l'hélice 1. Une telle approche permettrait d'identifier d'autres interactions fonctionnelles impliquant l'hélice 1. La mutagenèse de l'ARNr 23S n'a pas été abordée dans mon projet de recherche, car le système de ribosomes spécialisés ne permet pas d'étudier de telles mutations. Il serait néanmoins intéressant d'étudier l'effet de mutations dans l'hélice 67 de l'ARNr 23S, puisque cette hélice interagit avec la tétraboucle 900 dans le pont B2c. Pour effectuer une telle étude, il serait possible d'utiliser la souche $\Delta 7$ prn développée par le groupe de Squires. Comme expliqué plus haut, dans cette souche, tous les opérons codant pour les ARNr sont inactivés et la production des ARNr dépend entièrement d'un plasmide introduit dans les bactéries. Le mutant A900G a une très faible activité et serait probablement létal dans cette souche. Il serait alors aisé de sélectionner des mutations compensatoires qui restaurent la viabilité des bactéries.

5.5. Perspectives à long terme

Les structures à haute résolution du ribosome qui ont été obtenues récemment ont permis de mieux comprendre les diverses données expérimentales accumulées au fil des ans, mais elles ont aussi souligné l'incroyable complexité du ribosome. Les études de mutagenèse comme celles que nous avons présentées dans cette thèse, alliées à des études fonctionnelles et structurales, permettront de faire progresser notre compréhension du processus fascinant qu'est la synthèse protéique. À plus long terme, ces études ont d'importantes implications pour deux problèmes médicaux de taille : les infections

bactériennes et les cancers. L'introduction de cette thèse a présenté quelques antibiotiques ciblant le ribosome, comme la tétracycline et la streptomycine, en discutant surtout de leur utilité comme outil pour l'étude du ribosome. Encore plus importante est l'utilisation clinique de ces antibiotiques. En effet, la majorité des antibiotiques utilisés en clinique agissent sur le ribosome. Malheureusement, plusieurs souches de bactéries pathogènes ont maintenant développé des mécanismes de résistance à ces antibiotiques. Les résistances aux antibiotiques sont combattues en créant de nouveaux antibiotiques, principalement par modification chimique des antibiotiques déjà existants, mais cela ne fait que retarder le problème. Nous en sommes à un point où de nouvelles classes d'antibiotiques doivent impérativement être développées. Les structures à haute résolution du ribosome ont permis de mieux comprendre le mécanisme d'action des antibiotiques existants et elles pourront nous guider dans le développement rationnel de nouveaux médicaments ciblant le ribosome. La technique d'évolution instantanée utilisée dans nos études a déjà été mise à profit par le groupe de Phil Cunningham pour le développement de nouveaux antibiotiques (Laios et al., 2004). Leur stratégie consiste à sélectionner une population de peptides aléatoires qui inhibent la synthèse protéique en se liant aussi bien à une région de l'ARNr 16S de type sauvage qu'à des mutants fonctionnels de cette région. De cette façon, on s'assure que les pathogènes ne pourront pas développer des mutations de résistance qui empêcheraient la liaison de ces antibiotiques. Le ribosome peut aussi constituer une cible intéressante pour des agents anti-tumoraux. Les cellules cancéreuses ont une synthèse protéique accrue par rapport à des cellules normales, ce qui les rend plus sensibles à des inhibiteurs de la synthèse protéique. Par exemple, il a été montré que certains inhibiteurs de la synthèse protéique comme la sparsomycine, qui inactivent les ribosomes eucaryotes, peuvent inhiber la prolifération des cellules cancéreuses à des concentrations où la croissance des cellules saines est peu affectée (Ottenheijm et al., 1986; Ottenheijm & van den Broek, 1988; Zylitz et al., 1989). Avant de pouvoir inactiver efficacement le ribosome, il faudra d'abord apprendre à bien le connaître. Les informations apportées par des études de mutagenèse comme celles présentées dans cette thèse, nous permettront de mieux cibler

les sites stratégiques du ribosome. Les études sur le ribosome utilisent généralement le ribosome bactérien comme modèle, mais le haut degré de conservation entre les ribosomes procaryotes et eucaryotes permet d'extrapoler une grande partie des informations obtenues avec le ribosome bactérien. Une connaissance approfondie du fonctionnement du ribosome permettra de moderniser notre arsenal de médicaments et de lutter plus efficacement contre les infections bactériennes et les cancers.

Bibliographie

- Abramovitz D. L. et Pyle A. M. 1997. Remarkable morphological variability of a common RNA folding motif: the GNRA tetraloop-receptor interaction. *J. Mol. Biol.* **266**:493-506.
- Adams P. L., Stahley M. R., Gill M. L., Kosek A. B., Wang J. et Strobel S. A. 2004. Crystal structure of a group I intron splicing intermediate. *RNA* **10**:1867-1887.
- Agalarov S. C., Sridhar Prasad G., Funke P. M., Stout C. D. et Williamson J. R. 2000. Structure of the S15,S6,S18-rRNA complex: assembly of the 30S ribosome central domain. *Science* **288**:107-113.
- Agrawal R. K., Penczek P., Grassucci R. A., Li Y., Leith A., Nierhaus K. H. et Frank J. 1996. Direct visualization of A-, P-, and E-site transfer RNAs in the Escherichia coli ribosome. *Science* **271**:1000-1002.
- Al-Karadaghi S., Aevansson A., Garber M., Zheltonosova J. et Liljas A. 1996. The structure of elongation factor G in complex with GDP: conformational flexibility and nucleotide exchange. *Structure* **4**:555-565.
- Allain F. H. et Varani G. 1995. Structure of the P1 helix from group I self-splicing introns. *J Mol Biol* **250**:333-353.
- Arevalo M. A., Tejedor F., Polo F. et Ballesta J. P. 1988. Protein components of the erythromycin binding site in bacterial ribosomes. *J. Biol. Chem.* **263**:58-63.
- Asai T., Zaporozhets D., Squires C. et Squires C. L. 1999. An Escherichia coli strain with all chromosomal rRNA operons inactivated: complete exchange of rRNA genes between bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:1971-1976.
- Ban N., Freeborn B., Nissen P., Penczek P., Grassucci R. A., Sweet R., Frank J., Moore P. B. et Steitz T. A. 1998. A 9 Å resolution X-ray crystallographic map of the large ribosomal subunit. *Cell* **93**:1105-1115.
- Ban N., Nissen P., Hansen J., Capel M., Moore P. B. et Steitz T. A. 1999. Placement of protein and RNA structures into a 5 Å-resolution map of the 50S ribosomal subunit. *Nature* **400**:841-847.

- Ban N., Nissen P., Hansen J., Moore P. B. et Steitz T. A. 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. *Science* **289**:905-920.
- Baram D. et Yonath A. 2005. From peptide-bond formation to cotranslational folding: dynamic, regulatory and evolutionary aspects. *FEBS Lett* **579**:948-954.
- Bashan A., Agmon I., Zarivach R., Schlutzen F., Harms J., Berisio R., Bartels H., Franceschi F., Auerbach T., Hansen H. A., Kossoy E., Kessler M. et Yonath A. 2003. Structural basis of the ribosomal machinery for peptide bond formation, translocation, and nascent chain progression. *Mol. Cell* **11**:91-102.
- Basu S., Rambo R. P., Strauss-Soukup J., Cate J. H., Ferre-D'Amare A. R., Strobel S. A. et Doudna J. A. 1998. A specific monovalent metal ion integral to the AA platform of the RNA tetraloop receptor. *Nat. Struct. Biol.* **5**:986-992.
- Battiste J. L., Mao H., Rao N. S., Tan R., Muhandiram D. R., Kay L. E., Frankel A. D. et Williamson J. R. 1996. Alpha helix-RNA major groove recognition in an HIV-1 rev peptide-RRE RNA complex. *Science* **273**:1547-1551.
- Battle D. J. et Doudna J. A. 2002. Specificity of RNA-RNA helix recognition. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**:11676-11681.
- Bayfield M. A., Dahlberg A. E., Schulmeister U., Dorner S. et Barta A. 2001. A conformational change in the ribosomal peptidyl transferase center upon active/inactive transition. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**:10096-10101.
- Bayfield M. A., Thompson J. et Dahlberg A. E. 2004. The A2453-C2499 wobble base pair in Escherichia coli 23S ribosomal RNA is responsible for pH sensitivity of the peptidyltransferase active site conformation. *Nucleic Acids Res.* **32**:5512-5518.
- Bélangier F., Gagnon M. G., Steinberg S. V., Cunningham P. R. et Brakier-Gingras L. 2004. Study of the functional interaction of the 900 Tetraloop of 16S ribosomal RNA with helix 24 within the bacterial ribosome. *J. Mol. Biol.* **338**:683-693.
- Bélangier F., Léger M., Saraiya A. A., Cunningham P. R. et Brakier-Gingras L. 2002. Functional studies of the 900 tetraloop capping helix 27 of 16S ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* **320**:979-989.
- Belitsina N. V., Tnalina G. Z. et Spirin A. S. 1981. Template-free ribosomal synthesis of polylysine from lysyl-tRNA. *FEBS Lett* **131**:289-292.

- Beringer M., Adio S., Wintermeyer W. et Rodnina M. 2003. The G2447A mutation does not affect ionization of a ribosomal group taking part in peptide bond formation. *RNA* **9**:919-922.
- Bilgin N., Richter A. A., Ehrenberg M., Dahlberg A. E. et Kurland C. G. 1990. Ribosomal RNA and protein mutants resistant to spectinomycin. *EMBO J.* **9**:735-739.
- Blaha G., Burkhardt N. et Nierhaus K. H. 2002. Formation of 70S ribosomes: large activation energy is required for the adaptation of exclusively the small ribosomal subunit. *Biophys. Chem.* **96**:153-161.
- Blanchard S. C., Gonzalez R. L., Kim H. D., Chu S. et Puglisi J. D. 2004a. tRNA selection and kinetic proofreading in translation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**:1008-1014.
- Blanchard S. C., Kim H. D., Gonzalez R. L., Jr., Puglisi J. D. et Chu S. 2004b. tRNA dynamics on the ribosome during translation. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* **101**:12893-12898.
- Boni I. V., Isaeva D. M., Musychenko M. L. et Tzareva N. V. 1991. Ribosome-messenger recognition: mRNA target sites for ribosomal protein S1. *Nucleic Acids Res.* **19**:155-162.
- Bowen W. S., Hill W. E. et Lodmell J. S. 2001. Comparison of rRNA cleavage by complementary 1,10-phenanthroline-Cu(II)- and EDTA-Fe(II)-derivatized oligonucleotides. *Methods* **25**:344-350.
- Bowen W. S., Van Dyke N., Murgola E. J., Lodmell J. S. et Hill W. E. 2005. Interaction of thiostrepton and elongation factor-G with the ribosomal protein L11-binding domain. *J. Biol. Chem.* **280**:2934-2943.
- Brakier-Gingras L., Bélanger F. et O'Connor M. 2003. Probing the role of ribosomal RNA in protein synthesis through mutagenesis. In: Brakier-Gingras L, Lapointe J, eds. *Translation mechanisms*: Landes Bioscience, Georgetown, TX et Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY. pp 247-263.
- Branch A. D., Benenfeld B. J. et Robertson H. D. 1985. Ultraviolet light-induced crosslinking reveals a unique region of local tertiary structure in potato spindle tuber viroid and HeLa 5S RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* **82**:6590-6594.

- Brandi L., Marzi S., Fabbretti A., Fleischer C., Hill W. E., Gualerzi C. O. et Stephen Lodmell J. 2004. The translation initiation functions of IF2: targets for thiostrepton inhibition. *J. Mol. Biol.* **335**:881-894.
- Bretscher M. S. 1968a. Direct translation of a circular messenger DNA. *Nature* **220**:1088-1091.
- Bretscher M. S. 1968b. Translocation in protein synthesis: a hybrid structure model. *Nature* **218**:675-677.
- Brimacombe R. 1991. RNA-protein interactions in the Escherichia coli ribosome. *Biochimie* **73**:927-936.
- Brimacombe R., Atmadja J., Stiege W. et Schuler D. 1988. A detailed model of the three-dimensional structure of Escherichia coli 16 S ribosomal RNA in situ in the 30 S subunit. *J. Mol. Biol.* **199**:115-136.
- Brimacombe R., Gornicki P., Greuer B., Mitchell P., Osswald M., Rinke-Appel J., Schuler D. et Stade K. 1990. The three-dimensional structure and function of Escherichia coli ribosomal RNA, as studied by cross-linking techniques. *Biochim. Biophys. Acta* **1050**:8-13.
- Brink M. F., Brink G., Verbeet M. P. et de Boer H. A. 1994. Spectinomycin interacts specifically with the residues G1064 and C1192 in 16S rRNA, thereby potentially freezing this molecule into an inactive conformation. *Nucleic Acids Res.* **22**:325-331.
- Brink M. F., Verbeet M. P. et de Boer H. A. 1993. Formation of the central pseudoknot in 16S rRNA is essential for initiation of translation. *EMBO J.* **12**:3987-3996.
- Brink M. F., Verbeet M. P. et de Boer H. A. 1995. Specialized ribosomes: highly specific translation in vivo of a single targetted mRNA species. *Gene* **156**:215-222.
- Brodersen D. E., Carter A. P., Clemons W. M., Jr., Morgan-Warren R. J., Murphy F. V. I., Ogle J. M., Tarry M. J., Wimberly B. T. et Ramakrishnan V. 2001. Atomic structures of the 30S subunit and its complexes with ligands and antibiotics. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **66**:17-32.
- Brodersen D. E., Clemons W. M., Jr., Carter A. P., Morgan-Warren R. J., Wimberly B. T. et Ramakrishnan V. 2000. The structural basis for the action of the antibiotics

- tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell* **103**:1143-1154.
- Brodersen D. E., Clemons W. M., Jr., Carter A. P., Wimberly B. T. et Ramakrishnan V. 2002. Crystal structure of the 30 S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16 S RNA. *J. Mol. Biol.* **316**:725-768.
- Bujalowski W., Graeser E., McLaughlin L. W. et Proschke D. 1986. Anticodon loop of tRNA^{Phe}: structure, dynamics, and Mg²⁺ binding. *Biochemistry* **25**:6365-6371.
- Bukhtiyarov Y., Druzina Z. et Cooperman B. S. 1999. Identification of 23S rRNA nucleotides neighboring the P-loop in the *Escherichia coli* 50S subunit. *Nucleic Acids Res.* **27**:4376-4384.
- Butcher S. E., Dieckmann T. et Feigon J. 1997. Solution structure of a GAAA tetraloop receptor RNA. *EMBO J.* **16**:7490-7499.
- Calogero R. A., Pon C. L., Canonaco M. A. et Gualerzi C. O. 1988. Selection of the mRNA translation initiation region by *Escherichia coli* ribosomes. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* **85**:6427-6431.
- Cameron D. M., Thompson J., March P. E. et Dahlberg A. E. 2002. Initiation factor IF2, thiostrepton and micrococin prevent the binding of elongation factor G to the *Escherichia coli* ribosome. *J. Mol. Biol.* **319**:27-35.
- Campbell D. O. et Legault P. 2005. Nuclear magnetic resonance structure of the Varkud satellite ribozyme stem-loop V RNA and magnesium-ion binding from chemical-shift mapping. *Biochemistry* **44**:4157-4170.
- Cannone J. J., Subramanian S., Schnare M. N., Collett J. R., D'Souza L. M., Du Y., Feng B., Lin N., Madabusi L. V., Muller K. M., Pande N., Shang Z., Yu N. et Gutell R. R. 2002. The Comparative RNA Web (CRW) Site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal, intron, and other RNAs: Correction. *BMC Bioinformatics* **3**:15.
- Capel M. S., Engelman D. M., Freeborn B. R., Kjeldgaard M., Langer J. A., Ramakrishnan V., Schindler D. G., Schneider D. K., Schoenborn B. P. et Sillers I. Y. 1987. A complete mapping of the proteins in the small ribosomal subunit of *Escherichia coli*. *Science* **238**:1403-1406.
- Capel M. S. et Ramakrishnan V. 1988. Neutron-scattering topography of proteins of the small ribosomal subunit. *Methods Enzymol.* **164**:117-131.

- Carter A. P., Clemons W. M., Brodersen D. E., Morgan-Warren R. J., Wimberly B. T. et Ramakrishnan V. 2000. Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **407**:340-348.
- Carter A. P., Clemons W. M., Jr., Brodersen D. E., Morgan-Warren R. J., Hartsch T., Wimberly B. T. et Ramakrishnan V. 2001. Crystal structure of an initiation factor bound to the 30S ribosomal subunit. *Science* **291**:498-501.
- Cate J. H., Gooding A. R., Podell E., Zhou K., Golden B. L., Kundrot C. E., Cech T. R. et Doudna J. A. 1996a. Crystal structure of a group I ribozyme domain: principles of RNA packing. *Science* **273**:1678-1685.
- Cate J. H., Gooding A. R., Podell E., Zhou K., Golden B. L., Szewczak A. A., Kundrot C. E., Cech T. R. et Doudna J. A. 1996b. RNA tertiary structure mediation by adenosine platforms. *Science* **273**:1696-1699.
- Cate J. H., Yusupov M. M., Yusupova G. Z., Earnest T. N. et Noller H. F. 1999. X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes. *Science* **285**:2095-2104.
- Chakrabarti S. et Gorini L. 1975. Growth of bacteriophages MS2 and T7 on streptomycin-resistant mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **121**:670-674.
- Chapman N. M. et Noller H. F. 1977. Protection of specific sites in 16 S RNA from chemical modification by association of 30 S and 50 S ribosomes. *J. Mol. Biol.* **109**:131-149.
- Clemons W. M., Jr., May J. L., Wimberly B. T., McCutcheon J. P., Capel M. S. et Ramakrishnan V. 1999. Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution. *Nature* **400**:833-840.
- Conn G. L. et Draper D. E. 1998. RNA structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**:278-285.
- Conn G. L., Draper D. E., Lattman E. E. et Gittis A. G. 1999. Crystal structure of a conserved ribosomal protein-RNA complex. *Science* **284**:1171-1174.
- Correll C. C., Beneken J., Plantinga M. J., Lubbers M. et Chan Y. L. 2003. The common and the distinctive features of the bulged-G motif based on a 1.04 Å resolution RNA structure. *Nucleic Acids Res.* **31**:6806-6818.
- Correll C. C., Freeborn B., Moore P. B. et Steitz T. A. 1997. Metals, motifs, and recognition in the crystal structure of a 5S rRNA domain. *Cell* **91**:705-712.

- Correll C. C., Munishkin A., Chan Y. L., Ren Z., Wool I. G. et Steitz T. A. 1998. Crystal structure of the ribosomal RNA domain essential for binding elongation factors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**:13436-13441.
- Correll C. C. et Swinger K. 2003. Common and distinctive features of GNRA tetraloops based on a GUAA tetraloop structure at 1.4 Å resolution. *RNA* **9**:355-363.
- Costa M. et Michel F. 1995. Frequent use of the same tertiary motif by self-folding RNAs. *EMBO J.* **14**:1276-1285.
- Costa M. et Michel F. 1997. Rules for RNA recognition of GNRA tetraloops deduced by in vitro selection: comparison with in vivo evolution. *EMBO J.* **16**:3289-3302.
- Cukras A. R., Southworth D. R., Brunelle J. L., Culver G. M. et Green R. 2003. Ribosomal proteins S12 and S13 function as control elements for translocation of the mRNA:tRNA complex. *Mol. Cell* **12**:321-328.
- Culver G. M. 2001. Meanderings of the mRNA through the ribosome. *Structure (Camb)* **9**:751-758.
- Culver G. M. 2003. Assembly of the 30S ribosomal subunit. *Biopolymers* **68**:234-249.
- Cundliffe E. 1990. Recognition sites for antibiotics within rRNA. In: Hill WE, Dahlberg A, Garrett RA, Moore PB, Schlessinger D, Warner JR, eds. *The Ribosome: Structure, Function and Evolution*. Washington, DC: ASM Press. pp 479-490.
- Czworkowski J., Wang J., Steitz T. A. et Moore P. B. 1994. The crystal structure of elongation factor G complexed with GDP, at 2.7 Å resolution. *EMBO J.* **13**:3661-3668.
- Dabrowski M., Spahn C. M., Schafer M. A., Patzke S. et Nierhaus K. H. 1998. Protection patterns of tRNAs do not change during ribosomal translocation. *J. Biol. Chem.* **273**:32793-32800.
- Dallas A. et Noller H. F. 2001. Interaction of translation initiation factor 3 with the 30S ribosomal subunit. *Mol. Cell* **8**:855-864.
- Davies J. et Davis B. D. 1968. Misreading of ribonucleic acid code words induced by aminoglycoside antibiotics. The effect of drug concentration. *J. Biol. Chem.* **243**:3312-3316.

- de Smit M. H. et van Duin J. 1994. Translational initiation on structured messengers. Another role for the Shine-Dalgarno interaction. *J. Mol. Biol.* **235**:173-184.
- De Stasio E. A., Moazed D., Noller H. F. et Dahlberg A. E. 1989. Mutations in 16S ribosomal RNA disrupt antibiotic-RNA interactions. *EMBO J.* **8**:1213-1216.
- Diener J. L. et Moore P. B. 1998. Solution structure of a substrate for the archaeal pre-tRNA splicing endonucleases: the bulge-helix-bulge motif. *Mol. Cell* **1**:883-894.
- Doherty E. A., Batey R. T., Masquida B. et Doudna J. A. 2001. A universal mode of helix packing in RNA. *Nat. Struct. Biol.* **8**:339-343.
- Dontsova O., Dokudovskaya S., Kopylov A., Bogdanov A., Rinke-Appel J., Junke N. et Brimacombe R. 1992. Three widely separated positions in the 16S RNA lie in or close to the ribosomal decoding region; a site-directed cross-linking study with mRNA analogues. *EMBO J.* **11**:3105-3116.
- Doring T., Mitchell P., Osswald M., Bochkariov D. et Brimacombe R. 1994. The decoding region of 16S RNA; a cross-linking study of the ribosomal A, P and E sites using tRNA derivatized at position 32 in the anticodon loop. *EMBO J.* **13**:2677-2685.
- Dorner S., Panuschka C., Schmid W. et Barta A. 2003. Mononucleotide derivatives as ribosomal P-site substrates reveal an important contribution of the 2'-OH to activity. *Nucleic Acids Res.* **31**:6536-6542.
- Doudna J. A. et Rath V. L. 2002. Structure and function of the eukaryotic ribosome: the next frontier. *Cell* **109**:153-156.
- Dragon F., Payant C. et Brakier-Gingras L. 1994. Mutational and structural analysis of the RNA binding site for Escherichia coli ribosomal protein S7. *J. Mol. Biol.* **244**:74-85.
- Dragon F., Spickler C., Pinard R., Carriere J. et Brakier-Gringras L. 1996. Mutations of non-canonical base-pairs in the 3' major domain of Escherichia coli 16 S ribosomal RNA affect the initiation and elongation of protein synthesis. *J. Mol. Biol.* **259**:207-215.
- Druzina Z. et Cooperman B. S. 2004. Photolabile anticodon stem-loop analogs of tRNA^{Phe} as probes of ribosomal structure and structural fluctuation at the decoding center. *RNA* **10**:1550-1562.

- Dube P., Bacher G., Stark H., Mueller F., Zemlin F., van Heel M. et Brimacombe R. 1998. Correlation of the expansion segments in mammalian rRNA with the fine structure of the 80 S ribosome; a cryoelectron microscopic reconstruction of the rabbit reticulocyte ribosome at 21 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **279**:403-421.
- Egebjerg J., Douthwaite S. et Garrett R. A. 1989. Antibiotic interactions at the GTPase-associated centre within *Escherichia coli* 23S rRNA. *EMBO J.* **8**:607-611.
- Ehresmann C., Baudin F., Mougél M., Romby P., Ebel J. P. et Ehresmann B. 1987. Probing the structure of RNAs in solution. *Nucleic Acids Res.* **15**:9109-9128.
- Endo Y., Mitsui K., Motizuki M. et Tsurugi K. 1987. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. *J. Biol. Chem.* **262**:5908-5912.
- Erlacher M. D., Lang K., Shankaran N., Wotzel B., Huttenhofer A., Micura R., Mankin A. S. et Polacek N. 2005. Chemical engineering of the peptidyl transferase center reveals an important role of the 2'-hydroxyl group of A2451. *Nucleic Acids Res.* **33**:1618-1627.
- Fahnestock S., Neumann H., Shashoua V. et Rich A. 1970. Ribosome-catalyzed ester formation. *Biochemistry* **9**:2477-2483.
- Fernandez-Miragall O. et Martinez-Salas E. 2003. Structural organization of a viral IRES depends on the integrity of the GNRA motif. *RNA* **9**:1333-1344.
- Fourmy D., Recht M. I., Blanchard S. C. et Puglisi J. D. 1996. Structure of the A site of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA complexed with an aminoglycoside antibiotic. *Science* **274**:1367-1371.
- Fourmy D., Yoshizawa S. et Puglisi J. D. 1998. Paromomycin binding induces a local conformational change in the A-site of 16 S rRNA. *J Mol Biol* **277**:333-345.
- Frank J. et Agrawal R. K. 2000. A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature* **406**:318-322.
- Frank J., Penczek P., Grassucci R. et Srivastava S. 1991. Three-dimensional reconstruction of the 70S *Escherichia coli* ribosome in ice: the distribution of ribosomal RNA. *J. Cell Biol.* **115**:597-605.

- Frank J., Sengupta J., Gao H., Li W., Valle M., Zavialov A. et Ehrenberg M. 2005. The role of tRNA as a molecular spring in decoding, accommodation, and peptidyl transfer. *FEBS Lett* **579**:959-962.
- Frank J., Verschoor A., Li Y., Zhu J., Lata R. K., Radermacher M., Penczek P., Grassucci R., Agrawal R. K. et Srivastava S. 1995. A model of the translational apparatus based on a three-dimensional reconstruction of the Escherichia coli ribosome. *Biochem. Cell Biol.* **73**:757-765.
- Fredrick K. et Noller H. F. 2003. Catalysis of ribosomal translocation by sparsomycin. *Science* **300**:1159-1162.
- Funatsu G. et Wittmann H. G. 1972. Ribosomal proteins. 33. Location of amino-acid replacements in protein S12 isolated from Escherichia coli mutants resistant to streptomycin. *J. Mol. Biol.* **68**:547-550.
- Gabashvili I. S., Agrawal R. K., Grassucci R. et Frank J. 1999a. Structure and structural variations of the Escherichia coli 30 S ribosomal subunit as revealed by three-dimensional cryo-electron microscopy. *J. Mol. Biol.* **286**:1285-1291.
- Gabashvili I. S., Agrawal R. K., Grassucci R., Squires C. L., Dahlberg A. E. et Frank J. 1999b. Major rearrangements in the 70S ribosomal 3D structure caused by a conformational switch in 16S ribosomal RNA. *EMBO J.* **18**:6501-6507.
- Gabashvili I. S., Agrawal R. K., Spahn C. M., Grassucci R. A., Svergun D. I., Frank J. et Penczek P. 2000. Solution structure of the *E. coli* 70S ribosome at 11.5 Å resolution. *Cell* **100**:537-549.
- Gabashvili I. S., Gregory S. T., Valle M., Grassucci R., Worbs M., Wahl M. C., Dahlberg A. E. et Frank J. 2001. The polypeptide tunnel system in the ribosome and its gating in erythromycin resistance mutants of L4 and L22. *Mol. Cell* **8**:181-188.
- Gabashvili I. S., Whirl-Carrillo M., Bada M., Banatao D. R. et Altman R. B. 2003. Ribosomal dynamics inferred from variations in experimental measurements. *RNA* **9**:1301-1307.
- Gagnon M. G. et Steinberg S. V. 2002. GU receptors of double helices mediate tRNA movement in the ribosome. *RNA* **8**:873-877.

- Gao H., Sengupta J., Valle M., Korostelev A., Eswar N., Stagg S. M., Van Roey P., Agrawal R. K., Harvey S. C., Sali A., Chapman M. S. et Frank J. 2003. Study of the structural dynamics of the *E. coli* 70S ribosome using real-space refinement. *Cell* **113**:789-801.
- Gavrilova L. P., Kostiyashkina O. E., Koteliansky V. E., Rutkevitch N. M. et Spirin A. S. 1976. Factor-free ("non-enzymic") and factor-dependent systems of translation of polyuridylic acid by *Escherichia coli* ribosomes. *J. Mol. Biol.* **101**:537-552.
- Gavrilova L. P. et Spirin A. S. 1971. Stimulation of "non-enzymic" translocation in ribosomes by p-chloromercuribenzoate. *FEBS Lett* **17**:324-326.
- Gesteland R. F., Cech T. R. et Atkins J. F. 1999. *The RNA World*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Gilbert R. J., Fucini P., Connell S., Fuller S. D., Nierhaus K. H., Robinson C. V., Dobson C. M. et Stuart D. I. 2004. Three-dimensional structures of translating ribosomes by Cryo-EM. *Mol. Cell* **14**:57-66.
- Gluck A., Endo Y. et Wool I. G. 1992. Ribosomal RNA identity elements for ricin A-chain recognition and catalysis. Analysis with tetraloop mutants. *J. Mol. Biol.* **226**:411-424.
- Goody T. A., Melcher S. E., Norman D. G. et Lilley D. M. 2004. The kink-turn motif in RNA is dimorphic, and metal ion-dependent. *RNA* **10**:254-264.
- Gorini L. 1971. Ribosomal discrimination of tRNAs. *Nat. New. Biol.* **234**:261-264.
- Gorini L. et Kataja E. 1964. Phenotypic Repair by Streptomycin of Defective Genotypes in *E. Coli*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **51**:487-493.
- Gravel M., Melançon P. et Brakier-Gingras L. 1987. Cross-linking of streptomycin to the 16S ribosomal RNA of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **26**:6227-6232.
- Green R. 2000. Ribosomal translocation: EF-G turns the crank. *Curr. Biol.* **10**:R369-373.
- Green R. et Noller H. F. 1997. Ribosomes and translation. *Annu. Rev. Biochem.* **66**:679-716.
- Green R. et Noller H. F. 1999. Reconstitution of functional 50S ribosomes from in vitro transcripts of *Bacillus stearothermophilus* 23S rRNA. *Biochemistry* **38**:1772-1779.

- Gregory R. J. et Zimmermann R. A. 1986. Site-directed mutagenesis of the binding site for ribosomal protein S8 within 16S ribosomal RNA from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **14**:5761-5776.
- Gromadski K. B. et Rodnina M. V. 2004. Streptomycin interferes with conformational coupling between codon recognition and GTPase activation on the ribosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**:316-322.
- Gualerzi C. O., Brandi L., Caserta E., Garofalo C., Lammi M., La Teana A., Petrelli D., Spurio R., Tomsic J. et Pon C. L. 2001. Initiation factors in the early events of mRNA translation in bacteria. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **66**:363-376.
- Guerrier-Takada C., Gardiner K., Marsh T., Pace N. et Altman S. 1983. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **35**:849-857.
- Gutell R. R. 1996. Comparative sequence analysis and structure of 16S and 23S rRNA. In: Zimmermann RA, Dahlberg A, eds. *Ribosomal RNA: Structure, Evolution, Processing and Function in Protein Biosynthesis*. Boca Raton: CRC. pp 111-128.
- Gutell R. R., Cannone J. J., Konings D. et Gautheret D. 2000. Predicting U-turns in ribosomal RNA with comparative sequence analysis. *J. Mol. Biol.* **300**:791-803.
- Gutell R. R., Gray M. W. et Schnare M. N. 1993. A compilation of large subunit (23S and 23S-like) ribosomal RNA structures: 1993. *Nucleic Acids Res.* **21**:3055-3074.
- Gutell R. R., Larsen N. et Woese C. R. 1994. Lessons from an evolving rRNA: 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microbiol Rev.* **58**:10-26.
- Gutell R. R., Lee J. C. et Cannone J. J. 2002. The accuracy of ribosomal RNA comparative structure models. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**:301-310.
- Hansen J. L., Ippolito J. A., Ban N., Nissen P., Moore P. B. et Steitz T. A. 2002a. The structures of four macrolide antibiotics bound to the large ribosomal subunit. *Mol. Cell* **10**:117-128.
- Hansen J. L., Moore P. B. et Steitz T. A. 2003. Structures of five antibiotics bound at the peptidyl transferase center of the large ribosomal subunit. *J. Mol. Biol.* **330**:1061-1075.
- Hansen J. L., Schmeing T. M., Moore P. B. et Steitz T. A. 2002b. Structural insights into peptide bond formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:11670-11675.

- Harms J., Schluenzen F., Zarivach R., Bashan A., Gat S., Agmon I., Bartels H., Franceschi F. et Yonath A. 2001. High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell* **107**:679-688.
- Hedenstierna K. O., Siefert J. L., Fox G. E. et Murgola E. J. 2000. Co-conservation of rRNA tetraloop sequences and helix length suggests involvement of the tetraloops in higher-order interactions. *Biochimie* **82**:221-227.
- Held W. A., Ballou B., Mizushima S. et Nomura M. 1974. Assembly mapping of 30 S ribosomal proteins from *Escherichia coli*. Further studies. *J. Biol. Chem.* **249**:3103-3111.
- Hennelly S. P., Antoun A., Ehrenberg M., Gualerzi C. O., Knight W., Lodmell J. S. et Hill W. E. 2005. A time-resolved investigation of ribosomal subunit association. *J. Mol. Biol.* **346**:1243-1258.
- Hermann T. et Patel D. J. 2000. RNA bulges as architectural and recognition motifs. *Structure Fold. Des.* **8**:R47-54.
- Hesslein A. E., Katunin V. I., Beringer M., Kosek A. B., Rodnina M. V. et Strobel S. A. 2004. Exploration of the conserved A+C wobble pair within the ribosomal peptidyl transferase center using affinity purified mutant ribosomes. *Nucleic Acids Res* **32**:3760-3770.
- Heus H. A. et Pardi A. 1991. Structural features that give rise to the unusual stability of RNA hairpins containing GNRA loops. *Science* **253**:191-194.
- Ho S. N., Hunt H. D., Horton R. M., Pullen J. K. et Pease L. R. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**:51-59.
- Hoang L., Fredrick K. et Noller H. F. 2004. Creating ribosomes with an all-RNA 30S subunit P site. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* **101**:12439-12443.
- Hoerter J. A., Lambert M. N., Pereira M. J. et Walter N. G. 2004. Dynamics inherent in helix 27 from *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA. *Biochemistry* **43**:14624-14636.
- Hopfield J. J. 1974. Kinetic proofreading: a new mechanism for reducing errors in biosynthetic processes requiring high specificity. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* **71**:4135-4139.

- Huang K. H., Fairclough R. H. et Cantor C. R. 1975. Singlet energy transfer studies of the arrangement of proteins in the 30 S Escherichia coli ribosome. *J. Mol. Biol.* **97**:443-470.
- Hui A. et de Boer H. A. 1987. Specialized ribosome system: preferential translation of a single mRNA species by a subpopulation of mutated ribosomes in Escherichia coli. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **84**:4762-4766.
- Ikawa Y., Naito D., Aono N., Shiraishi H. et Inoue T. 1999. A conserved motif in group IC3 introns is a new class of GNRA receptor. *Nucleic Acids Res.* **27**:1859-1865.
- Illangasekare M. et Yarus M. 1999. Specific, rapid synthesis of Phe-RNA by RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**:5470-5475.
- Ito K., Uno M. et Nakamura Y. 2000. A tripeptide 'anticodon' deciphers stop codons in messenger RNA. *Nature* **403**:680-684.
- Jacob W. F., Santer M. et Dahlberg A. E. 1987. A single base change in the Shine-Dalgarno region of 16S rRNA of Escherichia coli affects translation of many proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **84**:4757-4761.
- Jaeger L., Michel F. et Westhof E. 1994. Involvement of a GNRA tetraloop in long-range RNA tertiary interactions. *J. Mol. Biol.* **236**:1271-1276.
- Joseph S. 2003. After the ribosome structure: how does translocation work? *RNA* **9**:160-164.
- Joseph S. et Noller H. F. 1996. Mapping the rRNA neighborhood of the acceptor end of tRNA in the ribosome. *EMBO J.* **15**:910-916.
- Joseph S. et Noller H. F. 1998. EF-G-catalyzed translocation of anticodon stem-loop analogs of transfer RNA in the ribosome. *EMBO J.* **17**:3478-3483.
- Joseph S., Weiser B. et Noller H. F. 1997. Mapping the inside of the ribosome with an RNA helical ruler. *Science* **278**:1093-1098.
- Jucker F. M., Heus H. A., Yip P. F., Moors E. H. et Pardi A. 1996. A network of heterogeneous hydrogen bonds in GNRA tetraloops. *J Mol Biol* **264**:968-980.
- Jucker F. M. et Pardi A. 1995. Solution structure of the CUUG hairpin loop: a novel RNA tetraloop motif. *Biochemistry* **34**:14416-14427.
- Juzumiene D. I., Shapkina T. G. et Wollenzien P. 1995. Distribution of cross-links between mRNA analogues and 16 S rRNA in Escherichia coli 70 S ribosomes made under

- equilibrium conditions and their response to tRNA binding. *J. Biol. Chem.* **270**:12794-12800.
- Juzumiene D. I. et Wollenzien P. 2001. Arrangement of the central pseudoknot region of 16S rRNA in the 30S ribosomal subunit determined by site-directed 4-thiouridine crosslinking. *RNA* **7**:71-84.
- Kakhniashvili D. G., Smailov S. K. et Gavrilova L. P. 1986. The excess GTP hydrolyzed during mistranslation is expended at the stage of EF-Tu-promoted binding of non-cognate aminoacyl-tRNA. *FEBS Lett* **196**:103-107.
- Kaminski A., Hunt S. L., Gibbs C. L. et Jackson R. J. 1994. Internal initiation of mRNA translation in eukaryotes. *Genet. Eng. (N Y)* **16**:115-155.
- Karimi R., Pavlov M. Y., Buckingham R. H. et Ehrenberg M. 1999. Novel roles for classical factors at the interface between translation termination and initiation. *Mol. Cell* **3**:601-609.
- Katunin V. I., Muth G. W., Strobel S. A., Wintermeyer W. et Rodnina M. V. 2002. Important contribution to catalysis of peptide bond formation by a single ionizing group within the ribosome. *Mol. Cell* **10**:339-346.
- Kelley S. T., Akmaev V. R. et Stormo G. D. 2000. Improved statistical methods reveal direct interactions between 16S and 23S rRNA. *Nucleic Acids Res.* **28**:4938-4943.
- Khaitovich P., Tenson T., Kloss P. et Mankin A. S. 1999. Reconstitution of functionally active *Thermus aquaticus* large ribosomal subunits with in vitro-transcribed rRNA. *Biochemistry* **38**:1780-1788.
- Kim D. F. et Green R. 1999. Base-pairing between 23S rRNA and tRNA in the ribosomal A site. *Mol. Cell* **4**:859-864.
- Kisselev L. L. et Buckingham R. H. 2000. Translational termination comes of age. *Trends Biochem. Sci.* **25**:561-566.
- Klaholz B. P., Pape T., Zavialov A. V., Myasnikov A. G., Orlova E. V., Vestergaard B., Ehrenberg M. et van Heel M. 2003. Structure of the *Escherichia coli* ribosomal termination complex with release factor 2. *Nature* **421**:90-94.
- Klein D. J., Schmeing T. M., Moore P. B. et Steitz T. A. 2001. The kink-turn: a new RNA secondary structure motif. *EMBO J.* **20**:4214-4221.

- Komarova A. V., Tchufistova L. S., Supina E. V. et Boni I. V. 2002. Protein S1 counteracts the inhibitory effect of the extended Shine-Dalgarno sequence on translation. *RNA* **8**:1137-1147.
- Kössel H., Hoch B. et Zeltz P. 1990. Alternative base pairing between 5'- and 3'-terminal sequences of small subunit RNA may provide the basis of a conformational switch of the small ribosomal subunit. *Nucleic Acids Res.* **18**:4083-4088.
- Kruger K., Grabowski P. J., Zaug A. J., Sands J., Gottschling D. E. et Cech T. R. 1982. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* **31**:147-157.
- Krzyzosiak W., Denman R., Nurse K., Hellmann W., Boublik M., Gehrke C. W., Agris P. F. et Ofengand J. 1987. In vitro synthesis of 16S ribosomal RNA containing single base changes and assembly into a functional 30S ribosome. *Biochemistry* **26**:2353-2364.
- Kumar R. K. et Yarus M. 2001. RNA-catalyzed amino acid activation. *Biochemistry* **40**:6998-7004.
- Kurland C. G. et Ehrenberg M. 1984. Optimization of translation accuracy. *Prog. Nucleic Acid. Res. Mol. Biol.* **31**:191-219.
- Kurland C. G., Jörgensen F., Richter A., Ehrenberg M., Bilgin N. et Rojas A.-M. 1990. Through the Accuracy Window. In: Hill WE, Dahlberg A, Garrett RA, Moore PB, Schlessinger D, Warner JR, eds. *The Ribosome : Structure, Function & Evolution*. Washington, D. C.: American Society for Microbiology. pp 513-526.
- La Teana A., Brandi A., O'Connor M., Freddi S. et Pon C. L. 2000. Translation during cold adaptation does not involve mRNA-rRNA base pairing through the downstream box. *RNA* **6**:1393-1402.
- Labuda D. et Porschke D. 1982. Magnesium ion inner sphere complex in the anticodon loop of phenylalanine transfer ribonucleic acid. *Biochemistry* **21**:49-53.
- Laios E., Waddington M., Saraiya A. A., Baker K. A., O'Connor E., Pamarathy D. et Cunningham P. R. 2004. Combinatorial genetic technology for the development of new anti-infectives. *Arch Pathol Lab Med* **128**:1351-1359.

- Lake J. A. 1985. Evolving ribosome structure: domains in archaeobacteria, eubacteria, eocytes and eukaryotes. *Annu Rev Biochem* **54**:507-530.
- Laursen B. S., Siwanowicz I., Larigauderie G., Hedegaard J., Ito K., Nakamura Y., Kenney J. M., Mortensen K. K. et Sperling-Petersen H. U. 2003. Characterization of mutations in the GTP-binding domain of IF2 resulting in cold-sensitive growth of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **326**:543-551.
- Laursen B. S., Sorensen H. P., Mortensen K. K. et Sperling-Petersen H. U. 2005. Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**:101-123.
- Leclerc D. et Brakier-Gingras L. 1991. A conformational switch involving the 915 region of *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA. *FEBS Lett.* **279**:171-174.
- Lee J. C., Cannone J. J. et Gutell R. R. 2003. The lonepair triloop: a new motif in RNA structure. *J. Mol. Biol.* **325**:65-83.
- Lee K., Holland-Staley C. A. et Cunningham P. R. 1996. Genetic analysis of the Shine-Dalgarno interaction: selection of alternative functional mRNA-rRNA combinations. *RNA* **2**:1270-1285.
- Lee K., Varma S., SantaLucia J., Jr. et Cunningham P. R. 1997. *In vivo* determination of RNA structure-function relationships: analysis of the 790 loop in ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* **269**:732-743.
- Lee N., Bessho Y., Wei K., Szostak J. W. et Suga H. 2000. Ribozyme-catalyzed tRNA aminoacylation. *Nat. Struct. Biol.* **7**:28-33.
- Legault P., Li J., Mogridge J., Kay L. E. et Greenblatt J. 1998. NMR structure of the bacteriophage lambda N peptide/boxB RNA complex: recognition of a GNRA fold by an arginine-rich motif. *Cell* **93**:289-299.
- Leonov A. A., Sergiev P. V., Bogdanov A. A., Brimacombe R. et Dontsova O. A. 2003. Affinity purification of ribosomes with a lethal G2655C mutation in 23 S rRNA that affects the translocation. *J Biol Chem* **278**:25664-25670.
- Leontis N. B., Stombaugh J. et Westhof E. 2002. Motif prediction in ribosomal RNAs Lessons and prospects for automated motif prediction in homologous RNA molecules. *Biochimie* **84**:961-973.

- Leontis N. B. et Westhof E. 1998. A common motif organizes the structure of multi-helix loops in 16 S and 23 S ribosomal RNAs. *J. Mol. Biol.* **283**:571-583.
- Lesage P., Chiaruttini C., Graffe M., Dondon J., Milet M. et Springer M. 1992. Messenger RNA secondary structure and translational coupling in the *Escherichia coli* operon encoding translation initiation factor IF3 and the ribosomal proteins, L35 and L20. *J. Mol. Biol.* **228**:366-386.
- Liljas A. 1996. Imprinting through molecular mimicry. Protein synthesis. *Curr. Biol.* **6**:247-249.
- Lill R., Robertson J. M. et Wintermeyer W. 1986. Affinities of tRNA binding sites of ribosomes from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **25**:3245-3255.
- Lodmell J. S. et Dahlberg A. E. 1997. A conformational switch in *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA during decoding of messenger RNA. *Science* **277**:1262-1267.
- Lodmell J. S., Gutell R. R. et Dahlberg A. E. 1995. Genetic and comparative analyses reveal an alternative secondary structure in the region of nt 912 of *Escherichia coli* 16S rRNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**:10555-10559.
- Maivali U. et Remme J. 2004. Definition of bases in 23S rRNA essential for ribosomal subunit association. *RNA* **10**:600-604.
- Maizels N. et Weiner A. M. 1999. The genomic tag hypothesis: what molecular fossils tell us about evolution of tRNA. In: Gesteland RF, Cech TR, Atkins JF, eds. *The RNA World*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp 79-111.
- Mandal M. et Breaker R. R. 2004. Gene regulation by riboswitches. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**:451-463.
- Marzi S., Knight W., Brandi L., Caserta E., Soboleva N., Hill W. E., Gualerzi C. O. et Lodmell J. S. 2003. Ribosomal localization of translation initiation factor IF2. *RNA* **9**:958-969.
- Matadeen R., Patwardhan A., Gowen B., Orlova E. V., Pape T., Cuff M., Mueller F., Brimacombe R. et van Heel M. 1999. The *Escherichia coli* large ribosomal subunit at 7.5 Å resolution. *Structure Fold. Des.* **7**:1575-1583.
- Matadeen R., Sergiev P., Leonov A., Pape T., van der Sluis E., Mueller F., Osswald M., von Knoblauch K., Brimacombe R., Bogdanov A., van Heel M. et Dontsova O.

2001. Direct localization by cryo-electron microscopy of secondary structural elements in *Escherichia coli* 23 S rRNA which differ from the corresponding regions in *Haloarcula marismortui*. *J. Mol. Biol.* **307**:1341-1349.
- May R. P., Nowotny V., Nowotny P., Voss H. et Nierhaus K. H. 1992. Inter-protein distances within the large subunit from *Escherichia coli* ribosomes. *EMBO J.* **11**:373-378.
- McCutcheon J. P., Agrawal R. K., Philips S. M., Grassucci R. A., Gerchman S. E., Clemons W. M., Jr., Ramakrishnan V. et Frank J. 1999. Location of translational initiation factor IF3 on the small ribosomal subunit. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* **96**:4301-4306.
- Mears J. A., Cannone J. J., Stagg S. M., Gutell R. R., Agrawal R. K. et Harvey S. C. 2002. Modeling a minimal ribosome based on comparative sequence analysis. *J. Mol. Biol.* **321**:215-234.
- Melançon P., Gravel M., Boileau G. et Brakier-Gingras L. 1987. Reassembly of active 30S ribosomal subunits with an unmethylated in vitro transcribed 16S rRNA. *Biochem. Cell. Biol.* **65**:1022-1030.
- Melançon P., Leclerc D., Destroismaisons N. et Brakier-Gingras L. 1990. The anti-Shine-Dalgarno region in *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA is not essential for the correct selection of translational starts. *Biochemistry* **29**:3402-3407.
- Melançon P., Lemieux C. et Brakier-Gingras L. 1988. A mutation in the 530 loop of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA causes resistance to streptomycin. *Nucleic Acids Res.* **16**:9631-9639.
- Menger M., Eckstein F. et Porschke D. 2000. Dynamics of the RNA hairpin GNRA tetraloop. *Biochemistry* **39**:4500-4507.
- Merryman C., Moazed D., Daubresse G. et Noller H. F. 1999a. Nucleotides in 23S rRNA protected by the association of 30S and 50S ribosomal subunits. *J. Mol. Biol.* **285**:107-113.
- Merryman C., Moazed D., McWhirter J. et Noller H. F. 1999b. Nucleotides in 16S rRNA protected by the association of 30S and 50S ribosomal subunits. *J. Mol. Biol.* **285**:97-105.

- Michel F. et Westhof E. 1990. Modelling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis. *J. Mol. Biol.* **216**:585-610.
- Mitchell P., Osswald M. et Brimacombe R. 1992. Identification of intermolecular RNA cross-links at the subunit interface of the Escherichia coli ribosome. *Biochemistry* **31**:3004-3011.
- Moazed D. et Noller H. F. 1986. Transfer RNA shields specific nucleotides in 16S ribosomal RNA from attack by chemical probes. *Cell* **47**:985-994.
- Moazed D. et Noller H. F. 1987. Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature* **327**:389-394.
- Moazed D. et Noller H. F. 1989a. Interaction of tRNA with 23S rRNA in the ribosomal A, P, and E sites. *Cell* **57**:585-597.
- Moazed D. et Noller H. F. 1989b. Intermediate states in the movement of transfer RNA in the ribosome. *Nature* **342**:142-148.
- Moazed D. et Noller H. F. 1990. Binding of tRNA to the ribosomal A and P sites protects two distinct sets of nucleotides in 16 S rRNA. *J. Mol. Biol.* **211**:135-145.
- Moazed D., Robertson J. M. et Noller H. F. 1988. Interaction of elongation factors EF-G and EF-Tu with a conserved loop in 23S RNA. *Nature* **334**:362-364.
- Moll I., Grill S., Gualerzi C. O. et Blasi U. 2002. Leaderless mRNAs in bacteria: surprises in ribosomal recruitment and translational control. *Mol. Microbiol.* **43**:239-246.
- Moll I., Huber M., Grill S., Sairafi P., Mueller F., Brimacombe R., Londei P. et Blasi U. 2001. Evidence against an Interaction between the mRNA downstream box and 16S rRNA in translation initiation. *J. Bacteriol.* **183**:3499-3505.
- Montandon P. E., Wagner R. et Stutz E. 1986. E. coli ribosomes with a C912 to U base change in the 16S rRNA are streptomycin resistant. *EMBO J.* **5**:3705-3708.
- Montpetit A., Payant C., Nolan J. M. et Brakier-Gingras L. 1998. Analysis of the conformation of the 3' major domain of Escherichia coli 16S ribosomal RNA using site-directed photoaffinity crosslinking. *RNA* **4**:1455-1466.
- Moore P. B. 1998. The three-dimensional structure of the ribosome and its components. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**:35-58.

- Moore P. B. 1999. Structural motifs in RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **68**:287-300.
- Morosyuk S. V., Cunningham P. R. et SantaLucia J., Jr. 2001a. Structure and function of the conserved 690 hairpin in *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA. II. NMR solution structure. *J. Mol. Biol.* **307**:197-211.
- Morosyuk S. V., Lee K., SantaLucia J., Jr. et Cunningham P. R. 2000. Structure and function of the conserved 690 hairpin in *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA: analysis of the stem nucleotides. *J. Mol. Biol.* **300**:113-126.
- Morosyuk S. V., SantaLucia J., Jr. et Cunningham P. R. 2001b. Structure and function of the conserved 690 hairpin in *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA. III. Functional analysis of the 690 loop. *J. Mol. Biol.* **307**:213-228.
- Mueller F. et Brimacombe R. 1997. A new model for the three-dimensional folding of *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA. I. Fitting the RNA to a 3D electron microscopic map at 20 Å. *J. Mol. Biol.* **271**:524-544.
- Mueller F., Sommer I., Baranov P., Matadeen R., Stoldt M., Wohnert J., Gorlach M., van Heel M. et Brimacombe R. 2000. The 3D arrangement of the 23 S and 5 S rRNA in the *Escherichia coli* 50 S ribosomal subunit based on a cryo-electron microscopic reconstruction at 7.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **298**:35-59.
- Mueller F., Stark H., van Heel M., Rinke-Appel J. et Brimacombe R. 1997. A new model for the three-dimensional folding of *Escherichia coli* 16 S ribosomal RNA. III. The topography of the functional centre. *J. Mol. Biol.* **271**:566-587.
- Murgola E. J., Pagel F. T., Hijazi K. A., Arkov A. L., Xu W. et Zhao S. Q. 1995. Variety of nonsense suppressor phenotypes associated with mutational changes at conserved sites in *Escherichia coli* ribosomal RNA. *Biochem. Cell Biol.* **73**:925-931.
- Murphy F. L. et Cech T. R. 1994. GAAA tetraloop and conserved bulge stabilize tertiary structure of a group I intron domain. *J. Mol. Biol.* **236**:49-63.
- Muth G. W., Chen L., Kosek A. B. et Strobel S. A. 2001. pH-dependent conformational flexibility within the ribosomal peptidyl transferase center. *RNA* **7**:1403-1415.
- Muth G. W. et Hill W. E. 2001. Phenanthroline-Cu(II) cleavage as a probe of rRNA structure. *Methods* **23**:218-232.

- Muth G. W., Ortoleva-Donnelly L. et Strobel S. A. 2000. A single adenosine with a neutral pKa in the ribosomal peptidyl transferase center. *Science* **289**:947-950.
- Nakamura Y. et Ito K. 2003. Making sense of mimic in translation termination. *Trends Biochem. Sci.* **28**:99-105.
- Nanda K. et Wollenzien P. 2004. Pattern of 4-thiouridine-induced cross-linking in 16S ribosomal RNA in the Escherichia coli 30S subunit. *Biochemistry* **43**:8923-8934.
- Nevskaya N., Tischenko S., Fedorov R., Al-Karadaghi S., Liljas A., Kraft A., Piendl W., Garber M. et Nikonov S. 2000. Archaeal ribosomal protein L1: the structure provides new insights into RNA binding of the L1 protein family. *Structure Fold. Des.* **8**:363-371.
- Ninio J. 1975. Kinetic amplification of enzyme discrimination. *Biochimie* **57**:587-595.
- Nissen P., Hansen J., Ban N., Moore P. B. et Steitz T. A. 2000. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* **289**:920-930.
- Nissen P., Ippolito J. A., Ban N., Moore P. B. et Steitz T. A. 2001. RNA tertiary interactions in the large ribosomal subunit: the A-minor motif. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**:4899-4903.
- Nissen P., Kjeldgaard M., Thirup S., Polekhina G., Reshetnikova L., Clark B. F. et Nyborg J. 1995. Crystal structure of the ternary complex of Phe-tRNAPhe, EF-Tu, and a GTP analog. *Science* **270**:1464-1472.
- Nissen P., Thirup S., Kjeldgaard M. et Nyborg J. 1999. The crystal structure of Cys-tRNACys-EF-Tu-GDPNP reveals general and specific features in the ternary complex and in tRNA. *Structure Fold. Des.* **7**:143-156.
- Noller H. F. 1991a. Ribosomal RNA and translation. *Annu. Rev. Biochem.* **60**:191-227.
- Noller H. F. 1991b. Ribosomes. Drugs and the RNA world. *Nature* **353**:302-303.
- Noller H. F. 1999. On the origin of the ribosome: coevolution of subdomains of tRNA and rRNA. In: Gesteland RF, Cech TR, Atkins JF, eds. *The RNA World*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp 197-219.
- Noller H. F. 2004. The driving force for molecular evolution of translation. *RNA* **10**:1833-1837.

- Noller H. F., Cate J. H., Dallas A., Culver G. M., Earnest T. N., Green R., Holmberg L., Joseph S., Lancaster L., Lieberman K., Merryman C., Newcomb L., Samaha R. R., von Ahsen U., Yusupov M. M., Yusupova G. Z. et Wilson K. S. 2000. Studies on the structure and function of ribosomes by combined use of chemical probing and X-ray crystallography. In: Garrett RA, Douthwaite S, Liljas A, Matheson AT, Moore PB, Noller HF, eds. *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics and Cellular Interactions*. Washington, DC: ASM Press. pp 129-150.
- Noller H. F., Hoang L. et Fredrick K. 2005. The 30S ribosomal P site: a function of 16S rRNA. *FEBS Lett* **579**:855-858.
- Noller H. F., Hoffarth V. et Zimniak L. 1992. Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science* **256**:1416-1419.
- Noller H. F. et Woese C. R. 1981. Secondary structure of 16S ribosomal RNA. *Science* **212**:403-411.
- Noller H. F., Yusupov M. M., Yusupova G. Z., Baucom A. et Cate J. H. 2002. Translocation of tRNA during protein synthesis. *FEBS Lett* **514**:11-16.
- Nowakowski J. et Tinoco I., Jr. 1999. RNA structure in solution. In: Neidle S, ed. *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure*. New York: Oxford University Press. pp 567-602.
- O'Brien T. W. 2002. Evolution of a protein-rich mitochondrial ribosome: implications for human genetic disease. *Gene* **286**:73-79.
- O'Connor M., Asai T., Squires C. L. et Dahlberg A. E. 1999. Enhancement of translation by the downstream box does not involve base pairing of mRNA with the penultimate stem sequence of 16S rRNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**:8973-8978.
- O'Connor M. et Dahlberg A. E. 1995. The involvement of two distinct regions of 23 S ribosomal RNA in tRNA selection. *J. Mol. Biol.* **254**:838-847.
- O'Connor M. et Dahlberg A. E. 2001. Enhancement of translation by the epsilon element is independent of the sequence of the 460 region of 16S rRNA. *Nucleic Acids Res.* **29**:1420-1425.

- Odom O. W., Picking W. D. et Hardesty B. 1990. Movement of tRNA but not the nascent peptide during peptide bond formation on ribosomes. *Biochemistry* **29**:10734-10744.
- Ofengand J. 2002. Ribosomal RNA pseudouridines and pseudouridine synthases. *FEBS Lett* **514**:17-25.
- Ogle J. M., Brodersen D. E., Clemons W. M., Jr., Tarry M. J., Carter A. P. et Ramakrishnan V. 2001. Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science* **292**:897-902.
- Ogle J. M., Carter A. P. et Ramakrishnan V. 2003. Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures. *Trends Biochem. Sci.* **28**:259-266.
- Ogle J. M., Murphy F. V., Tarry M. J. et Ramakrishnan V. 2002. Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell* **111**:721-732.
- Ogle J. M. et Ramakrishnan V. 2004. Structural Insights into Translational Fidelity. *Annu. Rev. Biochem.*
- Olins P. O. et Rangwala S. H. 1989. A novel sequence element derived from bacteriophage T7 mRNA acts as an enhancer of translation of the lacZ gene in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **264**:16973-16976.
- Osswald M. et Brimacombe R. 1999. The environment of 5S rRNA in the ribosome: cross-links to 23S rRNA from sites within helices II and III of the 5S molecule. *Nucleic Acids Res.* **27**:2283-2290.
- Ottenheijm H. C. et van den Broek L. A. 1988. The development of sparsomycin as an anti-tumour drug. *Anticancer Drug Des* **2**:333-337.
- Ottenheijm H. C., van den Broek L. A., Ballesta J. P. et Zylicz Z. 1986. Chemical and biological aspects of sparsomycin, an antibiotic from Streptomyces. *Prog Med Chem* **23**:219-268.
- Ozaki M., Mizushima S. et Nomura M. 1969. Identification and functional characterization of the protein controlled by the streptomycin-resistant locus in E. coli. *Nature* **222**:333-339.
- Pape T., Stark H., Matadeen R., Orlova E. V. et van Heel M. 2000a. Visualization of the translational elongation cycle by cryo-electron microscopy. In: Garrett RA,

- Douthwaite SR, Liljas A, Matheson AT, Moore PB, Noller HF, eds. *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics and Cellular Interactions*. Wahington, DC: ASM Press. pp 37-44.
- Pape T., Wintermeyer W. et Rodnina M. 1999. Induced fit in initial selection and proofreading of aminoacyl-tRNA on the ribosome. *EMBO J.* **18**:3800-3807.
- Pape T., Wintermeyer W. et Rodnina M. V. 1998. Complete kinetic mechanism of elongation factor Tu-dependent binding of aminoacyl-tRNA to the A site of the E. coli ribosome. *EMBO J.* **17**:7490-7497.
- Pape T., Wintermeyer W. et Rodnina M. V. 2000b. Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome. *Nature Struct. Biol.* **7**:104-107.
- Parker J. 1989. Errors and alternatives in reading the universal genetic code. *Microbiol. Rev.* **53**:273-298.
- Paulsen H., Robertson J. M. et Wintermeyer W. 1983. Topological arrangement of two transfer RNAs on the ribosome. Fluorescence energy transfer measurements between A and P site-bound tRNA^{phe}. *J. Mol. Biol.* **167**:411-426.
- Pearlman D. A. 1995. AMBER 4.1. University of California, San Francisco.
- Peske F., Savelsbergh A., Katunin V. I., Rodnina M. V. et Wintermeyer W. 2004. Conformational changes of the small ribosomal subunit during elongation factor G-dependent tRNA-mRNA translocation. *J. Mol. Biol.* **343**:1183-1194.
- Piepenburg O., Pape T., Pleiss J. A., Wintermeyer W., Uhlenbeck O. C. et Rodnina M. V. 2000. Intact aminoacyl-tRNA is required to trigger GTP hydrolysis by elongation factor Tu on the ribosome. *Biochemistry* **39**:1734-1738.
- Piepersberg W., Bock A. et Wittmann H. G. 1975. Effect of different mutations in ribosomal protein S5 of Escherichia coli on translational fidelity. *Mol. Gen. Genet.* **140**:91-100.
- Pietromonaco S. F., Denslow N. D. et O'Brien T. W. 1991. Proteins of mammalian mitochondrial ribosomes. *Biochimie* **73**:827-835.

- Pinard R., Cote M., Payant C. et Brakier-Gingras L. 1994. Positions 13 and 914 in *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA are involved in the control of translational accuracy. *Nucleic Acids Res.* **22**:619-624.
- Pinard R., Payant C. et Brakier-Gingras L. 1995. Mutations at positions 13 and/or 914 in *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA interfere with the initiation of protein synthesis. *Biochemistry* **34**:9611-9616.
- Pinard R., Payant C., Melançon P. et Brakier-Gingras L. 1993. The 5' proximal helix of 16S rRNA is involved in the binding of streptomycin to the ribosome. *FASEB J.* **7**:173-176.
- Pioletti M., Schlunzen F., Harms J., Zarivach R., Gluhmann M., Avila H., Bashan A., Bartels H., Auerbach T., Jacobi C., Hartsch T., Yonath A. et Franceschi F. 2001. Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3. *EMBO J.* **20**:1829-1839.
- Pley H. W., Flaherty K. M. et McKay D. B. 1994. Model for an RNA tertiary interaction from the structure of an intermolecular complex between a GAAA tetraloop and an RNA helix. *Nature* **372**:111-113.
- Polacek N., Gaynor M., Yassin A. et Mankin A. S. 2001. Ribosomal peptidyl transferase can withstand mutations at the putative catalytic nucleotide. *Nature* **411**:498-501.
- Pomeranz Krummel D. A. et Altman S. 1999. Verification of phylogenetic predictions in vivo and the importance of the tetraloop motif in a catalytic RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**:11200-11205.
- Poole A. M., Jeffares D. C. et Penny D. 1998. The path from the RNA world. *J. Mol. Evol.* **46**:1-17.
- Poot R. A., Pleij C. W. et van Duin J. 1996. The central pseudoknot in 16S ribosomal RNA is needed for ribosome stability but is not essential for 30S initiation complex formation. *Nucleic Acids Res.* **24**:3670-3676.
- Poot R. A., van den Worm S. H., Pleij C. W. et van Duin J. 1998. Base complementarity in helix 2 of the central pseudoknot in 16S rRNA is essential for ribosome functioning. *Nucleic Acids Res.* **26**:549-553.

- Porse B. T., Kirillov S. V. et Garrett R. A. 2000. Antibiotics and the peptidyl transferase center. In: Garrett RA, Douthwaite SR, Liljas A, Matheson AT, Moore PB, Noller HF, eds. *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics and Cellular Interactions*. Washington, DC: ASM Press. pp 441-449.
- Powers T., Changchien L. M., Craven G. R. et Noller H. F. 1988a. Probing the assembly of the 3' major domain of 16 S ribosomal RNA. Quaternary interactions involving ribosomal proteins S7, S9 and S19. *J. Mol. Biol.* **200**:309-319.
- Powers T. et Noller H. F. 1994. Selective perturbation of G530 of 16 S rRNA by translational miscoding agents and a streptomycin-dependence mutation in protein S12. *J. Mol. Biol.* **235**:156-172.
- Powers T. et Noller H. F. 1995. Hydroxyl radical footprinting of ribosomal proteins on 16S rRNA. *RNA* **1**:194-209.
- Powers T., Stern S., Changchien L. M. et Noller H. F. 1988b. Probing the assembly of the 3' major domain of 16 S rRNA. Interactions involving ribosomal proteins S2, S3, S10, S13 and S14. *J. Mol. Biol.* **201**:697-716.
- Prince J. B., Taylor B. H., Thurlow D. L., Ofengand J. et Zimmermann R. A. 1982. Covalent crosslinking of tRNA¹Val to 16S RNA at the ribosomal P site: identification of crosslinked residues. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **79**:5450-5454.
- Puglisi J. D., Tan R., Calnan B. J., Frankel A. D. et Williamson J. R. 1992. Conformation of the TAR RNA-arginine complex by NMR spectroscopy. *Science* **257**:76-80.
- Pyle A. M. 2002. Metal ions in the structure and function of RNA. *J. Biol. Inorg. Chem.* **7**:679-690.
- Quigley G. J. et Rich A. 1976. Structural domains of transfer RNA molecules. *Science* **194**:796-806.
- Ramakrishnan V. 2002. Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell* **108**:557-572.
- Ramakrishnan V. et White S. W. 1998. Ribosomal protein structures: insights into the architecture, machinery and evolution of the ribosome. *Trends Biochem. Sci.* **23**:208-212.

- Rawat U. B., Zavialov A. V., Sengupta J., Valle M., Grassucci R. A., Linde J., Vestergaard B., Ehrenberg M. et Frank J. 2003. A cryo-electron microscopic study of ribosome-bound termination factor RF2. *Nature* **421**:87-90.
- Razga F., Spackova N., Reblova K., Koca J., Leontis N. B. et Sponer J. 2004. Ribosomal RNA kink-turn motif--a flexible molecular hinge. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **22**:183-194.
- Rheinberger H. J. et Nierhaus K. H. 1983. Testing an alternative model for the ribosomal peptide elongation cycle. *Proc. Natl Acad. Sci. US A* **80**:4213-4217.
- Rheinberger H. J. et Nierhaus K. H. 1986. Allosteric interactions between the ribosomal transfer RNA-binding sites A and E. *J. Biol. Chem.* **261**:9133-9139.
- Ringquist S., Shinedling S., Barrick D., Green L., Binkley J., Stormo G. D. et Gold L. 1992. Translation initiation in *Escherichia coli*: sequences within the ribosome-binding site. *Mol. Microbiol.* **6**:1219-1229.
- Rinke-Appel J., Junke N., Brimacombe R., Dukudovskaya S., Dontsova O. et Bogdanov A. 1993. Site-directed cross-linking of mRNA analogues to 16S ribosomal RNA; a complete scan of cross-links from all positions between '+1' and '+16' on the mRNA, downstream from the decoding site. *Nucleic Acids Res.* **21**:2853-2859.
- Rinke-Appel J., Junke N., Osswald M. et Brimacombe R. 1995. The ribosomal environment of tRNA: crosslinks to rRNA from positions 8 and 20:1 in the central fold of tRNA located at the A, P, or E site. *RNA* **1**:1018-1028.
- Robert F. et Brakier-Gingras L. 2003. A functional interaction between ribosomal proteins S7 and S11 within the bacterial ribosome. *J. Biol. Chem.* **278**:44913-44920.
- Roberts L. O. et Belsham G. J. 1997. Complementation of defective picornavirus internal ribosome entry site (IRES) elements by the coexpression of fragments of the IRES. *Virology* **227**:53-62.
- Robertson M. E., Seamons R. A. et Belsham G. J. 1999. A selection system for functional internal ribosome entry site (IRES) elements: analysis of the requirement for a conserved GNRA tetraloop in the encephalomyocarditis virus IRES. *Rna* **5**:1167-1179.

- Rodnina M. V., Gromadski K. B., Kothe U. et Wieden H. J. 2005. Recognition and selection of tRNA in translation. *FEBS Lett* **579**:938-942.
- Rodnina M. V., Savelsbergh A., Katunin V. I. et Wintermeyer W. 1997. Hydrolysis of GTP by elongation factor G drives tRNA movement on the ribosome. *Nature* **385**:37-41.
- Rodnina M. V. et Wintermeyer W. 2001. Fidelity of aminoacyl-tRNA selection on the ribosome: kinetic and structural mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* **70**:415-435.
- Rodriguez-Correa D. et Dahlberg A. E. 2004. Genetic evidence against the 16S ribosomal RNA helix 27 conformational switch model. *RNA* **10**:28-33.
- Ron E. Z., Kohler R. E. et Davis B. D. 1966. Polysomes extracted from *Escherichia coli* by freeze-thaw-lysozyme lysis. *Science* **153**:1119-1120.
- Rozenski J., Crain P. F. et McCloskey J. A. 1999. The RNA Modification Database: 1999 update. *Nucleic Acids Res.* **27**:196-197.
- Ruusala T., Ehrenberg M. et Kurland C. G. 1982. Is there proofreading during polypeptide synthesis? *EMBO J.* **1**:741-745.
- Saarma U., Remme J., Ehrenberg M. et Bilgin N. 1997. An A to U transversion at position 1067 of 23 S rRNA from *Escherichia coli* impairs EF-Tu and EF-G function. *J. Mol. Biol.* **272**:327-335.
- Samaha R. R., Green R. et Noller H. F. 1995. A base pair between tRNA and 23S rRNA in the peptidyl transferase centre of the ribosome. *Nature* **377**:309-314.
- Savelsbergh A., Katunin V. I., Mohr D., Peske F., Rodnina M. V. et Wintermeyer W. 2003. An elongation factor G-induced ribosome rearrangement precedes tRNA-mRNA translocation. *Mol. Cell* **11**:1517-1523.
- Scheinman A., Atha T., Aguinaldo A. M., Kahan L., Shankweiler G. et Lake J. A. 1992. Mapping the three-dimensional locations of ribosomal RNA and proteins. *Biochimie* **74**:307-317.
- Schlutzen F., Tocilj A., Zarivach R., Harms J., Gluehmann M., Janell D., Bashan A., Bartels H., Agmon I., Franceschi F. et Yonath A. 2000. Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution. *Cell* **102**:615-623.

- Schluenzen F., Zarivach R., Harms J., Bashan A., Tocilj A., Albrecht R., Yonath A. et Franceschi F. 2001. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. *Nature* **413**:814-821.
- Schroeder R., Waldsich C. et Wank H. 2000. Modulation of RNA function by aminoglycoside antibiotics. *EMBO J.* **19**:1-9.
- Schwedler G., Albrecht-Ehrlich R. et Rak K. H. 1993. Immunoelectron microscopic localization of ribosomal proteins BS8, BS9, BS20, BL3 and BL21 on the surface of 30S and 50S subunits from *Bacillus stearothermophilus*. *Eur. J. Biochem.* **217**:361-369.
- Selinger D., Liao X. et Wise J. A. 1993. Functional interchangeability of the structurally similar tetranucleotide loops GAAA and UUCG in fission yeast signal recognition particle RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* **90**:5409-5413.
- Sengupta J., Agrawal R. K. et Frank J. 2001. Visualization of protein S1 within the 30S ribosomal subunit and its interaction with messenger RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* **98**:11991-11996.
- Sergiev P., Leonov A., Dokudovskaya S., Shpanchenko O., Dontsova O., Bogdanov A., Rinke-Appel J., Mueller F., Osswald M., von Knoblauch K. et Brimacombe R. 2001. Correlating the X-ray structures for halo- and thermophilic ribosomal subunits with biochemical data for the *Escherichia coli* ribosome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **66**:87-100.
- Sergiev P. V., Lavrik I. N., Wlasoff V. A., Dokudovskaya S. S., Dontsova O. A., Bogdanov A. A. et Brimacombe R. 1997. The path of mRNA through the bacterial ribosome: a site-directed crosslinking study using new photoreactive derivatives of guanosine and uridine. *RNA* **3**:464-475.
- Shine J. et Dalgarno L. 1974. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* **71**:1342-1346.
- Sievers A., Beringer M., Rodnina M. V. et Wolfenden R. 2004. The ribosome as an entropy trap. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* **101**:7897-7901.

- Sigmund C. D., Ettayebi M., Borden A. et Morgan E. A. 1988. Antibiotic resistance mutations in ribosomal RNA genes of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **164**:673-690.
- Southworth D. R., Brunelle J. L. et Green R. 2002. EFG-independent translocation of the mRNA:tRNA complex is promoted by modification of the ribosome with thiol-specific reagents. *J. Mol. Biol.* **324**:611-623.
- Spahn C. M., Beckmann R., Eswar N., Penczek P. A., Sali A., Blobel G. et Frank J. 2001. Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell* **107**:373-386.
- Spahn C. M., Grassucci R. A., Penczek P. et Frank J. 1999. Direct three-dimensional localization and positive identification of RNA helices within the ribosome by means of genetic tagging and cryo-electron microscopy. *Structure Fold. Des.* **7**:1567-1573.
- Spahn C. M. et Nierhaus K. H. 1998. Models of the elongation cycle: an evaluation. *Biol. Chem.* **379**:753-772.
- Spahn C. M. et Prescott C. D. 1996. Throwing a spanner in the works: antibiotics and the translation apparatus. *J. Mol. Med.* **74**:423-439.
- Spierer P. et Zimmermann R. A. 1976. RNA-protein interactions in the ribosome. Binding of proteins L1, L3, L6, L13 and L23 to specific fragments of the 23S RNA. *FEBS Lett* **68**:71-75.
- Sprengart M. L., Fatscher H. P. et Fuchs E. 1990. The initiation of translation in *E. coli*: apparent base pairing between the 16srRNA and downstream sequences of the mRNA. *Nucleic Acids Res.* **18**:1719-1723.
- Stark H., Mueller F., Orlova E. V., Schatz M., Dube P., Erdemir T., Zemlin F., Brimacombe R. et van Heel M. 1995. The 70S *Escherichia coli* ribosome at 23 Å resolution: fitting the ribosomal RNA. *Structure* **3**:815-821.
- Stark H., Orlova E. V., Rinke-Appel J., Junke N., Mueller F., Rodnina M., Wintermeyer W., Brimacombe R. et van Heel M. 1997a. Arrangement of tRNAs in pre- and posttranslocational ribosomes revealed by electron cryomicroscopy. *Cell* **88**:19-28.

- Stark H., Rodnina M. V., Rinke-Appel J., Brimacombe R., Wintermeyer W. et van Heel M. 1997b. Visualization of elongation factor Tu on the Escherichia coli ribosome. *Nature* **389**:403-406.
- Stark H., Rodnina M. V., Wieden H. J., Zemlin F., Wintermeyer W. et van Heel M. 2002. Ribosome interactions of aminoacyl-tRNA and elongation factor Tu in the codon-recognition complex. *Nature Struct. Biol.* **9**:849-854.
- Stark M. J., Gregory R. J., Gourse R. L., Thurlow D. L., Zwieb C., Zimmermann R. A. et Dahlberg A. E. 1984. Effects of site-directed mutations in the central domain of 16 S ribosomal RNA upon ribosomal protein binding, RNA processing and 30 S subunit assembly. *J. Mol. Biol.* **178**:303-322.
- Steitz J. A. et Jakes K. 1975. How ribosomes select initiator regions in mRNA: base pair formation between the 3' terminus of 16S rRNA and the mRNA during initiation of protein synthesis in Escherichia coli. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **72**:4734-4738.
- Steitz T. A. 2005. On the structural basis of peptide-bond formation and antibiotic resistance from atomic structures of the large ribosomal subunit. *FEBS Lett* **579**:955-958.
- Stern S., Changchien L. M., Craven G. R. et Noller H. F. 1988a. Interaction of proteins S16, S17 and S20 with 16 S ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* **200**:291-299.
- Stern S., Powers T., Changchien L. M. et Noller H. F. 1988b. Interaction of ribosomal proteins S5, S6, S11, S12, S18 and S21 with 16 S rRNA. *J. Mol. Biol.* **201**:683-695.
- Stoffler-Meilicke M. et Stoffler G. 1987. The topography of ribosomal proteins on the surface of the 30S subunit of Escherichia coli. *Biochimie* **69**:1049-1064.
- Studer S. M., Feinberg J. S. et Joseph S. 2003. Rapid kinetic analysis of EF-G-dependent mRNA translocation in the ribosome. *J Mol Biol* **327**:369-381.
- Subramanian A. R. 1983. Structure and functions of ribosomal protein S1. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* **28**:101-142.
- Sussman J. L., Holbrook S. R., Warrant R. W., Church G. M. et Kim S. H. 1978. Crystal structure of yeast phenylalanine transfer RNA. I. Crystallographic refinement. *J Mol Biol* **123**:607-630.

- Svensson P., Changchien L. M., Craven G. R. et Noller H. F. 1988. Interaction of ribosomal proteins, S6, S8, S15 and S18 with the central domain of 16 S ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* **200**:301-308.
- Svergun D. I., Koch M. H., Pedersen J. S. et Serdyuk I. N. 1996. Structural model of the 50S subunit of E. coli ribosomes from solution scattering. *Basic Life. Sci.* **64**:149-174.
- Szewczak A. A. et Moore P. B. 1995. The sarcin/ricin loop, a modular RNA. *J. Mol. Biol.* **247**:81-98.
- Szewczak A. A., Moore P. B., Chang Y. L. et Wool I. G. 1993. The conformation of the sarcin/ricin loop from 28S ribosomal RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* **90**:9581-9585.
- Takyar S., Hickerson R. P. et Noller H. F. 2005. mRNA helicase activity of the ribosome. *Cell* **120**:49-58.
- Tama F., Valle M., Frank J. et Brooks C. L., 3rd. 2003. Dynamic reorganization of the functionally active ribosome explored by normal mode analysis and cryo-electron microscopy. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* **100**:9319-9323.
- Tapio S. et Isaksson L. A. 1991. Base 2661 in Escherichia coli 23S rRNA influences the binding of elongation factor Tu during protein synthesis in vivo. *Eur. J. Biochem.* **202**:981-984.
- Tapprich W. E. et Dahlberg A. E. 1990. A single base mutation at position 2661 in E. coli 23S ribosomal RNA affects the binding of ternary complex to the ribosome. *EMBO J.* **9**:2649-2655.
- Thompson J., Kim D. F., O'Connor M., Lieberman K. R., Bayfield M. A., Gregory S. T., Green R., Noller H. F. et Dahlberg A. E. 2001. Analysis of mutations at residues A2451 and G2447 of 23S rRNA in the peptidyltransferase active site of the 50S ribosomal subunit. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* **98**:9002-9007.
- Thompson R. C. et Stone P. J. 1977. Proofreading of the codon-anticodon interaction on ribosomes. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* **74**:198-202.

- Tomsic J., Vitali L. A., Daviter T., Savelsbergh A., Spurio R., Striebeck P., Wintermeyer W., Rodnina M. V. et Gualerzi C. O. 2000. Late events of translation initiation in bacteria: a kinetic analysis. *EMBO J.* **19**:2127-2136.
- Traut R. R., Dey D., Bochkariov D. E., Oleinikov A. V., Jokhadze G. G., Hamman B. et Jameson D. 1995. Location and domain structure of Escherichia coli ribosomal protein L7/L12: site specific cysteine crosslinking and attachment of fluorescent probes. *Biochem. Cell Biol.* **73**:949-958.
- Triman K. L. 1995. Mutational analysis of 16S ribosomal RNA structure and function in Escherichia coli. *Adv. Genet.* **33**:1-39.
- Triman K. L., Peister A. et Goel R. A. 1998. Expanded versions of the 16S and 23S ribosomal RNA mutation databases (16SMDBexp and 23SMDBexp). *Nucleic Acids Res.* **26**:280-284.
- Tzareva N. V., Makhno V. I. et Boni I. V. 1994. Ribosome-messenger recognition in the absence of the Shine-Dalgarno interactions. *FEBS Lett* **337**:189-194.
- Valle M., Sengupta J., Swami N. K., Grassucci R. A., Burkhardt N., Nierhaus K. H., Agrawal R. K. et Frank J. 2002. Cryo-EM reveals an active role for aminoacyl-tRNA in the accommodation process. *EMBO J.* **21**:3557-3567.
- Valle M., Zavialov A., Li W., Stagg S. M., Sengupta J., Nielsen R. C., Nissen P., Harvey S. C., Ehrenberg M. et Frank J. 2003a. Incorporation of aminoacyl-tRNA into the ribosome as seen by cryo-electron microscopy. *Nature Struct. Biol.* **10**:899-906.
- Valle M., Zavialov A., Sengupta J., Rawat U., Ehrenberg M. et Frank J. 2003b. Locking and unlocking of ribosomal motions. *Cell* **114**:123-134.
- van Heel M. 2000. Unveiling ribosomal structures: the final phases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**:259-264.
- VanLoock M. S., Agrawal R. K., Gabashvili I. S., Qi L., Frank J. et Harvey S. C. 2000. Movement of the decoding region of the 16 S ribosomal RNA accompanies tRNA translocation. *J. Mol. Biol.* **304**:507-515.
- Velichutina I. V., Dresios J., Hong J. Y., Li C., Mankin A., Synetos D. et Liebman S. W. 2000. Mutations in helix 27 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* 18S rRNA affect the function of the decoding center of the ribosome. *RNA* **6**:1174-1184.

- Vila-Sanjurjo A. et Dahlberg A. E. 2001. Mutational analysis of the conserved bases C1402 and A1500 in the center of the decoding domain of *Escherichia coli* 16 S rRNA reveals an important tertiary interaction. *J. Mol. Biol.* **308**:457-463.
- Vila-Sanjurjo A., Ridgeway W. K., Seymaner V., Zhang W., Santoso S., Yu K. et Cate J. H. 2003. X-ray crystal structures of the WT and a hyper-accurate ribosome from *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**:8682-8687.
- Viviani V. R., Uchida A., Viviani W. et Ohmiya Y. 2002. The influence of Ala243 (Gly247), Arg215 and Thr226 (Asn230) on the bioluminescence spectra and pH-sensitivity of railroad worm, click beetle and firefly luciferases. *Photochem. Photobiol.* **76**:538-544.
- von Ahsen U., Davies J. et Schroeder R. 1991. Antibiotic inhibition of group I ribozyme function. *Nature* **353**:368-370.
- von Bohlen K., Makowski I., Hansen H. A., Bartels H., Berkovitch-Yellin Z., Zaytzev-Bashan A., Meyer S., Paulke C., Franceschi F. et Yonath A. 1991. Characterization and preliminary attempts for derivatization of crystals of large ribosomal subunits from *Haloarcula marismortui* diffracting to 3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **222**:11-15.
- Wallace B. J., Tai P.-C. et Davis B. D. 1979. Streptomycin and related antibiotics. In: Hahn FE, ed. *Mechanism of Action of Antibacterial Agents*. Berlin Heidelberg New-York: Springer-Verlag. pp 272-303.
- Ware V. C., Tague B. W., Clark C. G., Gourse R. L., Brand R. C. et Gerbi S. A. 1983. Sequence analysis of 28S ribosomal DNA from the amphibian *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Res.* **11**:7795-7817.
- Weber A. L. et Orgel L. E. 1979. The formation of dipeptides from amino acids and the 2'(3')-glycyl ester of an adenylate. *J. Mol. Evol.* **13**:185-192.
- Weinger J. S., Parnell K. M., Dorner S., Green R. et Strobel S. A. 2004. Substrate-assisted catalysis of peptide bond formation by the ribosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**:1101-1106.
- Westhof E. et Fritsch V. 2000. RNA folding: beyond Watson-Crick pairs. *Structure Fold. Des.* **8**:R55-65.

- White S. A., Nilges M., Huang A., Brunger A. T. et Moore P. B. 1992. NMR analysis of helix I from the 5S RNA of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **31**:1610-1621.
- Williamson J. R. 2003. After the ribosome structures: how are the subunits assembled? *RNA* **9**:165-167.
- Wimberly B., Varani G. et Tinoco I., Jr. 1993. The conformation of loop E of eukaryotic 5S ribosomal RNA. *Biochemistry* **32**:1078-1087.
- Wimberly B. T., Brodersen D. E., Clemons W. M., Jr., Morgan-Warren R. J., Carter A. P., Vornrhein C., Hartsch T. et Ramakrishnan V. 2000. Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407**:327-339.
- Wimberly B. T., Guymon R., McCutcheon J. P., White S. W. et Ramakrishnan V. 1999. A detailed view of a ribosomal active site: the structure of the L11-RNA complex. *Cell* **97**:491-502.
- Wishnia A., Boussert A., Graffe M., Dessen P. H. et Grunberg-Manago M. 1975. Kinetics of the reversible association of ribosomal subunits: stopped-flow studies of the rate law and of the effect of Mg^{2+} . *J. Mol. Biol.* **93**:499-415.
- Wishnia A. et Boussert A. S. 1977. The non-specific role of Mg^{2+} in ribosomal subunit association: kinetics and equilibrium in the presence of other divalent metal ions. *J. Mol. Biol.* **116**:577-591.
- Woese C. R., Gutell R., Gupta R. et Noller H. F. 1983. Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.* **47**:621-669.
- Woese C. R., Winker S. et Gutell R. R. 1990. Architecture of ribosomal RNA: constraints on the sequence of "tetra-loops". *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **87**:8467-8471.
- Yarus M. et Smith D. 1995. tRNA on the ribosome: a waggle theory. In: Söll D, RajBhandary U, eds. *tRNA: Structure, Biosynthesis and Function*. Washington, DC: American Society for Microbiology. pp 443-468.
- Yonath A. et Bashan A. 2004. Ribosomal Crystallography: Initiation, Peptide Bond Formation, and Amino Acid Polymerization are Hampered by Antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.*

- Yonath A., Mussig J., Tesche B., Lorenz S., Erdmann V. A. et Wittmann H. G. 1980. Crystallization of the large ribosomal subunits from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochem. Int.* 1:428-435.
- Yoshizawa S., Fourmy D. et Puglisi J. D. 1999. Recognition of the codon-anticodon helix by ribosomal RNA. *Science* 285:1722-1725.
- Youngman E. M., Brunelle J. L., Kochaniak A. B. et Green R. 2004. The active site of the ribosome is composed of two layers of conserved nucleotides with distinct roles in peptide bond formation and peptide release. *Cell* 117:589-599.
- Yusupov M. M., Yusupova G. Z., Baucom A., Lieberman K., Earnest T. N., Cate J. H. et Noller H. F. 2001. Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. *Science* 292:883-896.
- Yusupova G. Z., Yusupov M. M., Cate J. H. et Noller H. F. 2001. The path of messenger RNA through the ribosome. *Cell* 106:233-241.
- Zavialov A. V., Buckingham R. H. et Ehrenberg M. 2001. A posttermination ribosomal complex is the guanine nucleotide exchange factor for peptide release factor RF3. *Cell* 107:115-124.
- Zavialov A. V. et Ehrenberg M. 2003. Peptidyl-tRNA regulates the GTPase activity of translation factors. *Cell* 114:113-122.
- Zhang B. et Cech T. R. 1997. Peptide bond formation by in vitro selected ribozymes. *Nature* 390:96-100.
- Zimmermann R. A., Garvin R. T. et Gorini L. 1971. Alteration of a 30S ribosomal protein accompanying the ram mutation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 68:2263-2267.
- Zylicz Z., Hofs H. P., Wagener D. J., Van Rennes H., Wessels J. M., van den Broek L. A. et Ottenheijm H. C. 1989. Modulation of the in vitro cytotoxicity of seven anticancer drugs by protein synthesis inhibition using sparsomycin. *Anticancer Res* 9:1835-1840.

