

# Etude du complexe sRNP H/ACA de *Pyrococcus abyssi*

## Table des matières

Introduction .....	2
But .....	2
L'Etude .....	2
Les Données .....	2
Méthode : Comparaison et superposition de structure .....	3
<i>RMSD</i> .....	3
Etude des changements conformationnels .....	4
Changements conformationnels de la protéine.....	4
Changements conformationnels des domaines protéiques .....	4
Conclusion .....	5
Analyse des changements conformationnels locaux .....	5
Méthode .....	5
<i>Matrice de distance</i> .....	5
<i>Fréquence d'appartenance à l'interface protéine/ARN</i> .....	7
<i>Temps de contact entre résidus</i> .....	7
Résultats .....	8
Conclusion et Perspective .....	9

## Introduction

La pseudouridylation est la modification post-transcriptionnelle la plus fréquente dans les ARN, et on la retrouve chez l'ensemble des organismes vivants. Il s'agit de l'isomérisation d'un résidu uridine (U) en pseudouridine ( $\Psi$ ). Par rapport à U,  $\Psi$  possède un groupe NH supplémentaire capable de former une liaison hydrogène, ce qui augmente la rigidité du squelette phospho-ribose et donc stabilise la structure ARN. La réaction d'isomérisation peut être catalysée par un complexe ribonucléique (sRNP H/ACA) qui permet l'interaction entre un sRNA à boîte H/ACA et un ARN cible. Ce complexe RNP est constitué de 5 domaines (aCBF5, PUA, aGAR1, aNOP10 et L7Ae) et reconnaît le sRNA par son motif K-turn.

Ainsi le sRNA sert de guide et se lie par complémentarité à l'ARN cible à modifier, permettant de cibler le U à isomériser. La littérature montre que L7Ae reconnaît spécifiquement le motif K-turn du sRNA et que l'activité enzymatique ARN-pseudouridylation est portée par aCBF5.

## But

On veut ici créer un programme qui nous permettra

1. De comprendre le rôle de chacun des domaines dans l'interaction avec l'ARN.
2. Mesurer la flexibilité des différents domaines de la protéine lors de l'interaction avec l'ARN.
3. D'identifier les résidus de chaque domaine de la protéine jouant un rôle clé dans l'interaction avec l'ARN.

Le *flow-chart* du projet est disponible en Annexe 1.

## L'Etude

### Les Données

Le projet porte sur l'étude du complexe sRNP H/ACA chez l'archée *Pyrococcus abyssi*. Nous disposons de deux fichiers PDB contenant la structure de 4 domaines protéiques et du sRNA chez un individu sauvage. Ces fichiers sont visualisables sous PyMol (Figure 1).

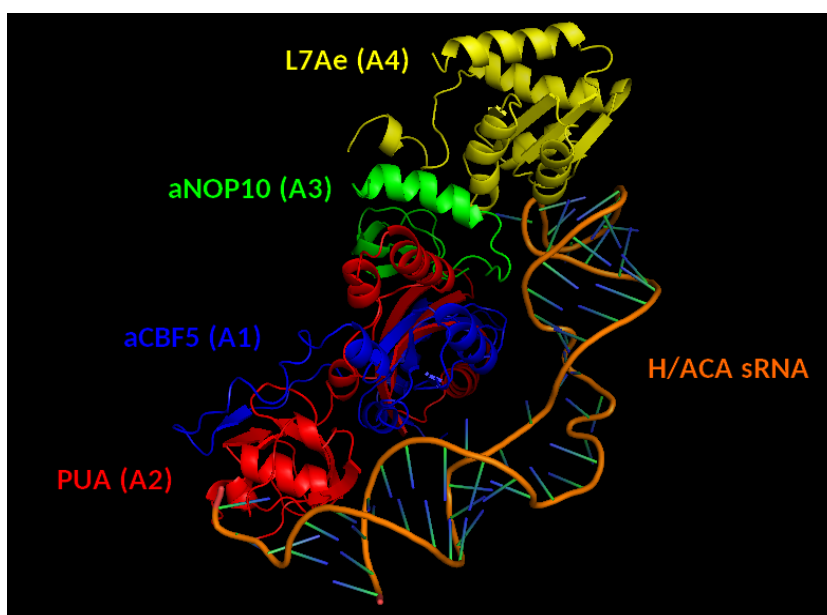


Figure 1: Structure du complexe visualisée sous PyMol.

Chaque domaine est représenté par une couleur différente. Entre parenthèses figurent les identifiants des domaines dans les fichiers PDB fournis.

Le premier fichier contient la structure de référence du complexe protéine-sRNA.

Le second contient 500 conformations de ce complexe issues d'une dynamique moléculaire de 10ns.

Les temps de contact entre plusieurs résidus de la protéine et certains résidus de la protéine avec l'ARN ont été mesurés au cours d'une dynamique moléculaire avec un mutant. Ainsi des résidus clé ont été identifiés. Nous allons mesurer le temps de contact entre ces résidus chez le sauvage.

### Méthode : Comparaison et superposition de structure

On estime ici l'importance de certains résidus dans la structure (en terme de stabilité ou de mutabilité) si on compare la même structure au cours du temps (ici 10ns pour voir les différents changements de conformation globale ou locale).

Pour cela on calcul l'écart quadratique moyen global des distances entre les atomes en correspondance dans 2 structures.

#### RMSD

Le RMSD (*Root Mean Square Deviation*) est une mesure en Angström (Å) rendant compte de la déviation structurale entre deux structures protéiques alignées. Plus le RMSD est petit, plus les structures protéiques se ressemblent. Le RMSD se calcule sur des paires d'atomes (un atome de la structure 1 et l'atome correspondant de la structure 2) :

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \delta_i^2}$$

avec N le nombre total de paires d'atomes utilisées pour le calcul, et  $\delta_i$  la distance spatiale séparant les deux atomes d'une paire i.

La signification du RMSD dépend de la taille des protéines mais ici on regarde l'évolution d'une seule protéine. La valeur du RMSD dépend du choix des atomes (dans ce cas, il est calculé par rapport aux centres de masse, mais il est possible de choisir le carbone alpha des résidus comme point de référence dans le programme).

Les structures sont considérées comme identiques si le RMSD est égal à 0 et distantes pour un RMSD supérieur à 4 Å.

## Etude des changements conformationnels

### Changements conformationnels de la protéine

Les résultats numériques sont disponibles dans le fichier 'rmsd.txt'.

Le RMSD global de la protéine a été calculé entre chacune des 500 conformations de la dynamique et la structure de référence (Figure 2).

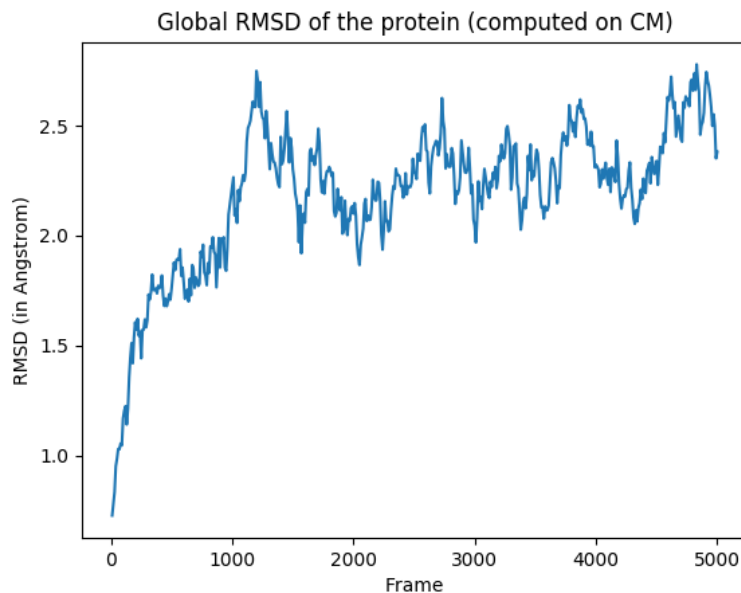


Figure 2: RMSD Global.

RMSD de la protéine calculé sur les centres de masse des résidus, au cours du temps. Chaque frame, numérotée de 10 à 5000 par pas de 10, correspond à une conformation de la dynamique.

On observe une augmentation progressive du RMSD pour atteindre un plateau entre 2 et 2.5 Å aux alentours de la 100<sup>e</sup> conformation (frame 1000). Des changements conformationnels par rapport à la structure de référence sont donc détectés au cours de la dynamique moléculaire. Bien que l'on observe un pic à plus de 2.5 Å, le RMSD ne varie que peu au cours de la dynamique. Dans son ensemble la protéine ne subit donc que peu de modifications au cours du temps.

### Changements conformationnels des domaines protéiques

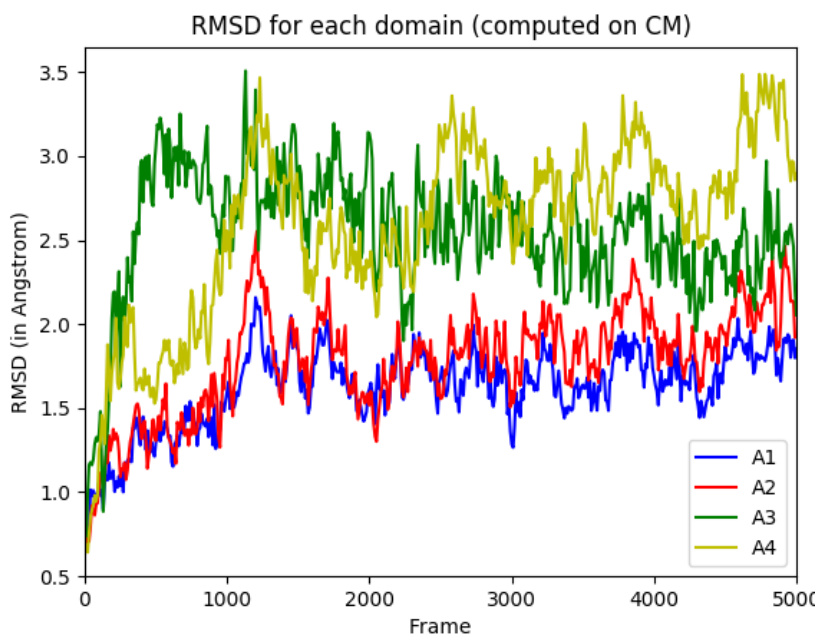


Figure 3: RMSD par domaine du complexe sRNP.

RMSD calculé sur les centres de masse des résidus pour chaque domaine au cours du temps. Bleu : aCBF5 (A1). Rouge : PUA (A2). Vert : aNOP10 (A3). Jaune : L7Ae (A4).

Le RMSD a été calculé pour chacun des 4 domaines protéiques A1, A2, A3 et A4 (Figure 3)

Pour les 4 domaines, on observe une augmentation progressive du RMSD jusqu'à un palier. Ce qui est cohérent avec le RMSD global (Figure 2) : des changements de conformation progressifs jusqu'à une « stabilisation » de la conformation.

On remarque que les domaines A1 (aCBF5) et A2 (PUA) varient de la même façon (ce qui est cohérent avec le fait qu'ils sont associés), avec un RMSD moyen à environ 1.8 Å, et subissent moins de changements conformationnels que les domaines A3 (aNOP10) et A4 (L7Ae) dont le RMSD moyen est environ de 2.5 Å.

Les domaines aCBF5 et PUA varient de concert et sont moins « flexibles » que les deux autres domaines. Ceci est en accord avec la littérature où PUA est considéré comme faisant partie du domaine aCBF5 et jouant un rôle dans la stabilité de aCBF5.

Au début de la dynamique, le domaine A3 (aNOP10) subit le plus de changements conformationnels, à la fin il s'agit de A4 (L7Ae).

Les domaines les plus « flexibles » sont ceux qui interagissent le plus avec le sRNA.

## Conclusion

Nous avons ici observé les résultats de sortie du programme permettant d'étudier si la protéine subit des changements conformationnels majeurs en solution via l'évolution au cours du temps du RMSD.

Ces résultats permettent de dire que la structure du complexe en solution est très proche de la structure de référence. Elle peut donc servir de base d'étude pour évaluer l'impact de mutations sur le complexe en solution.

De plus nous avons pu observer que chaque domaine de la protéine a sa propre évolution conformationnelle au cours du temps. On peut donc supposer que chaque domaine est nécessaire à l'activité du complexe. Ce qui peut être confirmé via des mutations spécifiques et une étude du RMSD résultant et de l'activité enzymatique de aCBF5.

## Analyse des changements conformationnels locaux

### Méthode

#### Matrice de distance

Dans un premier temps, nous avons voulu visualiser les distances entre les résidus de la protéine et les résidus de l'ARN dans la structure de référence. Ainsi, pour chaque domaine, nous avons calculé une matrice de distance : pour chaque résidu du domaine protéique, sa distance à tous les résidus de l'ARN est calculée. Les calculs de distance ont été réalisés entre les centres de masse des résidus, mais le programme permet de choisir le mode de calcul (centre de masse ou distance minimale entre les atomes des deux molécules).

Les matrices de distances ont ensuite été représentées sous forme de *heatmaps*. La Figure 4 montre les distances entre les résidus du domaine A3 et l'ARN. Les *heatmaps* des autres domaines figurent en Annexe 2.

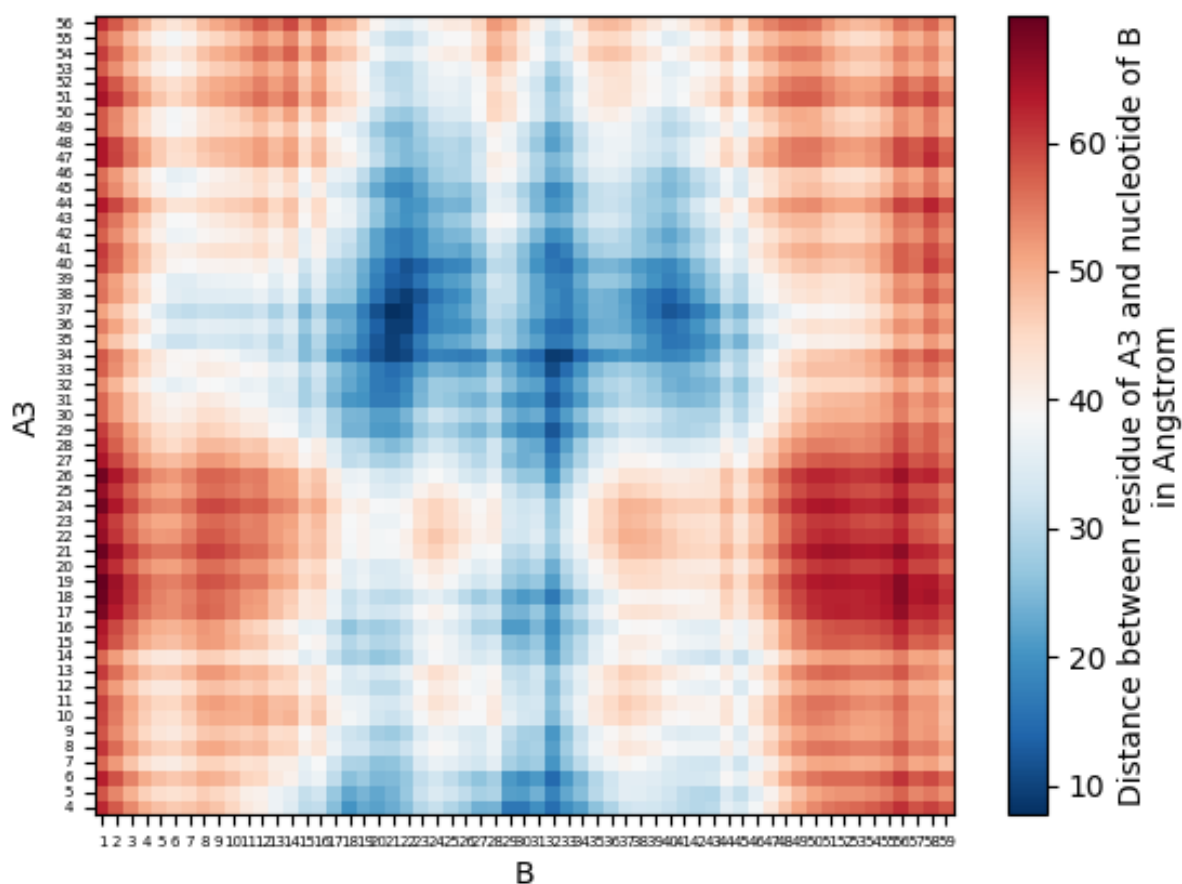


Figure 4 : Matrice des distances entre les résidus de aNOP10 (A3) et l'ARN (B). Les zones bleu foncé indiquent les résidus proches (distance inférieure à 10 Å).

Les résidus 34 à 38 de aNOP10 semblent proches des résidus 21 et 22 de l'ARN. Ce qui est confirmé grâce à une visualisation des résidus sous PyMol (Figure 5).

On peut ainsi regarder la position de chaque résidu des différents domaines et vérifier leur appartenance à des zones clé dans l'interaction avec l'ARN.



Figure 5 : Représentation en 3D des résidus 34 à 38 (en rouge) du domaine A3 et des résidus 21 et 22 (en cyan) de l'ARN.

### Fréquence d'appartenance à l'interface protéine/ARN

Dans un second temps, nous avons calculé les fréquences d'appartenance à l'interface protéine/ARN de chacun des résidus protéiques au cours de la dynamique moléculaire. Les résidus dont la fréquence est non-nulle figurent dans le fichier 'interfaceFreq.txt'.

1. Soit N le nombre de fois qu'un résidu appartient à l'interface protéine/ARN (au maximum N=500).
  - a. Pour chaque conformation, on calcule pour un résidu sa distance par rapport à tous les nucléotides de l'ARN. On garde la plus petite distance entre ce résidu et un nucléotide.
  - b. Si cette distance est inférieure à un seuil fixé par l'utilisateur (par défaut, seuil = 9.0 Å) alors on incrémente N de 1.
2. Une fois toutes les conformations parcourues, la fréquence d'appartenance est calculée :

$$f = \frac{N}{\text{nombre total de conformations}}.$$

En modifiant le champ B-factor dans le fichier PDB, on peut visualiser avec PyMol les résidus appartenant à l'interface (Figure 6).



Figure 6 : Résidus appartenant à l'interface avec l'ARN pour la première conformation, en rouge. Visualisation sous PyMol.

### Temps de contact entre résidus

Enfin nous avons calculé les temps de contacts entre différentes paires de résidus clé. En effet, en amont de ce projet, une dynamique moléculaire de 10ns a été réalisée chez un mutant connu pour altérer l'activité du complexe. Les temps de contact entre plusieurs résidus de la protéine et certains résidus de la protéine avec l'ARN ont été mesurés au cours de cette dynamique, ce qui a permis d'identifier des résidus jouant un rôle clé dans l'interaction avec l'ARN (Annexe 4).

Pour chaque paire de résidus choisies, nous avons calculé le nombre de conformations pour lesquelles les résidus sont en contact, c'est-à-dire pour lesquelles la distance entre les centres de masse des molécules est inférieure à 9.0 Å. Le temps de contact T est alors donné par la formule :

$$T = \frac{\text{nombre de conformations en contact}}{\text{nombre total de conformations}} \times \text{duree de la dynamique}$$



## Résultats

Nous avons choisi de calculer les temps de contacts pour les paires de résidus suivantes :

L7Ae 41 – ARN 32      L7Ae 100 – ARN 31      L7Ae 46 – ARN 25      aNOP10 34 – ARN 33  
aNOP10 6 – L7Ae 63      L7Ae 66 – aNOP10 41      L7Ae 98 – ARN 30      aNOP10 26 – L7Ae 65

Les résultats numériques sont disponibles dans le fichier 'contacts.txt'.

**Tableau 1: Temps de contact pour les résidus clé chez le complexe sauvage**

Couple de résidus étudié	D'après l'Annexe 4			Sorties du programme	
	% de liaison chez le sauvage	% de liaison chez le mutant	Effet de la mutation	Temps de contact chez le sauvage (ns) – Seuil = 9.0 Å (CM)	Temps de contact chez le sauvage (ns) – Seuil = 2.0 Å (distance minimale entre atomes)
<b>L7Ae 41 – ARN 32</b>	100	100	Pas d'effet	10 (100%)	9.78 (97.8%)
<b>L7Ae 100 – ARN 31</b>	1	2	Renforcement de la liaison	10 (100%)	2.94 (29.4%)
<b>L7Ae 46 – ARN 25</b>	/	10	Création d'une nouvelle liaison	9.88 (98.8%)	3.22 (32.2%)
<b>aNOP10 34 – ARN 33</b>	14	20	Renforcement de la liaison	0 (0%)	3.76 (37.6%)
<b>aNOP10 6 – L7Ae 63</b>	35	49	Renforcement de la liaison	9.72 (97.2%)	9.78 (97.8%)
<b>L7Ae 66 – aNOP10 41</b>	/	5	Création d'une nouvelle liaison	6.8 (68%)	0.0 (0%)
<b>L7Ae 98 – ARN 30</b>	1	>1	Affaiblissement de la liaison	9.7 (97%)	3.86 (38.6%)
<b>aNOP10 26 – L7Ae 65</b>	15	6	Affaiblissement de la liaison	8.28 (82.8%)	5.84 (58.4%)

Selon le mode de calcul des distances et le seuil choisis, les résultats sont différents. Le calcul sur les distances minimales entre atomes donne des temps de contact plus proches de ceux de l'Annexe 4. Il est plus logique de choisir ce mode de calcul puisque les interactions se font au niveau d'interfaces électrostatiques et/ou hydrophobiques, donc à la périphérie des résidus.

Quelle que soit la méthode choisie, les résidus L7Ae 41 et ARN 32 (1ère ligne du tableau) sont en contact pendant toute la durée de la dynamique, ou presque. Les mutations altérant l'activité de aCBF5 ne semblent pas affecter ce contact (colonnes 2 et 3), on peut donc en déduire que ces résidus ne jouent pas un rôle primordial pour le maintien de l'activité enzymatique. Avec la distance minimale entre atomes, on retrouve pour le couple L7Ae 66 - aNOP10 41 un temps de contact nul chez le sauvage. Pour toutes les autres paires de résidus, les temps de contact que nous avons calculés sont supérieurs à ceux donnés pour le sauvage dans l'Annexe 4. Ce peut être dû à des différences de méthode de calcul de l'interface, à des choix de seuils différents, ainsi qu'à des durées de dynamiques différentes.

## Conclusion et perspective

L'étude menée ici permet de voir que chaque domaine doit maintenir une certaine intégrité et qu'ils sont tous peu flexibles. On peut donc penser que le complexe peut devenir « inefficace » facilement. En effet, le sRNA doit s'apparier par complémentarité avec l'ARN cible (le plus souvent ribosomal) dans une poche créée via l'interaction de chaque domaine de la protéine, si le sRNA est détecté. Pour que l'ARN se fixe à L7Ae il faut que celui-ci subisse de faibles changements de conformation car la poche de fixation du nucléotide U visé existe avant la fixation du sRNA donc trop de changements entraînent un dérèglement de cette poche et affectent l'activité catalytique de aCBF5 car il ne peut fixer le substrat.

L'intégrité de L7Ae semble donc primordiale car c'est le domaine qui reconnaît spécifiquement le motif K-turn du sRNA.

Nous pouvons, avec la méthode explicitée ici, analyser différentes mutations du complexe afin de mettre en évidence les domaines nécessaires (et plus précisément les résidus clés) au maintien de l'activité catalytique du complexe sRNP H/ACA.

Avec le programme élaboré nous pourrions donc mettre en œuvre une étude plus poussée des mutations menant à un défaut d'activité du complexe sRNP H/ACA et mieux définir le rôle de chaque domaine.

## Annexes

**Annexe 1 :** *Flow-chart* du projet.

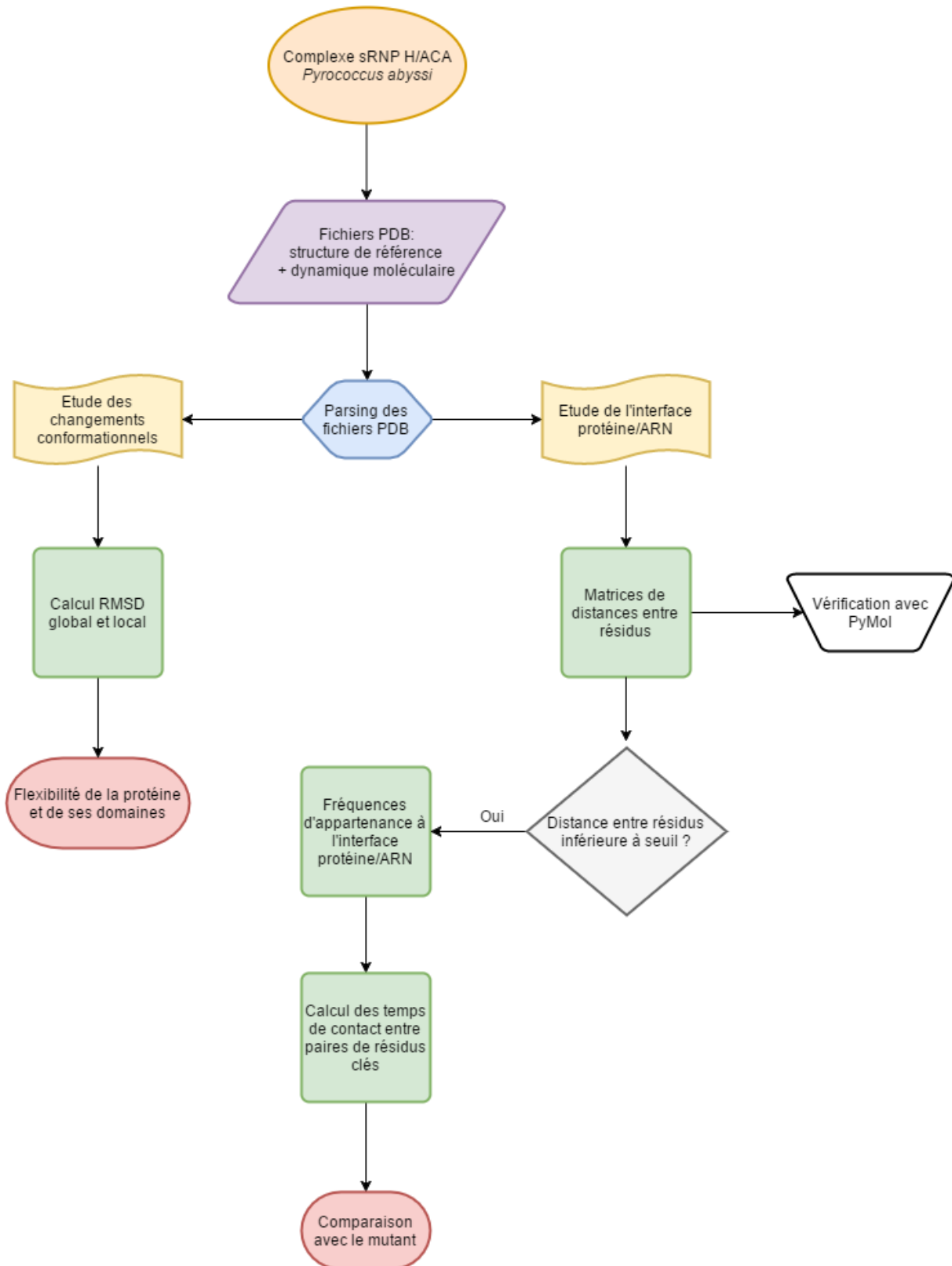
**Annexe 2 :** Matrices des distances représentées sous forme de *heatmaps* entre les domaines A1, A2 et A4 et l'ARN (B).

**Annexe 3 :** Matrice des distances représentée sous forme de *heatmap* entre les domaines A3 et A4.

**Annexe 4 :** Contacts chez le mutant (a) et le sauvage (b) entre les résidus clé pour l'interaction.

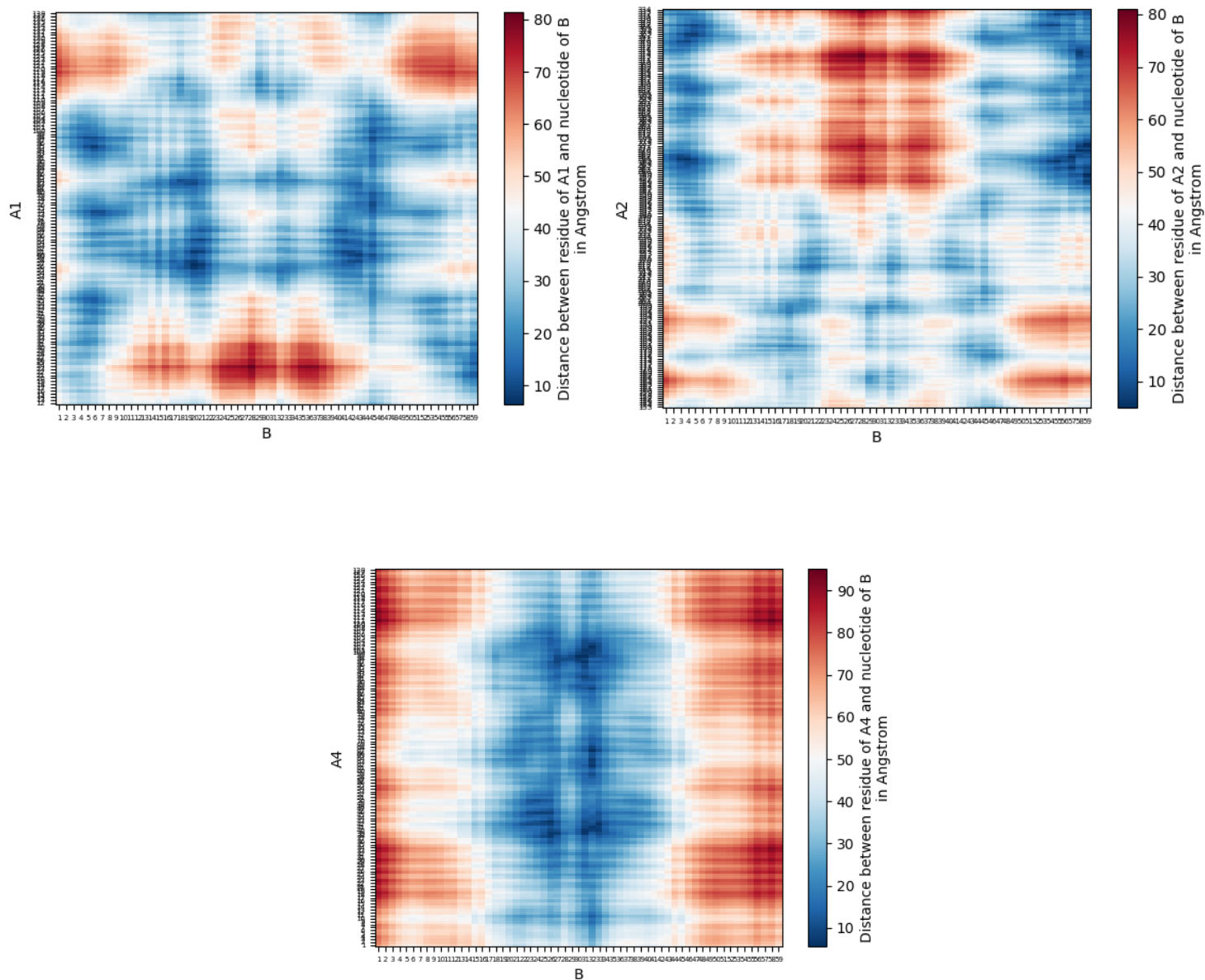
## Annexe 1

Flow-chart du projet.



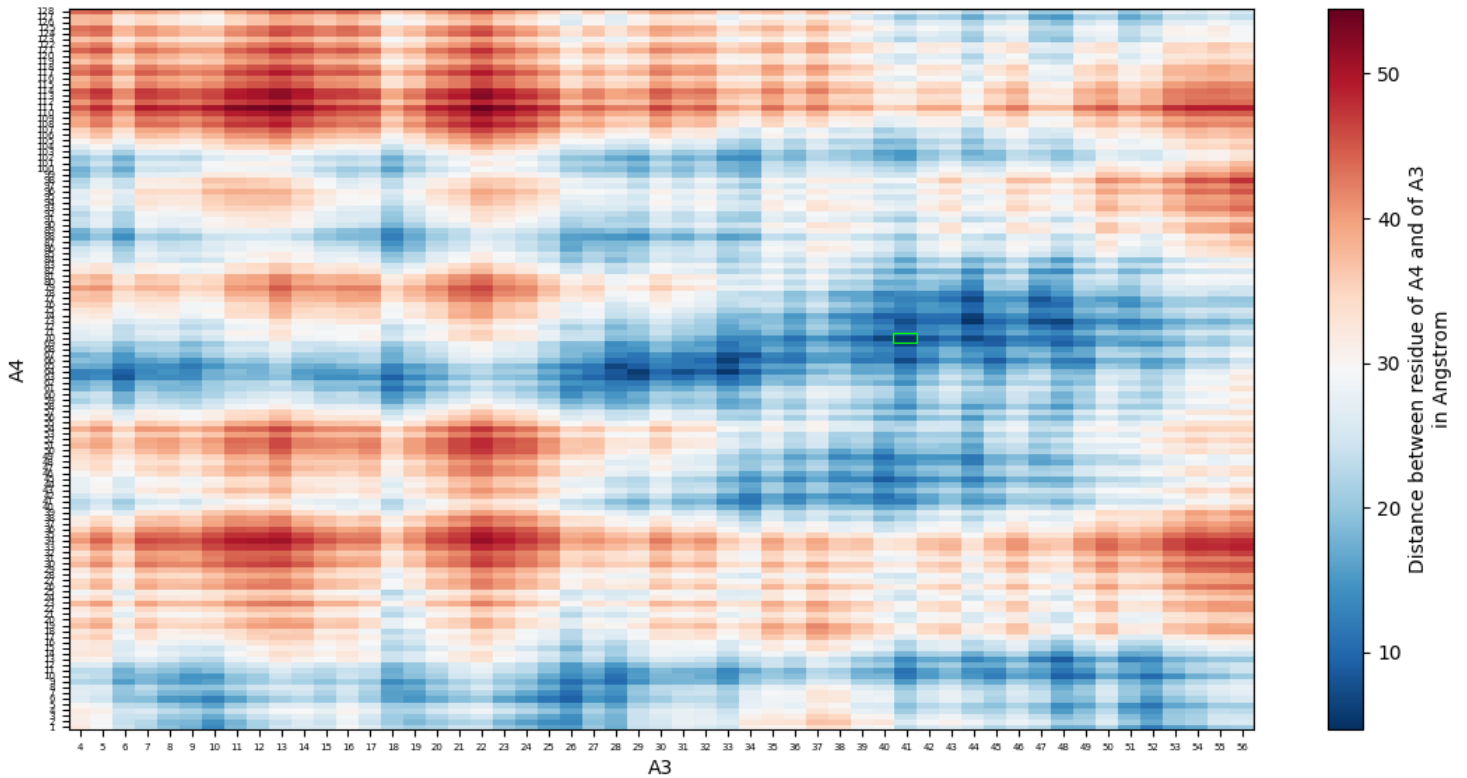
## Annexe 2

Matrices des distances représentées sous forme de *heatmaps* entre les domaines A1, A2 et A4 et l'ARN (B). Les distances ont été calculées entre les centres de masse des résidus.

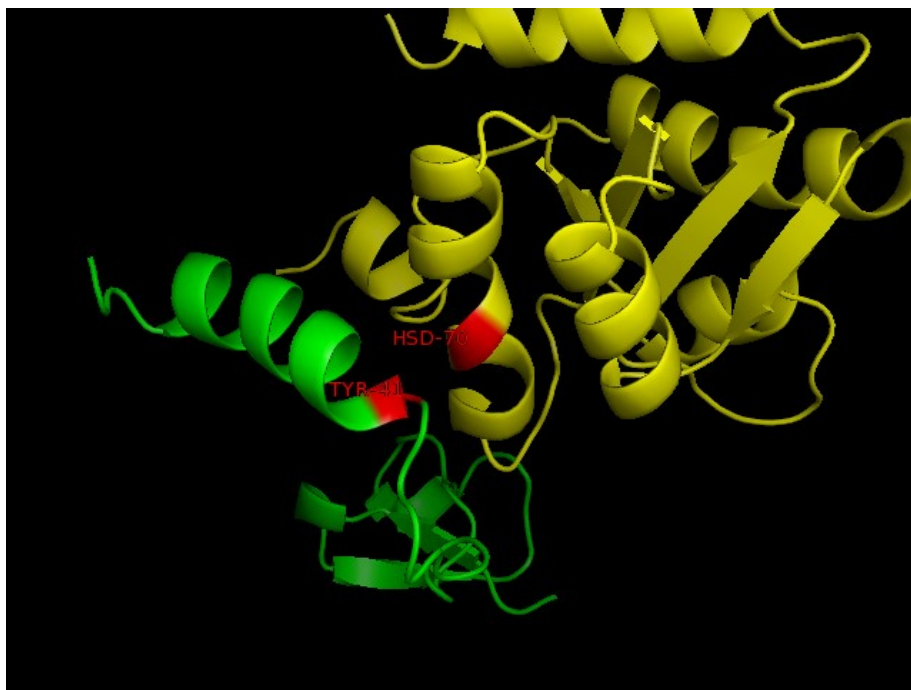


### Annexe 3

Matrice des distances représentée sous forme de *heatmap* entre les domaines A3 et A4.  
Les distances ont été calculées entre les centres de masse des résidus.



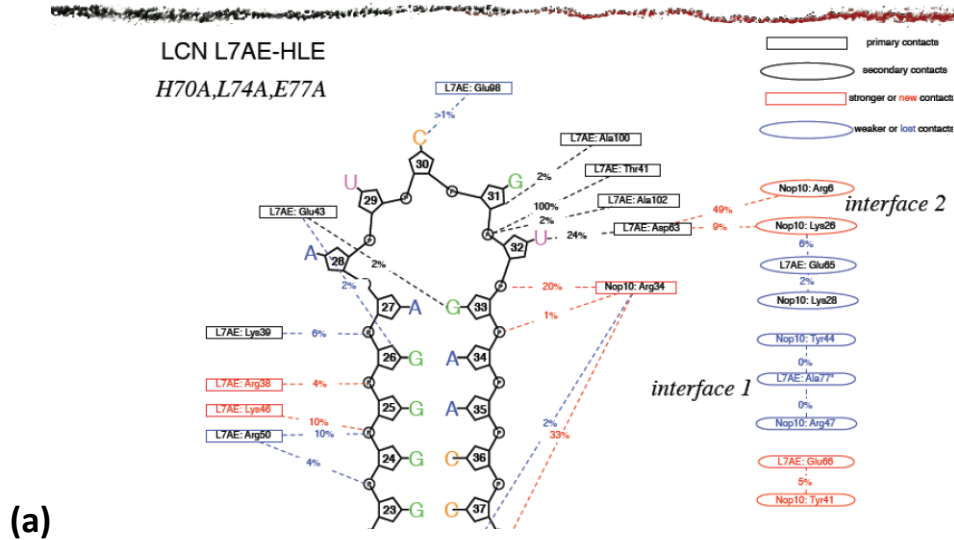
Visualisation sous PyMol des résidus 34 du domaine A3 et 70 du domaine A4 (rectangle vert sur la *heatmap*). Ces résidus sont en effet très proches.



## Annexe 4

Contacts chez le mutant (a) et le sauvage (b) entre les résidus clé pour l'interaction.

### Contacts at Nop10/L7Ae interface: from MD simulations on sRNP H/ACA



### Contacts at Nop10/L7Ae interface: from MD simulations on sRNP H/ACA

