

La ribonucléase P : une véritable enzyme à ARN in vitro

La maturation des précurseurs d'ARN de transfert (pré-ARNt) implique une cascade de réactions, incluant une coupure endonucléotidique indispensable à la formation de l'extrémité 5' terminale des ARNt matures. Cette maturation est nécessaire pour obtenir des ARNt capables d'assurer leur fonction lors de la synthèse protéique. La réaction de coupure à l'extrémité 5' terminale est catalysée par une ribonucléoprotéine, la ribonucléase P (RNase P) [1], constituée d'une sous-unité ARN et d'une sous-unité protéique. Chez les eubactéries, tel *Escherichia coli* (*E. coli*), la sous-unité ARN est responsable de l'activité catalytique et agit comme une véritable enzyme *in vitro*, constituant donc un ribozyme (*m/s* n° 2, vol. 1, p. 107 ; n° 5, vol. 2, p. 280) ([2] et pour synthèse voir [3-5]). Cette revue a pour but de présenter les points saillants de la recherche actuelle sur la RNase P, principalement celle d'*E. coli*.

• Le site de reconnaissance de la RNase P

Une seule RNase P est responsable de la maturation de tous les pré-ARNt d'une cellule (*figure 1A*). Or, on sait que les ARNt, ainsi que leur séquence 5' *leader*, ont des séquences variables. Cependant les ARNt ont une structure secondaire et tertiaire particulièrement bien conservée : cela suggère que la RNase P reconnaît une structure plutôt qu'une séquence. McClain *et al.* [6] ont démontré qu'un pré-ARNt dépourvu des hélices dihydrouridine et anticodon, ainsi que de la boucle extra, demeurait un substrat pour la RNase P (*figure 1B*). Forster et Altman ont aussi montré que la molécule est un substrat même après élimination de la boucle et de l'hélice pseudouridine (*figure 1C*) [7]. Dans ce cas, le fragment d'ARN qui inclut la séquence 5' *lea-*

der sert de substrat tandis que le fragment d'ARN qui inclut la séquence conservée NCCA en 3' constitue une « séquence guide externe » (SGE) pour la position de coupure. De plus, la séquence 5' *leader* peut être réduite à 2 nucléotides et encore servir de substrat pour la RNase P [8]. A l'extrémité 3' terminale des pré-ARNt, la séquence simple brin NCCA est conservée. Bien que cette séquence ne soit pas absolument requise pour que la coupure ait lieu, sa présence en améliore néanmoins de beaucoup l'efficacité [9].

Donc, il semble que la reconnaissance d'un substrat par la RNase P se réduit à une structure en double

hélice avec une séquence 5' *leader* en amont et la séquence NCCA en aval. Comme cela est illustré à la *figure 1D* on peut penser que la RNase P reconnaît l'hélice amino-acceptrice de l'ARNt comme un cylindre ayant deux excroissances, la séquence 5' *leader* et la séquence NCCA. Une fois ce motif reconnu, la RNase P lie son substrat.

Cette hypothèse est renforcée par trois observations : (1) le pré-ARN 4,5 S, qui adopte une structure de longue hélice interrompue par des boucles internes et possède une séquence 5' *leader* en amont et la séquence NCCA en aval, est aussi un substrat de la RNase P [10].

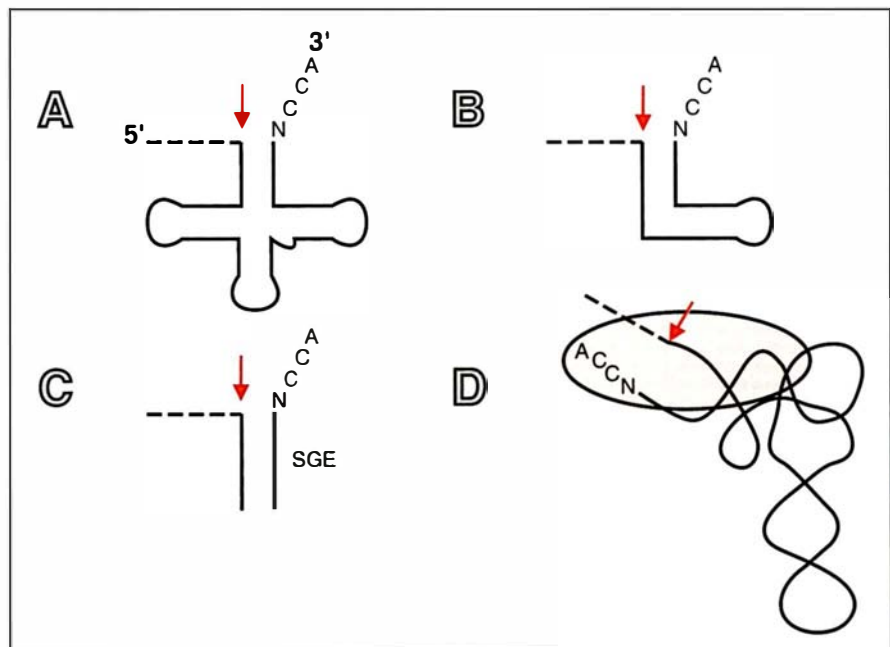
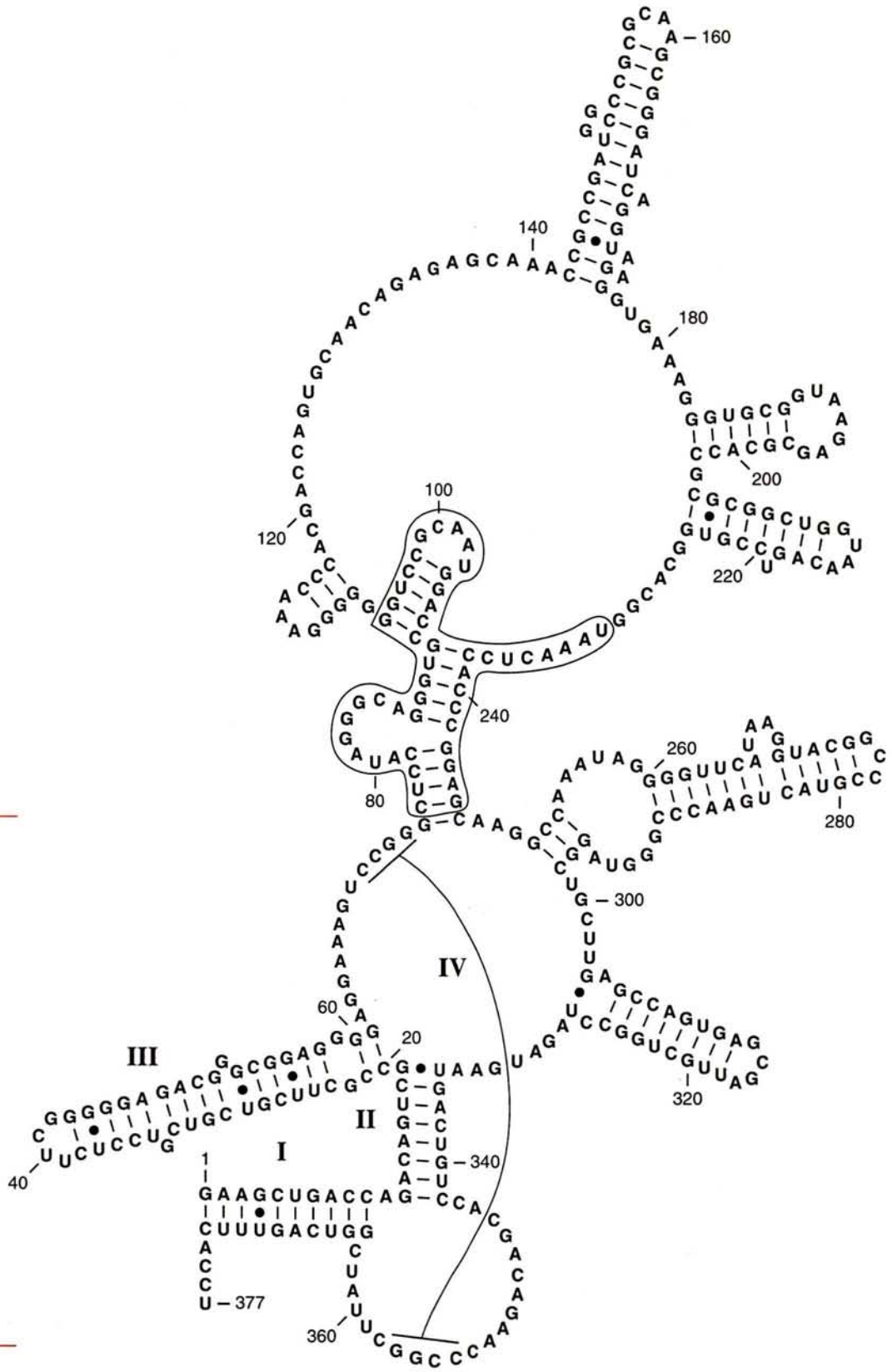


Figure 1. **La reconnaissance de la RNase P.** La RNase P peut reconnaître et couper (flèche : site de coupure) : **A** — tous les pré-ARNt ; **B** — un pré-ARNt dépourvu des hélices dihydrouridine et anticodon ainsi que la boucle extra ; et **C** — un fragment d'ARN substrat apparié à une séquence guide externe (SGE) ; **D** — le motif minimum que la RNase P reconnaît dans la structure tertiaire du pré-ARNt.

C A G E



(2) De même la structure présente à l'extrémité 3' terminale du génome ARN du virus satellite de la nécrose du tabac (STNV) rappelant celle d'un ARNt, est-elle aussi un substrat pour la RNase P [11]. Pourtant, le site de coupure de cet ARNt est à l'extrémité d'une hélice formée par un pseudo-nœud. (3) Puisqu'un fragment d'ARN peut former une séquence guide externe (SGE), il a été possible de dessiner des SGE pouvant s'apparier avec des séquences cibles d'un ARN messenger et d'induire la coupure de ces ARN en présence de RNase P *in vitro* (Y. Li, et S. Altman, résultats non publiés). Ce dernier résultat suggère que la RNase P pourrait être utilisée à des fins thérapeutiques pour contrer la production d'ARNm indésirables ou de rétrovirus tel HIV responsable du SIDA. Les travaux actuels ont pour but de définir, au niveau moléculaire et atomique, le site de reconnaissance de la RNase P. Par exemple, puisqu'un substrat d'ADN ne peut être coupé par la RNase P (J.-P. Perreault et S. Altman, résultats non publiés), cela suggère que les groupements 2'-hydroxyles, spécifiques des ribonucléotides ont sûrement une fonction importante au niveau du substrat. Ces derniers peuvent être impliqués dans la liaison du substrat à l'enzyme et/ou peuvent être nécessaires à la réaction chimique. Ces possibilités restent encore à être évaluées.

• Structure/fonction de la sous-unité ARN

La sous-unité ARN de la RNase P d'*E. coli*, appelée M1, est composée de 377 nucléotides (figure 2). La structure primaire comporte très peu de nucléotides hautement conservés dans d'autres RNase P, ce qui rend difficile la détermination du site catalytique et du site de liaison du substrat. Finalement, la structure secondaire de M1 a été obtenue grâce à des comparaisons phylogéniques avec plusieurs sous-unités ARN

de RNase P d'eubactéries [12]. Ces travaux ont démontré que la prédiction de structure secondaire basée sur une espèce de M1 et sur des études de dégradations partielles à l'aide de ribonucléases spécifiques n'avaient précédemment conduit qu'à l'élaboration de structures imparfaites [13, 14]. Ainsi, bien que la structure primaire varie considérablement, la structure secondaire de la sous-unité ARN est relativement bien conservée chez toutes les espèces. La structure tertiaire de M1 demeure inconnue et sa détermination fait l'objet d'intenses recherches.

L'étude de la structure secondaire a conduit à la formulation de deux hypothèses. (1) Un motif similaire à une cage pourrait être responsable des propriétés catalytiques de M1 [15]. Ce motif est composé de quatre doubles hélices très conservées et reliées par des régions simple brin (figure 2) ; il inclut des nucléotides des deux extrémités et le pseudo-nœud (hélice IV) permettant de replier ce domaine pour former la cage. Un tel motif est présent dans toutes les sous-unités ARN séquencées jusqu'à maintenant et constitue, de ce fait, un bon candidat au titre de site catalytique. (2) La structure secondaire du domaine formé par les nucléotides 75 à 106 et 230 à 246 de M1 (figure 2) ressemble au site de sortie (« E ») du ribosome. Ce domaine de l'ARNr 23S est celui qui lie l'ARNt au ribosome. De plus, le nucléotide C92 de M1 a pu être attaché, par action des ultraviolets de 254 nm, au nucléotide en position C3 de la séquence 5' leader du pré-ARN^{Tr} [9]. Ce type d'attachement est possible seulement sur une distance égale ou inférieure à 0,2 nm entre les deux groupements chimiques impliqués. Donc, au niveau du complexe substrat-ribozyme, ces deux groupements chimiques sont très près l'un de l'autre. Ce résultat est en plein accord avec l'hypothèse selon laquelle ce domaine de l'ARN M1

est responsable de la liaison du substrat. Contrairement à l'ARN ribosomal des introns du groupe I (*m/s n°5*, vol. 2, p. 280 ; *m/s n°8*, vol. 4, p. 522) et aux ARN de structure secondaire en « tête de marteau » (*hammerhead*), la liaison du substrat à l'ARN M1 n'a pas lieu *via* la formation d'une double hélice. Le repliement de la structure secondaire lors de la formation de la structure tertiaire permet probablement le rapprochement des nucléotides impliqués dans la liaison du substrat.

Des études de mutagenèse n'ont pas permis d'identifier avec précision des régions spécifiques constituant le site de liaison du substrat et le site catalytique [16-18]. Ces expériences ont toutefois montré que certains nucléotides, situés à divers endroits non-contigus au niveau de la structure secondaire, étaient importants pour la catalyse. Cela indique probablement que la structure tertiaire confère des propriétés catalytiques à la sous-unité ARN en permettant le rapprochement de nucléotides éloignés.

La comparaison de la structure secondaire des sous-unités ARN d'*E. coli* et de *Bacillus subtilis* a conduit à la construction d'une mini sous-unité d'ARN de 263 nucléotides dont les structures en épingles à cheveux, non conservées entre les deux sous-unités d'ARN, ont été délétées [19]. Cette mini sous-unité d'ARN catalyse la réaction de couplage, mais avec peu d'efficacité rendant difficile l'identification de ce qui est important pour la catalyse. La compréhension du mécanisme moléculaire de la RNase P exigera donc une meilleure connaissance de la structure tertiaire de l'ARN M1, ce qui explique tous les efforts déployés afin de définir cette structure tertiaire, incluant l'utilisation d'outils informatiques.

• La fonction de la sous-unité protéique

La sous-unité protéique interagit d'une manière spécifique avec la sous-unité d'ARN. Elle protège de la dégradation par la RNase T1 principalement les nucléotides entre les positions 82 à 96 ainsi que certains nucléotides entre les positions 170 à 270 [20]. La sous-unité protéique, bien que n'étant pas absolument indispensable, participe néanmoins à

◀ Figure 2. La structure secondaire de M1. La partie ombragée correspondant à la région proposée comme étant le site de liaison de l'hélice amino-acceptrice incluant la séquence NCCA. Le motif similaire à une cage correspond à la partie inférieure de M1. Les hélices hautement conservées sont numérotées en chiffres romains.

la catalyse. En absence de protéine, la sous-unité d'ARN nécessite une plus grande concentration de sel, principalement de Mg^{2+} , pour obtenir la même efficacité de coupure. Il semble que la présence de la protéine facilite, entre autre, la liaison du substrat tandis qu'en son absence une grande concentration de sel est nécessaire afin de contrer la répulsion électrostatique entre les squelettes phosphoriboses de la sous-unité ARN et du pré-ARNt [21, 22]. De plus, il semble aussi que la sous-unité protéique puisse participer à la détermination de la conformation du ribozyme, lui permettant de lier le substrat et/ou de spécifier le site de coupure [23]. En effet, (1) la présence de la sous-unité protéique permet d'augmenter considérablement l'efficacité de coupure pour des substrats dépourvus de la séquence CCA à l'extrémité 3'. Alors que M1 seul, lorsque le nucléotide C92 est délété, ne coupe qu'à des sites erronés des substrats dont la séquence CCA est absente, la sous-unité protéique permet de restaurer le site de coupure authentique [9]. (2) selon les substrats, la présence de la sous-unité protéique altère d'une manière non-systématique la constante de Michaelis (K_m) et la vitesse (k_{cat}) de la réaction, [6, 8, 9] ce qui suggère que la sous-unité protéique est impliquée dans la catalyse. D'ailleurs, *in vivo*, il n'existe aucune preuve que la sous-unité d'ARN soit capable de catalyser, seule, la maturation des pré-ARNt et la présence de la sous-unité protéique pourrait donc être absolument indispensable.

• La RNase P, Nouvelle ou Ancienne ?

Dans l'optique d'un « Monde à ARN » à l'origine de la vie, on peut penser que la sous-unité d'ARN de la RNase P, M1, est très ancienne. En faveur de cette hypothèse, on peut relever le fait que M1 catalyse la coupure de mini-hélices proposées comme étant les ancêtres des ARNt [24]. Par ailleurs, *in vitro*, la RNase P catalyse la coupure d'un large éventail de substrats évitant peut-être à la cellule moderne d'avoir à utiliser toute une famille de telles RNases.

Pourquoi cette enzyme composée d'ARN n'a-t-elle, cependant, pas été remplacée par une enzyme protéique ? L'efficacité de M1 est en effet relativement faible comparativement à une phosphodiesterase protéique. Cette dernière enzyme reconnaît et coupe, soit un nucléotide libre, soit un nucléotide présent dans une région simple ou double brin. M1 reconnaît, quant à elle, une structure composée d'une région double brin et d'au moins deux régions simple brin dont une inclue la séquence NCCA ; elle coupe ensuite toujours précisément le lien phosphodiester suivant le nucléotide N' opposé au nucléotide N, que ceux-ci soient appariés ou non. M1 serait donc capable de mesurer la distance entre le site de liaison du substrat et le site de coupure : la nature aurait fait un choix de qualité plutôt que de quantité ! ■

Jean-Pierre Perreault, Sidney Altman
Département de biologie, Université de Yale, New Haven, Connecticut, 06511, Etats-Unis.

Remerciements

Les auteurs remercient Sylvie Ricard pour sa collaboration. Jean-Pierre Perreault est boursier post-doctoral du CRM (Canada). Sidney Altman est professeur Sterling à l'Université Yale. Il est lauréat du prix Nobel de chimie 1989 pour ses travaux sur l'ARN catalytique (*m/s n°9*, vol. 5, p. 703). Ces travaux sont supportés par l'USNIH et l'USNSF

RÉFÉRENCES

- Altman S, Guerrier-Takada C, Frankfort H, Robertson HD. RNA processing nucleases. In : Linn S, Roberts R, eds. *Nucleases* New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1982 : 243-74.
- Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, Altman S. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 1983 ; 35 : 849-57.
- Altman S. Ribonuclease P : an enzyme with a catalytic RNA subunit. *Adv Enzymol* 1989 ; 62 : 1-36.
- Baer M, Lumelsky N, Guerrier-Takada C, Altman S. Structure and function of bacterial RNase P. *Nucleic Acids and Molecular Biology* 1989 ; 3 : 231-50.
- Pace N, Smith D. Ribonuclease P : function and variation. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 3587-90.

- McClain W, Guerrier-Takada C, Altman S. Model substrates for an RNA enzyme. *Science* 1987 ; 238 : 527-30.
- Forster AC, Altman S. External Guide Sequences for an RNA Enzyme. *Science* 1990 ; 249 : 783-6.
- Peck K. Substrate recognition by *E. coli* RNase P. PhD Thesis, Yale University 1990.
- Guerrier-Takada C, Lumelsky N, Altman S. Specific interactions in RNA enzyme substrate complexes. *Science* 1989 ; 246 : 1578-84.
- Bothwell ALM, Garber RL, Altman S. Nucleotide sequence and *in vitro* processing of a precursor molecule to *Escherichia coli* 4.5.S RNA. *J Biol Chem* 1976 ; 251 : 7709-16.
- Guerrier-Takada C, Belkum AV, Pleij CWA, Altman S. Novel reactions of RNase P with a tRNA-like structure in turnip yellow mosaic virus RNA. *Cell* 1988 ; 53 : 267-72.
- James B, Olsen G, Lin J, Pace N. The secondary structure of ribonuclease P RNA, the catalytic element of a ribonuclear protein enzyme. *Cell* 1988 ; 52 : 19-26.
- Reed R, Baer M, Guerrier-Takada C, Donis-Keller H, Altman S. Nucleotide sequence of the gene encoding the RNA subunit (M1 RNA) of ribonuclease P from *E. coli*. *Cell* 1982 ; 30 : 627-37.
- Guerrier-Takada C, Altman S. Structure in solution of M1 RNA, the catalytic subunit of ribonuclease P from *E. coli*. *Biochemistry* 1984 ; 23 : 6327-34.
- Forster AC, Altman S. Similar cage-shaped structures for the RNA components of all ribonuclease P and ribonuclease MRP enzymes. *Cell* 1990 ; 62 : 407-9.
- Lawrence N, Altman S. Site-directed mutagenesis of M1 RNA, the RNA subunit of *E. coli* ribonuclease P. The effects of an addition and small deletions on catalytic function. *J Mol Biol* 1986 ; 191 : 163-75.
- Shiraishi M, Shimura Y. Mutations affecting two distinct functions of the RNA component of RNase P. *EMBO J* 1986 ; 5 : 3673-9.
- Lumelsky N, Altman S. Selection and identification of randomly produced mutants in the gene coding for M1 RNA. *J Mol Biol* 1988 ; 202 : 443-54.
- Waugh DS, Green CJ, Pace NR. The design and catalytic properties of a simplified ribonuclease P RNA. *Science* 1989 ; 244 : 1569-71.
- Vioque A, Arnez J, Altman S. Protein-RNA interactions in the RNase P holoenzyme from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 1988 ; 202 : 835-48.
- Guerrier-Takada C, Haydock K, Allen L, Altman S. Metal ion requirements and other aspects of the reaction catalyzed by M1 RNA, the RNA subunit of ribonuclease P from *E. coli*. *Biochemistry* 1986 ; 25 : 1509-15.
- Gardiner K, Marsh T, Pace N. Ion dependence of *B. subtilis* RNase P reaction. *J Biol Chem* 1985 ; 260 : 5415-9.
- Altman S. Ribonuclease P. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 20053-6.
- Francklyn C, Schimmel P. Enzymatic aminoacylation of an eight-base-pair microhelix with histidine. *Biochemistry* 1990 ; 87 : 8655-9.