

**UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**

**2010**

**Ecole doctorale sciences de la vie et de la santé**

**THÈSE**

**Présentée pour l'obtention du grade de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG**

**Discipline : Science du Vivant**

**Domaine : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

**Par**

**MATHIEU FRÉCHIN**

**Identification et rôles des partenaires de la voie de transamidation de la mitochondrie de  
*Saccharomyces cerevisiae* dans l'adaptation à la respiration.**

**Membre de la commission d'examen :**

<b>Pr. B. DUJON</b>	<b>Rapporteur externe, président du Jury</b>
<b>Pr. C.STATHOPOULOS</b>	<b>Rapporteur externe</b>
<b>Pr. J.CAVARELLI</b>	<b>Examineur interne</b>
<b>Dr. R.MARTIN</b>	<b>Membre invité</b>
<b>Pr. H.BECKER</b>	<b>Directeur de thèse</b>
<b>Pr. D.KERN</b>	<b>Directeur de thèse, membre invité</b>

Je remercie tout d'abord les membres de mon Jury, le Pr. Bernard Dujon, le Pr. Jean Cavarelli ainsi que le Pr. Constantinos Stathopoulos qui me font l'honneur de juger mon travail.

Je tiens à remercier le Pr. Eric Westhof qui m'a accueilli dans son unité et m'a soutenu lors de moments clés pour mon début de carrière.

Je remercie tout particulièrement le Pr. Jean Cavarelli pour son rôle déterminant dans mon cursus universitaire. Les opportunités que j'ai aujourd'hui je vous les dois en grande partie.

J'aimerais ensuite remercier le Pr. Daniel Kern qui a toujours eu confiance en moi. Merci pour m'avoir fait sentir que j'avais un potentiel dans ce domaine. Merci également pour avoir longuement discuté avec moi de sujets autres que la biologie, nos discussions auront affiné mes opinions.

Je remercie tout spécialement le Pr. Hubert Becker. Il me faut être malheureusement succinct, alors j'aimerais te dire merci pour l'ensemble des bons moments passés au cours de ces quatre années de thèse mais aussi pour m'avoir montré la nécessité de maintenir une vie équilibrée en dehors du laboratoire. Merci d'accepter avec autant d'enthousiasme chaque idée nouvelle, même si elles ne sont pas d'un très haut niveau ! C'est une qualité rare qui demande de l'humilité quoiqu'on en pense et je vais essayer de m'en inspirer très fortement. Pour le reste et les banalités tu sais ce qu'il en est !

Un passage spécial pour Bruno Senger. Bruno, tu mériterais une page entière de remerciements, tu es à beaucoup d'égards un exemple pour tous les chercheurs !

J'aimerais ensuite remercier le Dr. Robert Martin qui aura été présent tout au long de ma thèse pour travailler et partager son savoir théorique et technique mais aussi discuter, rigoler et me transmettre un peu de son amour des choses de la vie.

Au tour du labo 337. Tu d'abord merci à toi Mick pour m'avoir conseillé durant mon Master et m'avoir remotivé à courir et félicitation pour ton travail. Merci Mélanie pour la touche de délicatesse dans ce monde de brutes ! Merci ensuite à Fredo pour les grosses rigolades, films pourris et mots d'Alsacien, tu iras loin. Merci ensuite à Nizar le Libanais le plus gentil du monde! Merci à Ludo/Knacki un mec super chouette qui a brillamment passé son master 2 avec moi, aies confiance! Enfin merci à Guillaume, fraîchement arrivé au labo, qui a égaillé ma fin de thèse par son humour particulièrement percutant mais surtout, il faut bien le dire, drôle (c'est si rare un humour drôle de nos jours...).

Merci également à Joern et à mes collègues moniteurs de l'équipe d'enseignement biochimie (merci Fabrice) pour ces trois années de monitorat vraiment enrichissantes.

Je tiens également à remercier l'ensemble des gens que j'ai côtoyés à l'institut, tous les Philippes, Christine merci pour la formation q-PCR, JC pour la culture cell, Fafa, Pascale, Catherine, Guigui, Eric, et toutes les personnes que j'apprécie.

Merci à toutes les personnes du 4<sup>ème</sup> étage de l'IPCB, vous êtes tous tellement chouettes, Yvan, Sylvie, Nina, Mike, Johann, Bruno et tous les autres.

Mention spéciale pour Jérôme Mutterer qui m'a permis de m'initier au confocal et dont la compétence n'a d'égal que la bonne humeur, ainsi qu'à Philippe et Laurianne la Mass Spec team qui ont subi mon enthousiasme dégoulinant.

Le club des coureurs évidemment ! Merci à JC, Eric, Emilie et MAG pour avoir perpétué la sainte sortie du mercredi, à Seb et Beunz pour s'être laissé convaincre de courir avec nous et surtout d'être revenus ! D'autres n'ont pas eu ce courage, hein José et Nizar! Il y en a même qu'on attend toujours...

J'aimerais remercier Emilie et son Arnaud qui nous ont offert quelques-uns des rares moments de détente de ces deux dernières années, votre soutien importe vraiment.

Un profond merci à tous mes amis qui me sont chers et que je vois si peu. En particulier à Sophie, Julien, Virginie, Carine, Alexandre et Antoine, j'ai trop peu l'occasion ou simplement le courage de vous dire merci d'être là, je suis un bien piètre ami!

Enfin les remerciements les plus importants :

Merci à toi Marie-Aline, pour l'ensemble de ce que tu fais pour moi.

Merci à vous Lucas et à Léo mes deux petits frères de compétition. Sans votre soutien et votre bonne humeur je ne serais pas arrivé là aujourd'hui. Je souhaite à tout le monde d'avoir des frères aussi brillants que vous et j'espère jusqu'ici avoir été à la hauteur de mon rôle de grand frère.

Merci à toi Maman pour m'avoir très tôt transmis le plaisir de Savoir et avoir fait ton maximum pour nous élever au mieux, de ce que j'en vois c'est pas mal!

Merci Papa pour m'avoir transmis ta curiosité et ta logique, le plaisir de la rigueur et le goût de l'effort en sport et au travail! En tout tu es un exemple pour moi.

Je profite donc de cette occasion pour dire à ces cinq personnes que je les aime car on ne le fait jamais assez.

Enfin je pense à ma Grand-mère Claire qui j'en suis sûr serait très fière de moi. Je lui dédie entièrement cette thèse.

<b>I. Introduction</b>	<b>5</b>
<b>A. La cellule, un système organique complexe</b>	<b>5</b>
1. Le concept de robustesse	5
2. Les différents types de rétrocontrôle et la capacité de mémoire	6
3. La modularité	8
4. De la fonction au gène plutôt que l'inverse	10
5. Le module, rencontre d'un mécanisme moléculaire et d'une structure sub-cellulaire.	12
6. Un cas d'école	13
<b>B. La voie Snf1/4, un module essentiel pour l'adaptation métabolique de la levure</b>	<b>17</b>
1. Les voies de signalisation	17
a) Le contrôle du métabolisme de la cellule	17
b) Le maintien du génome et des composants de la cellule	18
c) L'apoptose	20
d) Le contrôle du cycle cellulaire	20
e) Synthèse	21
2. Le métabolisme de la levure et son contrôle	22
a) Le shift diauxic	25
b) La voie TOR	26
c) La voie Ras/PKA	27
3. La voie Snf1/4, structure et dynamique	29
a) Partenaires et dynamiques de la voie Snf1/4	29
b) Protocoles internes et mécanismes de modulation	32
4. Perspectives	32
<b>C. L'amination, un module clé pour le respect du code génétique</b>	<b>33</b>
1. Le mécanisme de la traduction	34
a) Les ribosomes eucaryotique et organellaire	34
b) L'expression de l'information génétique.	36
c) Les étapes de la traduction eucaryotique	39
d) La traduction mitochondriale	43
e) Avancées conceptuelles récentes	44
2. Les aminoacyl-ARNt synthétases et les ARN de transfert	46
a) Les ARNt, synthèse, structure, fonctions	46
b) Caractéristiques des aminoacyl-ARNt synthétases	50
3. Mécanismes particuliers	54
a) Les voies indirectes	54
b) Complexes et concept de channeling.	59
4. Localisation subcellulaire et fonctions secondaires des aminoacyl-ARNt synthétases	61
a) Les complexes multi-synthétasiques et le contrôle des fonctions secondaires des aminoacyl-ARNt synthétases	61
b) Autres fonctions secondaires des aminoacyl-ARNt synthétases	69
<b>D. Les complexes multi protéiques, une stratégie simple pour coordonner les modules fonctionnels de la cellule</b>	<b>71</b>

<b>II.</b>	<b><i>Résultats et discussion</i></b>	<b>74</b>
<b>A.</b>	<b>La formation de glutaminyl-ARNt<sup>glutamine</sup> dans les organites</b>	<b>74</b>
<b>B.</b>	<b>Composants et mécanismes de contrôle de la voie de formation du glutaminyl-ARNt<sup>glutamine</sup> dans la mitochondrie de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	<b>81</b>
<b>C.</b>	<b>Composants et mécanismes de contrôle de la voie de formation du glutaminyl-ARNt<sup>glutamine</sup> dans la mitochondrie Humaine</b>	<b>105</b>
1.	Contexte	105
2.	Clonage, purification et tests de l'activité de transamidation de l'amidotransférase GatCAB humaine	106
3.	Remplacement de la ND-ERS de levure par l'ERS cytoplasmique humaine.	111
4.	Expression et purification de la mini-EPRS humaine.	113
5.	perspectives	114
<b>D.</b>	<b>Les multiples fonctions d'Arc1p</b>	<b>117</b>
<b>E.</b>	<b>Le rôle de Arc1p dans l'adaptation de la levure à la respiration</b>	<b>125</b>
<b>Pr. Hubert Becker</b>		<b>132</b>
<b>F.</b>	<b>Conclusions</b>	<b>186</b>
<b>III.</b>	<b><i>Travaux parallèles</i></b>	<b>188</b>

# I. Introduction

Quelque soit l'échelle à laquelle nous nous plaçons, les questions foisonnent, et c'est autant de concepts et de techniques qu'il faut maîtriser, et donc de sujets passionnants! De cette propension à m'éparpiller, et après un peu de réflexion, je me suis finalement aperçu que mon véritable centre d'intérêt n'était pas l'objet étudié, quel qu'il fût, mais sa place au sein d'une dynamique, d'un système plus global qui lui même émerge de ses composants (Cohen and Stewart, 1994) plutôt que d'en être la simple somme. C'est ce quelque chose en plus (la vie ?) qui m'intéresse.

## ***A. La cellule, un système organique complexe***

### **1. Le concept de robustesse**

Toute cellule, des bactéries aux eucaryotes multicellulaires, doit être capable d'analyser et de traiter les informations en provenance de son environnement afin de proposer une ou des réponses adaptées à-même d'assurer le maintien de ses fonctions et donc sa survie ou, le cas échéant, de celle de l'organisme qu'elle compose. Cette nécessité impose à la cellule de pouvoir différencier un signal porteur d'informations de fluctuations aléatoires ayant lieu dans son environnement ou même en son sein. Cette capacité à maintenir des fonctions et un comportement stables face aux perturbations et incertitudes externes (ou internes) est appelée robustesse (Stelling et al., 2004).

Au nombre des perturbations nous pouvons citer des évènements aussi différents que la variation des réserves d'énergie (Youk and van Oudenaarden, 2009), ou de pression osmotique (Muzzey et al., 2009), les mutations ou l'expression stochastique des gènes (Raj et al., 2010; Raj and van Oudenaarden, 2008) etc. L'avantage que procure cette capacité est évident, elle a donc été très tôt favorisée par l'évolution (de Visser et al., 2003). Cependant de tels concepts sont difficiles à rationaliser et encore plus à étudier tant ils semblent vagues aux premiers abords.

La robustesse est une caractéristique présente à tous les niveaux de la cellule et repose sur des lois connues depuis longtemps des ingénieurs et des adeptes de l'automatique et de la théorie

du contrôle (Granjon, 2003) qui ont très tôt développé des concepts et des outils pour contrôler les moteurs et systèmes électriques et électroniques. Ces concepts servent aujourd'hui de base à la biologie des systèmes (Chuang et al., 2010) qui connaît un nouvel essor depuis une dizaine d'années. Cette réémergence prend sa source dans l'évolution des techniques de microscopie couplées aux systèmes de micro fluidique ainsi que dans l'augmentation des capacités de calcul et de traitement des images.

## **2. Les différents types de rétrocontrôle et la capacité de mémoire**

L'utilisation du terme de robustesse en biologie n'est pas anodin car il englobe plus que les notions d'homéostasie ou de stabilité, pour ne nommer qu'elles. Il retranscrit la capacité de maintenir un comportement qui n'est justement pas stable mais souvent périodique ou pulsé. Un parfait exemple de l'importance d'un comportement pulsé est donné dans une publication récente du journal *Cell* (Loewer et al., 2010). La protéine p53 humaine est un facteur de transcription clé pour le maintien de l'intégrité de la cellule, capable de stopper le cycle cellulaire et de déclencher la mort programmée en réponse à des dégâts trop importants dans le génome. Les auteurs démontrent que cette protéine s'active de manière périodique avec une fréquence proportionnelle à l'intensité de l'agression, déclenchant une réponse adaptée aux différentes intensités de stress à laquelle la cellule peut être soumise.

Ce type de comportement permettant de différencier un signal réel du bruit de fond est qualifié de robuste et repose sur des lois simples que sont les mécanismes de rétrocontrôle positifs et négatifs. Par exemple, sous l'effet de p53 les dégâts sont réparés ce qui inactive en retour cette même protéine. Ces phénomènes ou protocoles peuvent permettre aux systèmes cellulaires de se comporter comme des interrupteurs ou encore de s'auto-entretenir alors que le stimulus déclencheur a disparu, permettant l'apparition d'une sorte de mémoire dynamique, que les spécialistes appellent hystérisis (Angeli et al., 2004).

Le rétrocontrôle négatif a lieu lorsqu'un système est inhibé par son produit, permettant de réduire la différence entre la valeur de fonctionnement à l'instant T et celle à maintenir, ce qui est garant de stabilité au sens propre du terme pour le système en question (Hasty et al., 2002). La **Figure I-1** illustre cela de la manière la plus simple qui soit, lorsque le produit d'un

gène contrôle son propre promoteur, l'expression est stabilisée, *i.e.* le nombre de molécules par cellules varie peu.

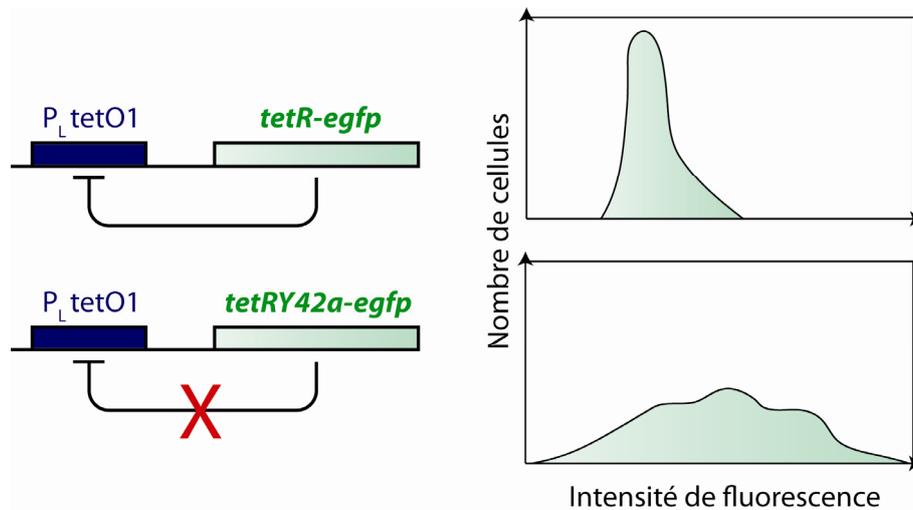


Figure I-1

Le rétrocontrôle négatif exercé par le répresseur tétracycline tetR fusionné à la GFP sur son promoteur  $P_L \text{ tetO1}$  harmonise l'expression. En effet la variation dans l'expression du tetR-eGFP est très limitée dans les cellules où s'exerce le rétrocontrôle mais est très étendue où il ne s'exerce pas, comme le montre la distribution d'intensité de fluorescence. (Hasty et al. 2002)

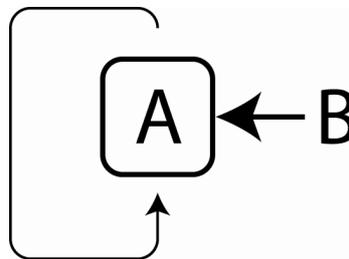


Figure I-2

Le système à rétrocontrôle positif le plus simple (Hasty et al., 2002), un élément déclencheur transitoire B (*e.g.* une hormone) active un élément A (*e.g.* une kinase) qui va alors assurer son rôle mais aussi s'auto activer afin de se maintenir actif alors que B a disparu, gardant en mémoire la présence de B. Ce type de protocole est très important lors du développement et est à la base de la spécialisation cellulaire (Lwigale and Bronner-Fraser, 2009).

Le rétrocontrôle positif apparaît lorsqu'un système est activé par son produit et est à la base des comportements dits multi-stables (Angeli et al., 2004) permettant à une fonction de se fixer dans un état et d'y rester jusqu'à ce qu'un stimulus vienne déplacer l'équilibre. Cela crée l'illusion d'un interrupteur biologique (Figure I-2). Ce type de système se retrouve à toutes les

échelles de notre monde (Figure I-3) et est à la base de beaucoup de fonctions cellulaires élégantes, notamment lors de la mise en place des mécanismes circadiens permettant aux cellules d'avoir une notion du temps (Cyran et al., 2003) ou lors du contrôle des variations de pression osmotique (Muzzey et al., 2009), comme nous le verrons plus loin.

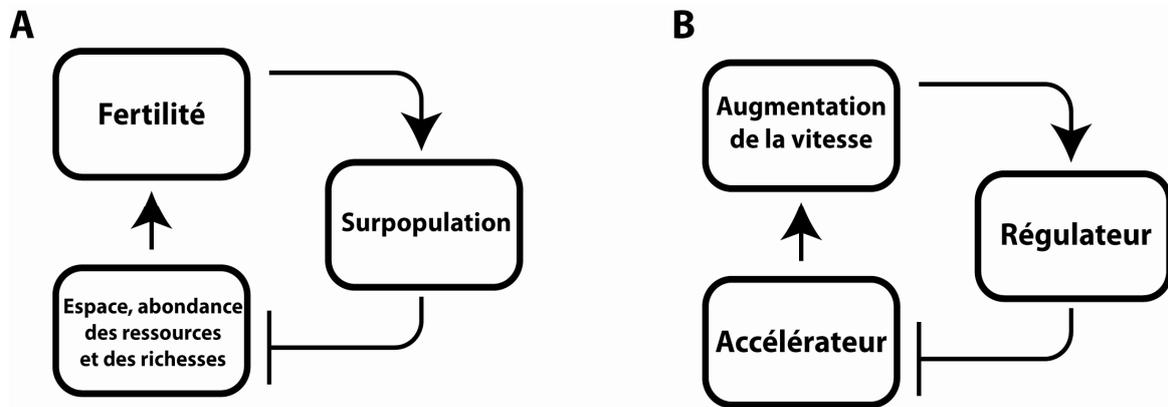


Figure I-3

A. Les études actuelles prédisent que le nombre maximal d'habitants sur la terre se stabilisera aux alentours de 9 milliards. En effet, dans les pays les plus développés, la diminution de l'espace et le partage des ressources semblent induire une baisse de la fertilité si bien que dans la majorité des pays occidentaux le renouvellement des générations n'est actuellement plus assuré (moins de 2 enfants par couples). B. Le régulateur de vitesse d'une voiture fonctionne sur le même principe ! À cette différence près que l'on peut décider de la limite à partir de laquelle l'inhibition se déclenche.

### 3. La modularité

La synergie et la hiérarchisation des systèmes moléculaires et cellulaires sont des caractéristiques biologiques de plus en plus étudiées qui nous offrent un début de compréhension des dynamiques qui créent et maintiennent la vie. Nous essayons alors de représenter ces mécanismes en tentant d'y ajouter une notion de temporalité et d'équilibre (Kitano et al., 2005). Nous voyons apparaître de nombreux schémas où les fonctions cellulaires (voies de signalisation, complexes transcriptionnels etc.) faisant partie du système étudié sont représentées sous forme de simples cubes, ou modules, reliés par des flèches retranscrivant des événements simples comme une activation ou une inhibition. Cela révèle clairement le manque criant d'informations quant aux mécanismes moléculaires exacts qui sous-tendent aux fonctions schématisées.

Néanmoins ce type de représentations trahit l'intuition que nous avons d'une organisation moléculaire à la base du concept de robustesse. Il est admis que les fonctions cellulaires émergent de réseaux de molécules, protéines, acides nucléiques, métabolites qui sont virtuellement encapsulés dans des modules fonctionnels où elles interagissent fortement entre elles mais peu avec d'autres modules (Hartwell et al., 1999; Lauffenburger, 2000). Cela va présenter de nombreux avantages, le contrôle d'une telle architecture est facilité car il suffit de contrôler les « sorties » et les « entrées » du module pour en contrôler l'ensemble. De plus, l'effet d'une mutation, par exemple, va être confiné (Albert et al., 2000) et même supporté par la redondance partielle de fonction qui peut être mise en place dans deux modules différents (Hartman et al., 2001).

Une preuve expérimentale de la présence de modules fonctionnels est l'existence de gènes synthétiques létaux chez la levure, où la délétion (mutation) de deux gènes non essentiels conduit à la mort de la cellule en abolissant une redondance de fonction mise en place entre les deux systèmes impactés (Adams et al., 1993; Costanzo et al., 2010). Cette organisation n'en est pas pour autant figée et un même composant ou sous-module peut être partagé. Nous verrons plus tard que la protéine Arc1p de levure que j'ai étudiée lors de ma thèse correspond particulièrement bien à cette définition de composant nœud assurant l'interface entre plusieurs modules (Han et al., 2004).

Ces idées ont mené à l'apparition d'un nouveau concept appelé biologie modulaire (Hartwell et al., 1999) permettant de faire l'interface entre la biologie moléculaire et la biologie cellulaire en s'intéressant à un niveau intermédiaire d'organisation. À ce niveau les objets d'études sont les fonctions cellulaires qui émergent des interactions moléculaires ainsi que la compréhension de la hiérarchisation de ces modules permettant un fonctionnement cellulaire robuste. Le tout, à mon sens, est relié par la biologie des systèmes qui s'attache à expliquer et à modéliser les lois qui régissent la dynamique de tous ces composants, qu'ils soient molécules ou modules. Elle utilise des outils théoriques adaptés à chaque niveau organisationnel comme, pêle-mêle, les équations différentielles, les fonctions de transfert, les réseaux bayésiens et d'autres concepts sur lesquels nous allons revenir.

L'étude et la modélisation des voies de signalisation et de transduction du signal sont directement issues de cette mouvance (Lauffenburger, 2000; Liberali et al., 2008) qui s'étend maintenant à toutes les grandes fonctions cellulaires comme, par exemple, la transcription ou

la traduction (Cannarozzi et al., 2010) dont on étudie le rôle en tant que fonction globale, e.g. en considérant l'impact de la vitesse de traduction sur l'expression du génome.

#### 4. De la fonction au gène plutôt que l'inverse

Un des héritages essentiels de René Descartes et de son Discours de la méthode est le principe d'analyse faisant partie des quatre préceptes de la méthode. Ainsi il faut *''diviser chacune des difficultés que j'examinerais, en autant de parcelles qu'il se pourrait, et qu'il serait requis pour les mieux résoudre''* (Descartes, 1637). Ce principe, plein de bon sens, a été et est toujours suivi par les scientifiques de tous les horizons, et plus humblement par moi-même. Pour les biologistes de la cellule (Biophysiciens, Biochimistes, biologistes moléculaire et cellulaire), cela peut se traduire par *''commence par étudier le gène et remonte vers sa fonction''*.

Cependant l'ère post-génomique nous a confirmé que le nombre de gènes d'un organisme n'est pas proportionnel à sa complexité. Si nous y ajoutons l'énorme quantité de données générées par les études à haut débit, le concept d'émergence acquiert une réalité prégnante, et ce, dans toutes les disciplines de la biologie (Perru, 2003). En effet, il est clair que la cellule est plus que la simple somme de ses parties, on ne peut prédire son comportement en analysant seulement ses sous-parties, et la connaissance de toutes ces sous-parties ne nous renseigne pas entièrement sur le comportement que la cellule va adopter (Adapté de Cohen and Stewart, 1994; Perru, 2003). En bref la connaissance des règles de base ne peut en aucun cas permettre de prédire les comportements qui émergent à un niveau organisationnel supérieur. Une bonne illustration de cette notion est donnée par l'étonnant *''jeu de la vie''* (Gardner, 1970) expliqué dans la **Figure I-4**.

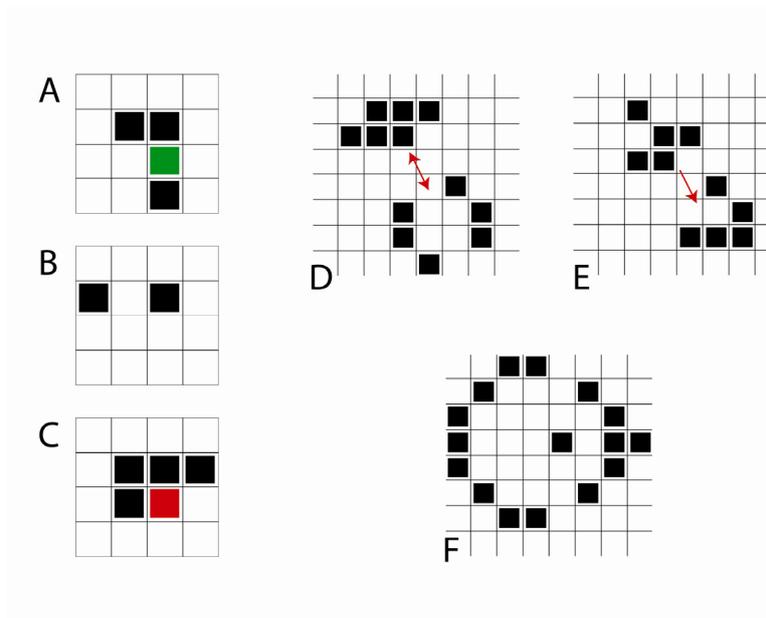


Figure I-4

Le jeu de la vie est ce que l'on appelle un automate cellulaire. Mis au point en 1970 par le mathématicien John Horton Conway (Gardner, 1970), il illustre très bien le concept d'émergence. À partir de deux règles très simples on peut voir apparaître sur un espace quadrillé des structures complexes aux comportements étonnants comme de la reproduction, de la prédation etc. *i*) Une cellule morte (vide) possédant exactement trois voisines vivantes (pleines) devient vivante au tour suivant et *ii*) une cellule vivante entourée de deux ou trois voisines vivantes se maintient, sinon elle meurt. A, B et C, illustration des deux règles au niveau le plus simple, en vert la cellule naît au tour suivant, en rouge elle meurt (la configuration en B ne génère rien). D, la plus simple des structures oscillantes parmi les milliers répertoriées et qui peut être assimilée (mangée !) par la structure en E. E est appelé vaisseau et peu se déplacer en diagonale ou horizontalement. En F, une structure appelée canon, capable de créer des vaisseaux. (Pour voir cela en mouvement à une petite échelle : <http://www.dlegland.fr/math/life/applet.html>)

Il semble alors qu'il faille prendre le contre pied de Descartes, puisque le tout ne peut plus être expliqué par la connaissance de ses plus petites parties, il faut donc l'étudier en tant que tel, sans le diviser. Il est cependant fort probable qu'avec les outils dont nous disposons aujourd'hui, Descartes aurait immédiatement saisi l'utilité d'inverser l'approche expérimentale. De plus ses qualités de mathématicien, ses travaux sur la géométrie analytique, mais surtout son apport au calcul intégral ont permis de développer les outils d'analyse et de modélisation mathématique utilisés à tous les niveaux de la biologie d'aujourd'hui.

Dans ce contexte, la notion de module en biologie de la cellule est selon moi une notion clé ou l'approche cartésienne classique, de bas en haut (Bottom-up pour les anglo-saxons) qui est celle de mon laboratoire, rejoint les approches globales, plus récente, du haut vers le bas (Top-down), créant un espace conceptuel où il devient possible de faire le lien entre les fonctions et les événements moléculaires sous-jacents pour finalement essayer d'en saisir la dynamique.

## **5. Le module, rencontre d'un mécanisme moléculaire et d'une structure sub-cellulaire.**

Ainsi, pour poursuivre mon introduction, et se rapprocher du coeur de mon sujet de thèse, il faut parler d'un paramètre essentiel pour le fonctionnement des modules : le milieu clos et restreint formé par la membrane plasmique de la cellule. Il impose d'avoir une organisation spatiale et temporelle bien précise afin de confiner les effecteurs moléculaires dans un contexte adéquat pour qu'ils produisent leurs fonctions.

Nos connaissances sur ce sujet, principalement concernant l'information spatiale, commencent à s'étoffer. L'avènement de la microscopie en fluorescence grâce à la découverte de la GFP (Chalfie et al., 1994) et de ses dérivés, récompensés d'un prix Nobel de chimie en 2008 attribué aux chercheurs Martin Chalfie, Osamu Shimomura, and Roger Y. Tsien, ainsi que l'évolution des microscopes photoniques comme le confocal, le bi photon et plus récemment le TIRF et le PALM (Brown et al.) ont permis d'associer beaucoup de fonctions à une ou plusieurs structures cellulaires. Ils ont même permis d'aller plus loin que la simple localisation subcellulaire, en expliquant comment la structure influence directement la fonction.

Par exemple, on sait maintenant que les événements majeurs de signalisation cellulaire ont lieu sur les membranes et non dans la matrice cytoplasmique (plasmique, endosomale, mitochondriale etc.) car le mouvement des partenaires est plus facilement contrôlable dans cet espace qui devient pseudo-bidimensionnel à l'échelle du nanomètre (Kholodenko et al., 2000). De la même manière il a été montré cette année que la traduction était restreinte dans certaines parties du corps cellulaire des neurones (Martin, 2010).

Nous pourrions également tirer un grand avantage de la connaissance des échelles de temps sur lesquelles s'organisent certaines tâches dans la cellule. Prenons un exemple : si nous avons connaissance du temps nécessaire à deux modules de signalisation, reliés par un de leurs composants, pour transférer l'information qu'ils sont chargés de porter, et que l'un est, par exemple, dix fois plus lent que l'autre, nous disposons directement d'une information sur leur hiérarchisation.

Ainsi, une base de données proposant une information spatiale et temporelle pour chaque type de mécanisme serait d'une très grande utilité. C'est aujourd'hui un objectif atteignable grâce au développement de biosenseurs fluorescents (Cai et al., 2008; Chuang et al., 2010), qui sont capables de retranscrire l'activation ou la variation de plusieurs phénomènes comme l'activation d'une voie de signalisation ou l'évolution du pH, de la concentration en sels etc. (Arosio et al., 2010). En observant des cellules qui expriment ces outils avec les systèmes de microscopie en temps réel, où toute une culture peut être suivie lors de sa croissance et chaque cellule observée individuellement, nous rendons la dimension temporelle accessible à la biologie cellulaire (Muzzey and van Oudenaarden, 2009).

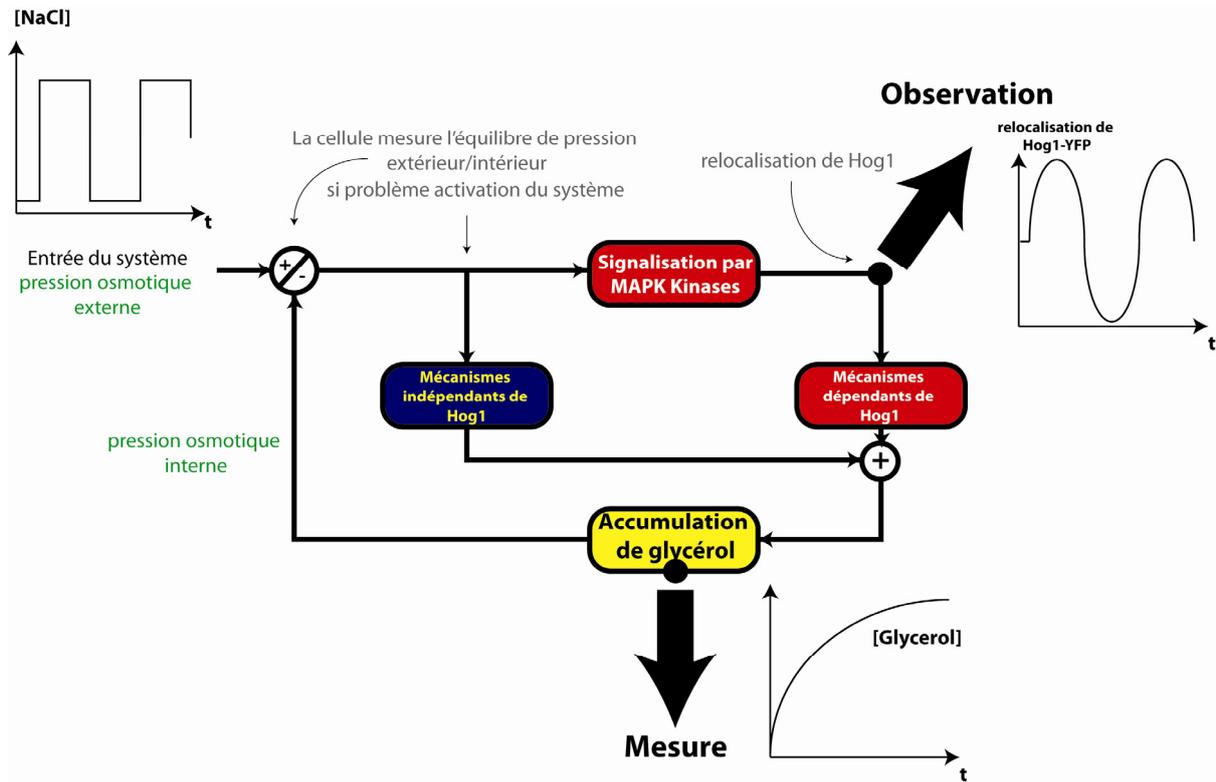
## 6. Un cas d'école

Afin d'illustrer concrètement ce qu'est une étude de biologie des systèmes et quels outils sont utilisés pour étudier les concepts que je viens d'évoquer, je vais présenter brièvement le travail d'un scientifique du MIT appelé Alexander Van Oudenaarden qui m'a profondément impressionné. Le sujet de l'étude concerne le système d'osmorégulation de la levure dont les mécanismes moléculaires sont bien définis (Muzzey et al., 2009). Les auteurs considèrent ce système comme une machine traitant une valeur d'entrée : la concentration externe en sels, pour la transformer en un signal de sortie : le rétablissement de l'osmose par production de glycérol. Ils considèrent également un point de contrôle dans le système qui est la relocalisation nucléaire du principal facteur de transcription Hog1, qui est au coeur de ce mécanisme et qui retranscrit l'activation de la voie de signalisation (Figure I-5). Ils utilisent, comme pour l'analyse d'un automate en ingénierie, les fonctions de transfert afin de déchiffrer les protocoles de ce système.

La fonction de transfert est une caractéristique mathématique propre au système qui permet de transformer le signal d'entrée en signal de sortie, c'est une notion centrale dans la modélisation des systèmes linéaires et non linéaires, et, leur nature dépend de l'architecture du système (Granjon, 2003). Un exemple simplifié en est donné lors de la diffraction des rayons X par un cristal, le rayon incident (signal d'entrée) est décomposé (cliché de diffraction, signal de sortie) selon une fonction de transfert qui est une série de Fourier portant l'information de structure du cristal.

Concrètement ils soumettent les cellules à des variations sinusoïdales de concentration en sels et enregistrent, grâce à un système de microscopie couplé à une chambre de microfluidique, la relocalisation du facteur de transcription dans le noyau ainsi que la production de glycérol pour ensuite modéliser mathématiquement cette réponse. En observant l'effet de délétions ciblées de gènes sur la réponse du système, ils isolent les sous-modules moléculaires et proposent une architecture puis une modélisation précise de l'ensemble du système.

Cette approche est un exemple de ce qui est appelé modélisation minimaliste d'un système, non pas parce qu'elle le simplifie, mais parce qu'on réduit les variables du système à son entrée et sa sortie principale. Dans ce cas, l'utilisation des fonctions de transfert est judicieuse car on retire de l'information sur l'architecture du système en observant le signal de sortie généré à partir d'un signal d'entrée imposé, c'est une sonde mathématique pour comprendre un système biologique.



**Figure I-5**

Représentation schématique du module impliqué dans la régulation de l'osmose chez la levure, du signal qui lui est appliqué pour le stimuler (la variation pulsée de [NaCl]) et des réponses qui sont enregistrées aux points stratégiques (Variation de la quantité de Hog1 dans le noyau, augmentation de la [glycérol]).

Dans un autre registre, si il faut étudier la dynamique et les équilibres d'un réseau moléculaire tel qu'une voie métabolique, nous utiliserons préférentiellement les équations différentielles, qui sont le support privilégié de ce que l'on appelle la modélisation exhaustive de systèmes prenant en compte toutes les variables existantes, concentration en partenaires moléculaires, diffusions, constantes de chaque réactions etc. Pour terminer, s'il est nécessaire de prédire un comportement, comme par exemple la capacité d'une cellule à être infectée par un virus, et que l'on ne connaît qu'une partie des paramètres cellulaires et moléculaires à la base de ce processus, l'apprentissage de réseau bayésiens s'avèrera être le meilleur outil (Snijder et al., 2009).

J'ai exposé pour commencer une partie des concepts et de la réflexion qui, en plus des discussions avec mes deux directeurs de thèse ainsi qu'avec mes collègues de laboratoire, ont influencé l'orientation de mes travaux. Je vais donc poursuivre mon introduction et vous présenter deux de ces fameux "modules" qui ont été au cœur de mon travail de recherche. Après un bref récapitulatif de la diversité des mécanismes de signalisation, je parlerai des voies de signalisation impliquées dans la régulation du métabolisme chez la levure puis de la traduction et plus particulièrement des mécanismes d'aminacylation.

## ***B. La voie Snf1/4, un module essentiel pour l'adaptation métabolique de la levure***

### **1. Les voies de signalisation**

Ce que nous appelons voies de signalisation regroupe tous les réseaux moléculaires responsables de la réception et de la transmission d'informations importantes pour la cellule. Celles-ci sont captées par un senseur à la surface ou à l'intérieur de la cellule et déclenchent une réponse adéquate par modulation de la transcription d'un ou de plusieurs gènes, activation de voies métaboliques, déclenchement de mécanismes de réparation, de dégradation, d'apoptose ou encore contrôle du cycle cellulaire etc. Le transfert de l'information se fait principalement par clivage, formation de complexes ou modification post-traductionnelle successive des différents partenaires impliqués. Ces modifications sont principalement des phosphorylations (Burnett and Kennedy, 1954), acétylations (Yang and Seto, 2008), méthylations (Grewal and Rice, 2004), ubiquitinations (Hershko and Ciechanover, 1998), ou encore SUMOylations (Hannoun et al.). Je ferais une courte introduction sur l'état des connaissances concernant ces voies dans les cellules de mammifères, car le nombre de fonctions à réguler y est le plus vaste et englobe la majorité des fonctions et concepts fondamentaux à aborder. Je me focaliserai ensuite sur les réseaux chargés de mesurer et réguler le métabolisme chez la levure, en particulier la voie Snf1/4.

#### **a) Le contrôle du métabolisme de la cellule**

Comme le sujet est vaste, les acteurs nombreux et les voies toutes reliées par un ou plusieurs partenaires, je me concentrerai sur les acteurs clés et leurs rôles classés par grandes fonctions. Nous pouvons globalement considérer qu'une cellule doit être capable de *i*) produire de l'énergie, *ii*) maintenir sa structure et son génome *iii*) se diviser et *iv*) mourir, le tout en réponse à des stimuli venant de son environnement. Maintenir et adapter la production d'énergie de la cellule implique de contrôler les principales voies métaboliques, comme la glycolyse, le cycle de Krebs, la chaîne respiratoire etc..., et donc de contrôler les gènes, les enzymes et les organites assurant ces fonctions. Trois kinases sont au cœur de ce mécanisme, mTOR (Mammalian Target Of Rapamycin; Sarbassov et al., 2005), PKA (Protein Kinase A;

Bond and Forgac, 2008) et AMPK (AMP activated protein kinase; Winder and Hardie, 1999), qui vont recevoir des informations en provenance des récepteurs adrénérgiques, à insuline mais également de la quantité d'AMP cyclique et de glucose témoignant de l'état énergétique de la cellule.

Ces voies vont stimuler, réprimer voir même stopper le métabolisme des hydrates de carbone et des lipides *via* le contrôle de l'expression de gènes clés (Hietakangas and Cohen, 2009; Lira et al., 2010) et de la biogenèse d'organites tels que les mitochondries et les peroxisomes. Ces derniers sont le siège de la production d'énergie par  $\beta$ -oxydation des lipides (Delille et al., 2009).

Ces trois acteurs principaux contrôlent des effecteurs secondaires bien connus, notamment PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor) une protéine de la famille des récepteurs nucléaires et son partenaire PGC-1 $\alpha$  (PPAR gamma coactivator 1- $\alpha$ ) qui vont, entre autre, directement activer les gènes importants pour la prolifération des peroxisomes et des mitochondries. (Misra et al., 2002; Tontonoz and Spiegelman, 2008; Wu et al., 1999).

## **b) Le maintien du génome et des composants de la cellule**

Le maintien de l'intégrité cellulaire contre les agressions externes et internes *e.g.* les radiations, composés toxiques, ou l'oxydation du matériel cellulaire par les radicaux libres, requiert la participation de nombreux mécanismes et notamment d'un système très efficace de réparation du génome.

De plus, le contrôle de l'équilibre dégradation/synthèse de processus comme le remodelage du cytosquelette, le renouvellement des membranes lipidiques, des protéines et des ARNs, garantit un contrôle dynamique de la quantité et de la qualité des composants de la cellule.

La protéine p53 (Green and Kroemer, 2009) possède un rôle central dans le maintien de l'intégrité de l'information génétique, elle est d'ailleurs la cible d'un grand nombre de modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation, ubiquitination) trahissant sa position charnière à la croisée de multiples voies. Sa dérégulation est à l'origine de nombreux cancers (Halaschek-Wiener et al., 2004) et son activité, principalement comme facteur de

transcription, est déclenchée par l'endommagement du génome ainsi que par les rayonnements de haute énergie frappant la cellule (UV, rayonnements ionisants etc.). Ceci entraîne l'activation de tout un arsenal de défense et de réparation (Vogelstein et al., 2000). C'est également un acteur essentiel dans le déclenchement de l'apoptose et le contrôle du cycle cellulaire grâce à p21/Waf1 qui une fois activée par l'action de p53 peut stopper le cycle cellulaire en phase G1 (el-Deiry et al., 1993). P53 est un parfait exemple de protéine nodale, à l'interface de plusieurs modules.

L'ancrage des structures subcellulaires ainsi que l'orchestration du trafic intracellulaire sont assurés par le cytosquelette (Kelly, 1990). Celui-ci est composé principalement d'actine se polymérisant sous l'effet du complexe Arp2/3 (Suetsugu et al., 2002) dont la fonction est modulée par deux Rhô-GTPases, Rac et cdc42. La première contrôle la polymérisation en fonction des informations provenant de l'environnement direct et relayées par les intégrines (Delon and Brown, 2007) et la seconde permet de synchroniser ce mécanisme avec le cycle cellulaire.

Le renouvellement des membranes lipidiques et de ses composants est un mécanisme essentiel qui permet d'en contrôler l'étendue, la qualité et la composition. Ce phénomène repose principalement sur l'équilibre des mécanismes d'endocytose (Liberali et al., 2008) et d'exocytose (Ammala et al., 1994; Baldwin et al., 2006). En l'état actuel des connaissances, il semble que les chefs d'orchestre principaux de ce phénomène aux multiples étapes (Snijder et al., 2009) soient les kinases FAK (Focal Adhesion Kinase; Schaller et al., 1992) et SRC (prononcer sarc, pour sarcome; Kitamura and Yoshida, 1983) qui sont impliquées dans les mécanismes d'adhésion cellulaire et d'organisation de la membrane plasmique, ainsi que les protéines impliquées dans la dynamique du cytosquelette (Arp2/3, Rac, cdc42).

En effet, les vésicules d'endocytose se forment en des points précis des membranes, le plus souvent autour de récepteurs, afin d'internaliser un ou plusieurs ligands qu'il convient de recycler ou de dégrader dans les endosomes ou dans l'appareil de Golgi. Ce mouvement intracellulaire concentrique (endocytose) et excentrique (exocytose) se fait grâce à l'ancrage des vésicules sur le cytosquelette.

Pour finir cette partie, le renouvellement des protéines est assuré par des chaperonnes telles que HSP70 (Park et al., 2007) qui vont identifier les molécules mal repliées ou endommagées

et recruter la protéine E3 de liaison à l'ubiquitine. Celle-ci va transférer de l'ubiquitine sur la protéine cible mal repliée et l'envoyer vers le protéasome (Peters et al., 1994). Le principe est similaire en ce qui concerne la dégradation des ARNs, qui est assurée par l'exosome (Mitchell et al., 1997), cependant leur adressage vers les voies de dégradation est contrôlé par de multiples éléments comme par exemple les ARE (A-U rich elements) ou encore les mécanismes d'adressage induits par les mutations non-sens (Chang et al., 2007) ou l'absence de codon stop (Vasudevan et al., 2002) au sein des ARNm.

### **c) L'apoptose**

La mort programmée de la cellule est un mécanisme complexe partagé entre le cytoplasme, la mitochondrie et le noyau ayant pour finalité la lyse et le relargage du contenu mitochondrial puis la fragmentation de l'ADN génomique sans destruction de la membrane plasmique. La mort programmée, contrairement à la mort traumatique ou à la nécrose d'une cellule, est un événement contrôlé, extrêmement important pour le développement et le maintien d'une population de cellules et d'un organisme multicellulaire (Kerr et al., 1972).

Sous l'impulsion d'un signal provenant d'un récepteur membranaire ou d'une déficience de la mitochondrie, des protéines spécifiques nommées caspases (cysteine-dependent aspartate-directed proteases; Wilson et al., 1994) vont être activées, soit par clivage ou bien par multimérisation. Cet événement déclenche le relargage et l'activation de partenaires tels que le cytochrome C, Endo-G (Li et al., 2001) ou AIF (Apoptosis Inducing Factor; Joza et al., 2009) provenant de la mitochondrie et qui vont, directement ou indirectement induire la fragmentation de l'ADN génomique et la perte des fonctions cellulaires. On retrouve également p53 qui, à partir d'une voie parallèle impliquant notamment le système BAK/BAX (Vogelstein et al., 2000), peut déclencher les mécanismes d'apoptose mitochondriaux. Il peut donc induire la mort d'une cellule si trop de mutations ont été introduites dans le génome, et assure, ainsi, son rôle de suppresseur de tumeurs.

### **d) Le contrôle du cycle cellulaire**

J'ai choisi d'aborder le contrôle du cycle cellulaire (Smith and Martin, 1973) en fin de chapitre car les effecteurs qui le contrôlent ont tous, de près ou de loin, un effet sur l'ensemble des autres fonctions. Cela se comprend facilement car certaines tâches, comme la transcription ou la traduction, doivent être stoppées pendant la phase M de mitose alors que

d'autre, comme le contrôle du cytosquelette et plus particulièrement la synthèse des microtubules, doivent rester actives.

La cellule a donc mis en place des points de contrôle avant chaque étape importante du cycle cellulaire (dans l'ordre G1, S, G2, M) (Pour une très bonne revue cf Elledge, 1996) ainsi que des systèmes de contrôles dédiés qui vont orchestrer le déroulement du cycle et contrôler la majorité des fonctions de la cellule. Le cœur du système repose sur un couple de familles de protéines, les cyclines et leurs kinases, appelées CDKs (Cyclin Dependant Kinases) qui ont valu un prix Nobel à leurs découvreurs, Leland H. Hartwell, R. Timothy (Tim) Hunt and Paul M. Nurse (Zetterberg et al., 2001). Ces dernières sont constitutives alors que l'expression des différents types de cyclines est spécifique de chaque étape du cycle cellulaire.

Ainsi, cyclines et CDKs ne sont actives que sous forme de dimère dont la nature, qui dépend de l'étape du cycle cellulaire dans laquelle la cellule se trouve, va définir le rôle et permettre ou non au cycle de se poursuivre (Woo and Poon, 2003). Ces dimères cyclines/CDKs sont contrôlés en amont par la kinase AKT (Kandel et al., 2002; Ramaswamy et al., 1999) qui contrôle l'entrée dans la phase S de réplication de l'ADN sous l'impulsion des facteurs de croissances. Cette kinase est assistée de P53 et du complexe ATM/ATR (Matsuoka et al., 2007) qui contrôlent l'entrée en Mitose *via* p21, cdc25 et cdc2 et exerce une surveillance générale en stoppant le cycle cellulaire en cas de dommages importants dans l'ADN. Cela permet aux mécanismes de réparation d'exercer leur rôle ou, s'ils sont dépassés, d'induire l'apoptose. La kinase AKT est un effecteur central pour la cellule, elle peut contrôler le métabolisme à travers l'effet régulateur qu'elle exerce sur mTOR et AMPK mais aussi inhiber l'apoptose en contrôlant l'activité de p53.

### **e) Synthèse**

Nous voyons clairement que la complexité de ces réseaux ainsi que le peu d'information que nous avons sur les protocoles régissant les interactions entre tous ces partenaires est un grand frein dans la quête d'une vision universelle des mécanismes de signalisation (Liberali et al., 2008). Nous ne pourrions pas expliquer parfaitement la dynamique et le fonctionnement de ces (ce) systèmes tant qu'ils seront confinés chacun dans un modèle coupé du reste des autres réseaux agissant au sein de la cellule. Il y a un besoin urgent de concepts communs ne

pouvant émerger que de l'étude temporelle, intégrée et non biaisée de tous ces mécanismes, permettant d'aboutir à un espace de formalisation qui ne serait influencé ni par l'historique, ni par les représentations et les techniques propres à chaque domaine, mais permettant tout de même aux chercheurs de garder leurs repères. Dans ce contexte il est intéressant de voir apparaître des projets tels que Cytoscape (Cline et al., 2007), VisANT (Hu et al., 2008) ou CellDesigner (Funahashi et al., 2007) (Figure I-6) permettant l'intégration et la modélisation des données dynamiques concernant les réseaux biologiques et qui reposent tous sur une nomenclature commune.

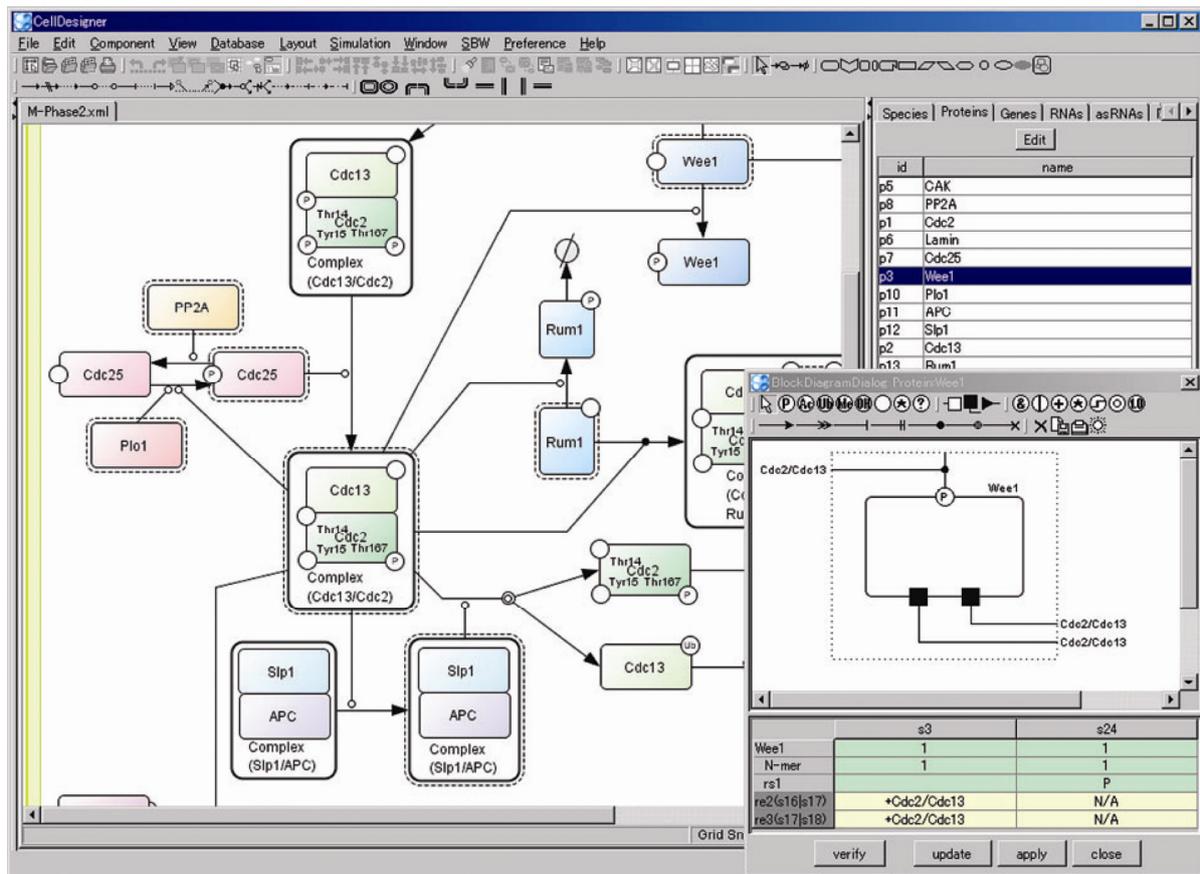


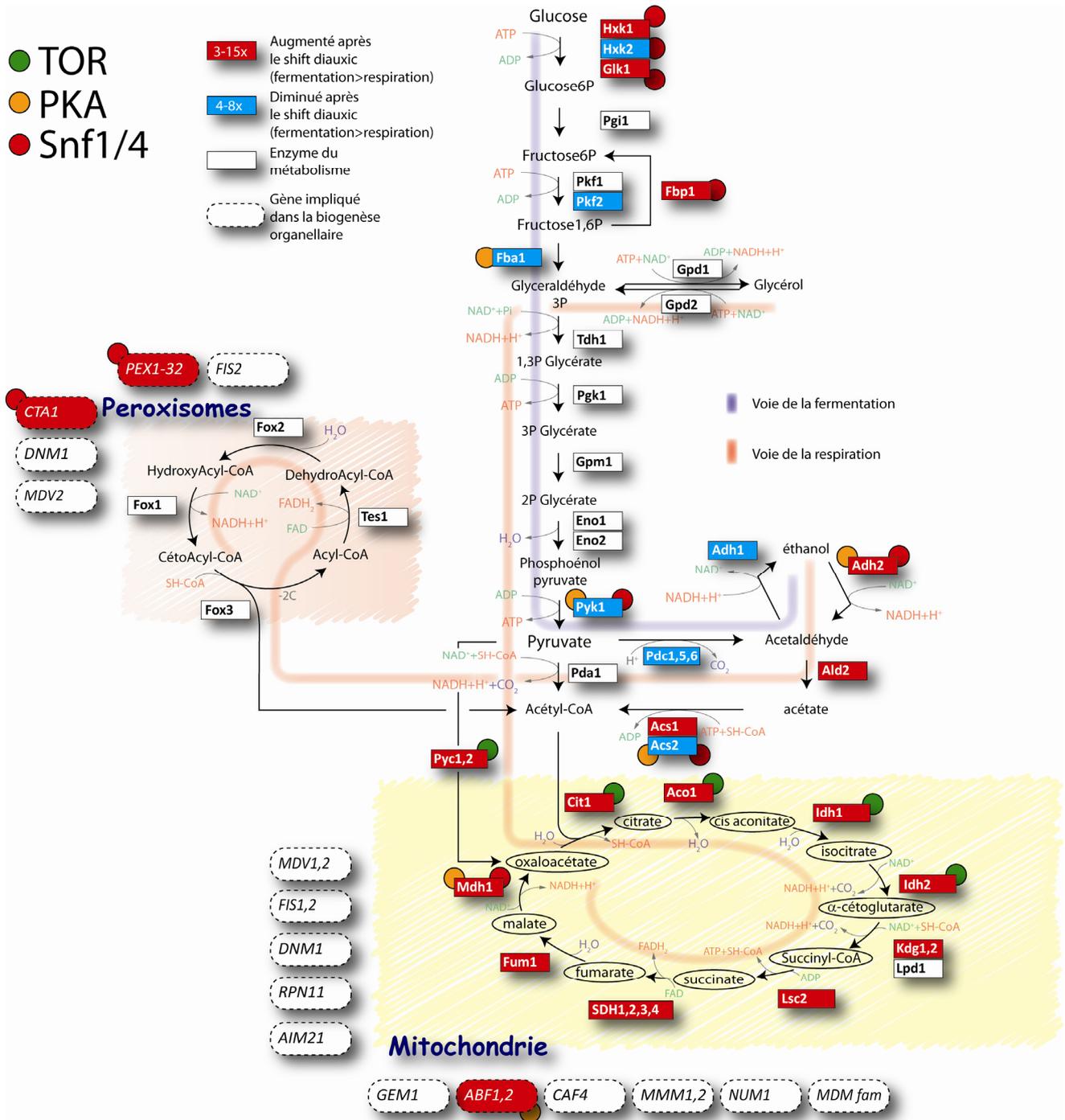
Figure I-6

Capture d'écran du logiciel CellDesigner représentant une partie du réseau de contrôle du cycle cellulaire de la levure et les principales fonctions du logiciel (Adapté de Chuang et al., 2010). Pour plus de détails concernant la nomenclature cf. (Kitano et al., 2005)

## 2. Le métabolisme de la levure et son contrôle

Mon travail de thèse s'est articulé principalement autour d'un organisme modèle, la levure *Saccharomyces cerevisiae*, un champignon unicellulaire appartenant au phylum des ascomycètes (mais ne produisant pas d'ascocarpes). Cet organisme utilise préférentiellement la fermentation pour produire son énergie (Figure I-7) dont le faible rendement est compensé par une très faible production de radicaux libres induisant peu de stress oxydatif (Maris et al., 2001). En outre, la production d'éthanol issue de ce métabolisme fermentatif lui offre un avantage dans la compétition qu'il mène avec d'autres microorganismes présents dans son biotope.

Lorsque la levure fermente, seules les voies métaboliques cytoplasmiques sont mises à contribution. Le réseau mitochondrial est alors réduit à son strict minimum (Maris et al., 2001; McBride et al., 2006) afin d'assurer les tâches essentielles qui lui échoient comme la régulation de la concentration de calcium intracellulaire (Traba et al., 2008), la formation de l' $\alpha$ -cétoglutarate, de l'acétylcœnzyme A ou encore des hèmes etc. Ces tâches sont, par ailleurs, au cœur de presque toutes les voies métaboliques de la cellule (synthèses des acides aminés, nucléotides, lipides etc.).



**Figure I-7**

La figure I-7 est un résumé des principales voies métaboliques de la levure les plus impactées par le shift diauxic. En rouge sont représentées les enzymes dont l'expression est augmentée en respiration, en bleu celles dont l'expression est augmentée en fermentation et réprimée en respiration. Sont également représentés les principaux gènes connus pour participer à la biogenèse des mitochondries et des peroxisomes. Certains gènes ou enzymes sont étiquetés d'une pastille révélant quelle voie de signalisation est à l'origine de leur régulation. Les gènes et enzymes sur fond blanc sont ceux pour lesquels il n'existe pas d'informations quant à leur régulation. La chaîne respiratoire est volontairement omise car sa régulation sera abordée lors de la description des derniers travaux effectués lors de ma thèse.

## a) Le shift diauxic

Durant la fermentation la levure utilise du glucose et le transforme en éthanol (Maris et al., 2001; Otterstedt et al., 2004). Mais alors que la quantité de glucose diminue et que la quantité d'éthanol augmente, la levure s'adapte et procède à un remaniement massif de son paysage intracellulaire tant au niveau moléculaire qu'organellaire (De Winde et al., 1996; Hohmann and Mager, 2003). Cet évènement est appelé "shift diauxic" et permet à la levure de respirer.

Il semble que la limite de concentration de glucose à atteindre soit de 0.2% (p/v) à partir d'une culture à 2% (p/v), mais cela est actuellement remis en question et semble varier d'une souche à l'autre. Les études les plus récentes portant sur les mécanismes de mesure et d'import de glucose chez la levure pointent du doigt le grand nombre de paramètres moléculaires (concentration en transporteurs membranaires Hxt chargés de l'import du glucose) et environnementaux (oxygénation, concentration en éthanol, pH...) pouvant influencer ce mécanisme (Otterstedt et al., 2004; Youk and van Oudenaarden, 2009). Lors de mon travail de thèse j'ai observé que le rapport [éthanol] / [glucose] semble avoir plus d'importance que la concentration de glucose seule, et ceci en conditions d'oxygénation optimales.

L'éthanol induit un stress progressif au cours de la culture jusqu'à devenir toxique, la levure le dégrade alors, en respirant. Il semble en effet que l'éthanol en tant que signal induise une réponse partiellement redondante mais surtout complémentaire à la réponse induite par la baisse de glucose (Ma and Liu, 2010) *via* la voie Ras/PKA dont nous allons parler ; ce qui est logique puisque ces deux composés sont étroitement liés par la fermentation et qu'il y a (idéalement) 51% de la masse de glucose transformé en éthanol, le reste étant transformé en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O (Figure I-7). En réalité, la levure produit également du glycérol et de l'acétate en quantités non négligeables lors de la fermentation. À ma connaissance, aucune étude n'a été faite sur l'importance de ces sources de carbone alternatives en tant que signal modulateur de celui provoqué par la baisse de glucose. Il est fort probable qu'une forte quantité de ces substrats uniquement respirables élève la limite du shift diauxic, néanmoins il reste à savoir dans quelle mesure ?

Nombre d'enzymes de la glycolyse/fermentation sont régulées lors du shift diauxic, ainsi, l'alcool déshydrogénase 1 (Adh1, impliquée dans la transformation de l'acétaldéhyde en éthanol) ou l'hexose kinase 2 (Hxk2) sont réprimées alors que d'autres sont fortement surexprimées, comme l'Adh2 (qui catalyse la réaction opposée à l'Adh1) ou encore la citrate synthase, une enzyme clé du cycle de Krebs catalysant la formation de citrate à partir de l'oxaloacétate et de l'acétylcoenzyme A (DeRisi et al., 1997) et bien d'autres (Figure I-7). De manière concomitante, la biogenèse mitochondriale augmente très fortement afin d'offrir suffisamment de surface d'ancrage aux partenaires de la chaîne respiratoire dont la synthèse est également activée (Hohmann and Mager, 2003). Ce remodelage massif est coordonné par trois modules principaux qui vont allier leurs efforts grâce aux interconnexions de leurs réseaux moléculaires respectifs. Ces voies sont *i)* la voie TOR qui a été identifiée pour la première fois chez la levure et dont le rôle principal est de gérer le métabolisme de l'azote, *ii)* la voie Ras/PKA, qui a un rôle global dans la régulation des grandes fonctions, traduction, transcription, cycle cellulaire etc. en fonction de l'état énergétique de la cellule grâce à l'AMP cyclique (AMPC), et enfin *iii)* la voie Snf1/4 qui garantit une adaptation précise de la levure aux sources de carbone alternatives (peu ou non fermentables) comme le galactose, le raffinose, le glycérol ou encore l'éthanol. (Pour une revue très complète cf. Zaman et al., 2008).

## **b) La voie TOR**

La voie TOR (Target Of Rapamycine) se compose d'une kinase centrale, le complexe TORC1, identifié en 1991 comme étant la cible de la rapamycine, une drogue pouvant stopper le cycle cellulaire (Heitman et al., 1991). Ce complexe est formé de cinq sous unités : Tor1, Tor2, Kog1, Lst8 et Tco89, et est inhibé par Fpr1p lorsque cette protéine est complexée à la rapamycine (Stan et al., 1994). Il est maintenant admis que son rôle principal est d'assurer le maintien du métabolisme de l'azote car son inhibition déclenche une réaction similaire à celle induite par une carence en azote (Shamji et al., 2000). Ce complexe est régulé par la concentration cellulaire de glutamate et de glutamine provenant directement du milieu ou synthétisés par l'addition successive de deux ions ammonium sur l' $\alpha$ -cétoglutarate. Ces acides aminés font office de formes de stockage de l'azote libre de la cellule.

Lorsque les conditions sont adéquates, TOR *i)* promeut la synthèse des ribosomes *via*, notamment, l'activation de Fhl1p (Marion et al., 2004), *ii)* réprime la réponse au stress *via*

Msn2 et 4 (Protéines à doigts de Zinc se liant aux séquences STRE 5'CCCCT3' et qui activent la transcription de ~200 gènes; Monteiro and Netto, 2004) et *iii*) réprime la synthèse des enzymes nécessaires à l'utilisation de sources d'azote alternatives en maintenant Gln3 dans le cytoplasme (Gln3 active la transcription de gène en reconnaissant la séquence 5'GATAAG3'; Beck and Hall, 1999). Ces effets sont transmis par la phosphorylation ou non des facteurs de transcription qui, une fois activés, peuvent se relocaliser dans le noyau et agir.

La voie TOR possède un rôle crucial dans l'adaptation à la respiration car elle régule une partie des gènes du cycle de Krebs. En effet elle possède la capacité d'induire la relocalisation du facteur de transcription Rtg1,3 qui est l'effecteur final de la voie rétrograde (Dilova et al., 2004). La voie rétrograde a pour rôle de maintenir actif une partie du cycle de Krebs, même en fermentation, afin de continuer à produire de l' $\alpha$ -cétoglutarate et tous ses dérivés, principalement le glutamate. Le complexe TORC1 épaulé également la voie Ras/PKA en activant Sch9, un homologue de la kinase humaine AKT, et en inhibant Yak1. Ces deux kinases Sch9 et Yak1 ont des rôles opposés puisque la première promeut la croissance, et l'autre la stoppe (Beck and Hall, 1999). Au final, la voie TOR semble plutôt équilibrer et harmoniser la réponse cellulaire lors d'une diminution du glucose plutôt que la contrôler réellement, principalement en ajustant le cycle de Krebs, très actif en respiration, avec le métabolisme de l'azote.

Il faut noter qu'une seconde voie TOR, basée sur le complexe TORC2, existe chez la levure. Ce complexe, découvert récemment, ne partage que la sous unité Tor2 avec TORC1 et n'est donc pas sensible à la rapamycine. Son rôle semble être dédié au contrôle du cytosquelette d'actine et des mécanismes d'endocytose, deux systèmes étroitement reliés (Kamada et al., 2005).

### **c) La voie Ras/PKA**

La voie Ras/PKA se compose, à la manière de la voie TOR, d'un complexe central nommé Protein Kinase A (PKA). Sous sa forme inactive, PKA est formé de quatre sous unités : Tpk1, -2 et -3 ainsi que d'un partenaire régulateur Bcy1 (Toda et al., 1987). Lorsque l'énergie de la cellule baisse, l'AMP est transformée en AMP cyclique (AMPc) par l'adénylate cyclase Cyr1. L'AMPc se fixe à Bcy1 provoquant la dissociation du complexe en monomères actifs. On retrouve à ce niveau un mécanisme intéressant de double rétrocontrôle négatif, tout d'abord

les monomères actifs peuvent phosphoryler la sous unité régulatrice Bcy1 et augmenter ainsi, l'affinité de cette sous unité pour les monomères actifs. De plus, ces mêmes monomères Tpk1, -2 et -3 activent les phosphodiésterases Pde1 et -2 qui transforment l'AMPc en AMP (Ma et al., 1999). Ainsi ces deux phénomènes poussent la voie PKA à s'inactiver en forçant la sous unité Bcy1 à reformer un tétramère avec les trois protéines Tpk. Cela garantit un fonctionnement stable de la voie PKA et un retour rapide à l'équilibre.

Le rôle de la voie PKA est lui aussi global et sert à maintenir un taux d'ATP suffisant dans la cellule, tout comme TOR sert à maintenir une quantité suffisante d'azote. Sous sa forme active, la voie PKA inhibe les gènes de la phase stationnaire *via* l'inhibition du facteur de transcription Rim15 (Reinders et al., 1998) et promeut la croissance cellulaire en utilisant notamment les réseaux de la voie TOR (*via* Sch9) où ils exercent leurs rôles en synergie. Ces deux voies exercent une surveillance globale et adaptent la levure aux variations de sources de nutriments au sens large du terme, en se servant principalement d'indicateurs internes comme la concentration en glutamine ou en AMPc. Nous allons voir que la voie Snf1/4 exerce un rôle beaucoup plus précis dans l'adaptation de la levure à des sources de carbone alternatives.

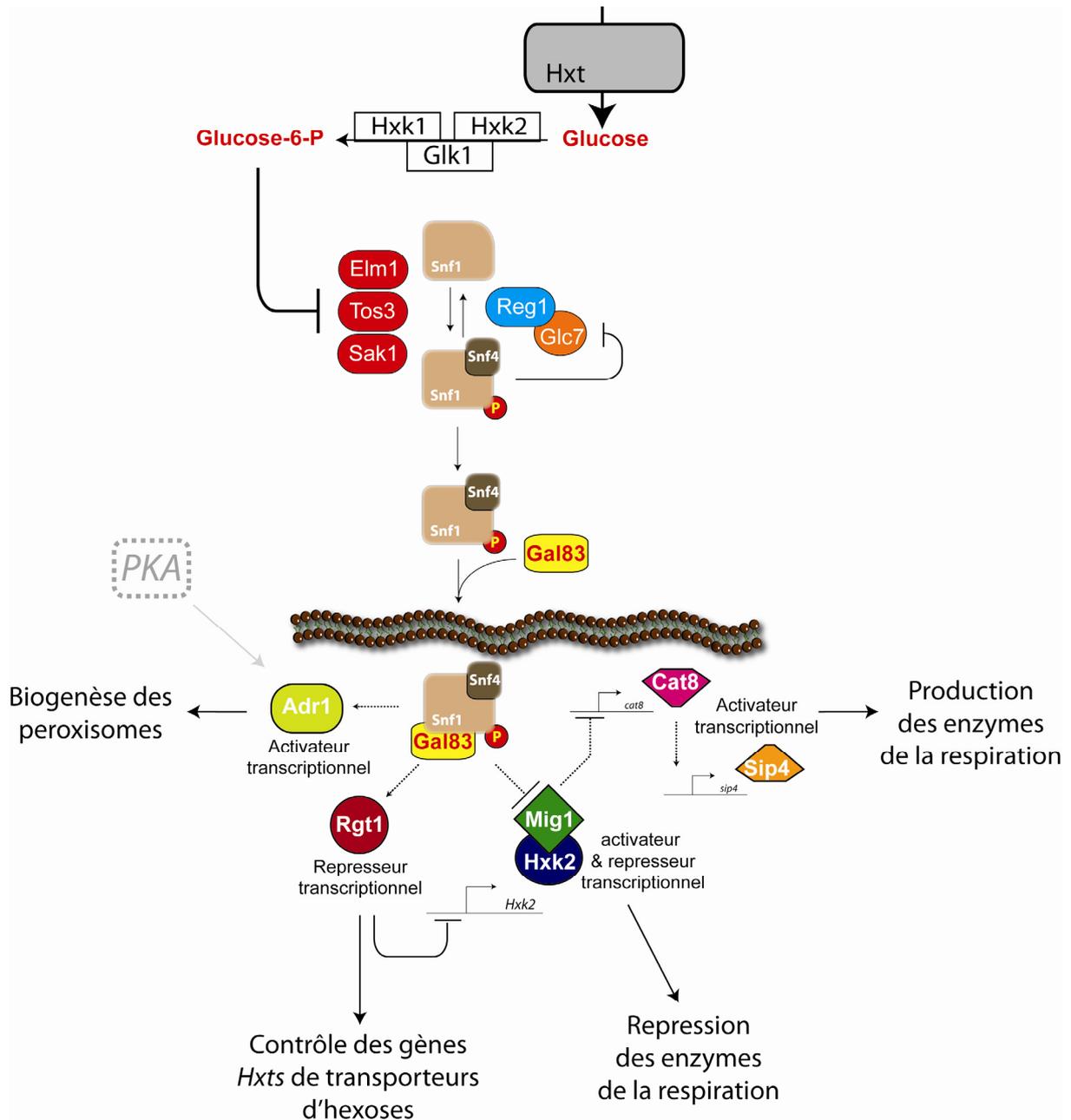
### **3. La voie Snf1/4, structure et dynamique**

La voie Snf1/4 (Snf pour Sucrose non fermenting) a été identifiée grâce à des souches de levure mutantes dans ces deux gènes. Celles-ci se caractérisaient par une incapacité à utiliser une autre source de carbone que le glucose (Ciriacy, 1977). Elle est l'homologue fonctionnel de la voie AMPK des mammifères et son rôle dans la capacité de la levure à changer de métabolisme est essentiel (Woods et al., 1994).

En effet, si les voies TOR et PKA répondent à des signaux globaux et, en retour, ralentissent ou accélèrent les grands systèmes comme le cycle cellulaire, la traduction, la transcription, ou déclenchent des mécanismes tels que l'apoptose ou la biogenèse des mitochondries, la voie Snf1/4 (Figure I-8) agit de manière beaucoup plus ciblée et crée le contexte moléculaire et cellulaire nécessaire aux deux autres voies pour fonctionner (Hardie et al., 1998; Zaman et al., 2008). En réponse à un signal très précis : le type de source de carbone, elle va induire la production ou l'inhibition des enzymes clés permettant au reste de la cellule de s'adapter à la respiration, en produisant par exemple les transporteurs membranaires adaptés à d'autres sources de carbone, en diminuant l'expression de certaines enzymes clé de la glycolyse comme Hxk2 ou encore en déclenchant la biogenèse des peroxisomes (Simon et al., 1992).

#### **a) Partenaires et dynamiques de la voie Snf1/4**

En présence de grandes quantités de glucose, les transporteurs membranaires Hxt1 et 3 sont les principales portes d'entrée du glucose (Lewis and Bisson, 1991; Ozcan and Johnston, 1999). Une fois dans le cytoplasme, ce sucre est phosphorylé par les enzymes Hxk1, -2 et Glk1 toutes trois capables de former du glucose-6P. Ce composé inhibe alors les trois kinases Sak1, Elm1 et Tos3 dont le rôle est de phosphoryler Snf1 sur la thréonine 210 (Hong et al., 2003). Ainsi, lorsque la concentration de glucose diminue, l'inhibition des trois kinases est levée et Snf1 est phosphorylé. Il peut alors former trois complexes hétérotrimériques différents composés systématiquement de Snf4 et de Gal83, Sip1 ou -2 comme troisième partenaire. Snf1 est la sous unité catalytique du complexe alors que Snf4 module l'activité auto inhibitrice de la partie C-terminale de Snf1 (Jiang and Carlson, 1997; Kim et al., 2005).



**Figure I-8**

La voie Snf1/4 et son action dans le noyau. En respiration, Snf1 se relocalise dans le noyau et inhibe notamment Mig1/Hxk2. Par l'inactivation de ce facteur de transcription qui normalement réprime les acteurs de la respiration, Snf1 active l'adaptation à la respiration.

Après avoir été phosphorylé, Snf1 se relocalise dans le noyau s'il se lie à Gal83. Avec Sip1 le trimère se relocalise dans la vacuole, alors qu'il reste dans le cytoplasme s'il est en complexe avec Sip2 (Vincent et al., 2001). Le rôle des trimère contenant Sip1 ou Sip2 n'est pas clair il semblerait cependant, qu'en faisant varier la localisation cellulaire de Snf1, ils focalisent

l'activité du complexe sur des cibles regroupées aux endroits idoines (activation par phosphorylation d'enzymes du métabolisme etc.). Enfin, le complexe Reg1/Glc7 est chargé (entre-autre) de déphosphoryler Snf1 et donc d'éteindre la voie lorsque le glucose est en quantités suffisantes (Tu and Carlson, 1995).

Sous sa forme active et nucléaire, Snf1 phosphoryle et contrôle principalement cinq facteurs de transcription. Il inhibe Mig1, en complexe avec l'hexose kinase 2 (Hxk2) qui peut se localiser dans le noyau (Ahuatzi et al., 2007), et active Adr1 (également cible de la voie Ras/PKA), Sip4, Cat8 et enfin Rgt1 (Schuller, 2003; Vallier and Carlson, 1994).

Lorsque le glucose est abondant, Mig1 est localisé dans le noyau sous sa forme non phosphorylée et exerce majoritairement une inhibition (moins fréquemment une activation) de la transcription d'environ 90 gènes *e.g.* les gènes *GAL*, *MAL* (utilisation du galactose et maltose) ou de transporteurs membranaires de sources alternatives de carbone. Il se fixe directement sur l'ADN en ciblant les séquences du type 5' YGGGG 3'. Lorsque la quantité de glucose diminue et que Snf1 se relocalise dans le noyau, Mig1 est phosphorylé et exporté dans le cytoplasme, ce qui stoppe le mécanisme de répression (Carlson, 1999).

Adr1 est un activateur transcriptionnel se liant directement à l'ADN et est responsable de la mise en place du métabolisme de l'éthanol ainsi que de la  $\beta$ -oxydation des lipides au niveau des peroxisomes. Il semble contrôler ~100 gènes (son site de fixation est 5'GGRGK3'). Une fois activé par Snf1 *via* un mécanisme encore non déterminé, il promeut l'expression de gènes comme *ADH2*, codant pour l'enzyme permettant de réintégrer l'éthanol dans le cycle de Krebs, ou *PEX1*, impliqué dans la formation des membranes des peroxisomes (Tachibana et al., 2005). Sip4 et Cat8 sont également des activateurs transcriptionnels dont le rôle est d'activer environ une cinquantaine de gènes impliqués dans la néoglucogenèse en se fixant directement sur les éléments CSRE (pour carbone source response elements : 5'TCCGGA3'). Un exemple de gène cible est *PCK1*, codant pour la phosphoénolpyruvate (PEP) carboxykinase et qui catalyse la transformation de l'oxaloacétate en PEP. Enfin, Rgt1 est un répresseur de la transcription de gènes, tels que *Hxk2*, impliqués dans le métabolisme du glucose et qui doivent être réprimés lorsque le glucose vient à manquer (Roth et al., 2004; Schuller, 2003).

## **b) Protocoles internes et mécanismes de modulation**

Il semble que l'AMP soit capable d'augmenter l'activité du complexe Snf1/4 par fixation directe sur la sous unité Snf4, ce qui stabilise la forme phosphorylée de Snf1 et ajoute un niveau de contrôle supplémentaire dans la voie. Nous pouvons également noter la présence d'un mécanisme de rétrocontrôle positif au même niveau, puisque la forme active de Snf1 est capable d'inhiber le complexe Reg1/Glc7 qui ne peut plus, en retour, déphosphoryler Snf1. Snf1 stoppe sa propre inhibition (Tu and Carlson, 1995) afin d'assurer une activation rapide de la voie. Au niveau transcriptionnel, il est intéressant de constater que les facteurs de transcription ciblés par Snf1 tissent un réseau d'autocontrôle : Mig1 est capable d'inhiber la transcription de Cat8 qui lui-même contrôle Sip4. Rgt1 quant à lui inhibe la transcription de Hxk2, or Hxk2 est essentiel pour l'activité de Mig1, puisqu'ils forment à eux deux la forme active Mig1/Hxk2. Ainsi en activant Rgt1, Snf1 renforce la répression de Mig1 en agissant non seulement directement par phosphorylation mais aussi au niveau transcriptionnel en diminuant la quantité d'Hxk2.

## **4. Perspectives**

Même si les connaissances sur ces voies d'adaptation aux changements de nutriments semblent conséquentes, il reste énormément de vides à combler. Ainsi, les réseaux moléculaires responsables du relais de l'information en amont des trois grands complexes Snf1/4, TOR et Ras/PKA sont très peu caractérisés. De plus, l'impact de ces voies sur des mécanismes tels que la formation des aminoacyl-ARNts essentiels pour la traduction, ou encore la formation de complexes comme celui de la chaîne respiratoire restent à déterminer.

Une avancée majeure dans la compréhension de ces mécanismes pourrait être faite grâce à l'émergence des techniques de deep-sequencing couplées à l'utilisation de bibliothèques d'organismes mutants ou KO permettant de quantifier de manière absolue et rapide l'ensemble du transcriptome d'une souche. La sensibilité de cette approche est équivalente à celle de la PCR quantitative, ce qui représente un grand avantage en comparaison des puces à ADN dont la dynamique de résolution est souvent plus faible et le traitement du signal plus compliqué. Ce genre d'approches permettrait de mieux comprendre l'impact transcriptionnel global de chaque composant des voies de signalisation. Un autre développement intéressant

chez la levure, est l'utilisation de logiciels de traitement de l'image permettant d'avoir accès à l'efficacité de croissance à partir de la taille des colonies sur milieu solide. Une étude élégante (Costanzo et al., 2010) proposant une classification fonctionnelle de 75% des gènes de la levure a été publiée en Janvier de cette année, basée sur l'analyse des interactions génétiques de 5,4 millions de paires de gènes non essentiels (!). Les conclusions de ce travail reposent évidemment sur l'observation de phénotypes de létalité synthétique (deux gènes non essentiels entraînent la mort de la cellule s'ils sont tous deux inactivés), mais aussi sur l'efficacité de croissance synthétique définie par la taille des colonies que forment les souches mutées. Ce paramètre a été mesuré de manière automatisée pour chaque couple de gènes inactivés non létaux grâce au logiciel CellProfiler (Carpenter et al., 2006).

L'étude des voies de signalisation chez la levure est d'une grande utilité pour la compréhension de nombreuses pathologies car les concepts de base des voies de signalisation humaines sont, en l'état actuel des choses, tous présents chez cet organisme beaucoup plus facilement manipulable. L'inhibiteur de la voie TOR par exemple, la rapamycine, est aujourd'hui utilisé comme médicament anti-rejet, ou encore comme anti-inflammatoire dans des pathologies lourdes comme des myopathies inflammatoires. De plus, la capacité de la levure à passer d'un métabolisme aérobie à la fermentation mime parfaitement l'effet Warburg. Cet effet, mis en évidence en 1956, est à la base de tous les mécanismes de transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse (Warburg, 1956) et a valu un prix Nobel à son découvreur : Otto Heinrich Warburg. En effet, une cellule cancéreuse n'utilise quasiment plus que la glycolyse pour produire son énergie, *via* la fermentation lactique, et réprime le fonctionnement mitochondrial à la manière d'une levure se réadaptant à la fermentation, permettant aux tumeurs de se développer dans des tissus faiblement oxygénés (Vander Heiden et al., 2009).

### ***C. L'aminocyclation, un module clé pour le respect du code génétique***

La traduction est un mécanisme extrêmement élaboré, chargé de transformer l'information portée par les ARN messagers (ARNm) en effecteurs protéiques. De fait, ce mécanisme est gourmand en énergie. Il convient donc de contrôler la traduction et tous les sous-mécanismes qui la compose, de manière stricte et rigoureuse. Je vais tout d'abord présenter les

mécanismes de base de la traduction ainsi que la structure moléculaire du ribosome. Je me concentrerai ensuite sur les mécanismes responsables de la synthèse des aminoacyl-ARNts, les molécules adaptatrices permettant de faire la correspondance entre les codons de l'ARNm et les acides aminés de la protéine qu'il code en traitant principalement le système eucaryotique cytoplasmique et organellaire. Je terminerai en abordant les concepts émergents quant à la régulation de la traduction ainsi que l'apport de mon travail de thèse qui m'a amené à découvrir un nouveau mécanisme de contrôle des fonctions secondaires des aminoacyl-ARNt synthétases.

## **1. Le mécanisme de la traduction**

### **a) Les ribosomes eucaryotique et organellaire**

Le ribosome des eucaryotes est un complexe ribonucléoprotéique catalysant la formation de la liaison peptidique entre les acides aminés des protéines. La polymérisation des acides aminés est faite selon la séquence imposée par l'ARN messenger (ARNm) sur lequel le ribosome est fixé. Ce mécanisme élaboré nécessite une machine moléculaire complexe. Ainsi, le ribosome eucaryotique complet 80S (S pour Svedberg, unité de mesure du coefficient de sédimentation) se compose de quatre ARNs ribosomiques (ARNr) et de quatre-vingt cinq protéines. Il se décompose en deux sous-unités, la 40S et la 60S. La 40S ou petite sous-unité est formée de l'ARNr 18S et de 33 protéines, la 60S des ARNr 28S, 5,8S et 5S et de 45 protéines. Il faut noter que le nombre de protéines associées au ribosome peut varier énormément et qu'elles sont impliquées dans beaucoup de fonctions secondaires. Chez les mammifères, la protéine S6, par exemple, participe aux mécanismes d'apoptose (Jeon et al., 2008), S3 participe à l'expression de gènes (Wan et al., 2007), et L13a à la modulation de la réponse inflammatoire (Mazumder et al., 2003). Leurs rôles au niveau du ribosome n'est pas encore entièrement résolu, mais il semble, au vu des informations apportées par la biologie structurale, qu'il soit principalement de maintenir l'intégrité structurale du ribosome et de réguler son assemblage (Ban et al., 2000; Yusupov et al., 2001). Le ribosome actif serait donc également un réservoir de stockage de protéines multifonctionnelles. Le cœur du 80S, formé des sites A (Aminoacyl-ARNt), P (Peptidyl-ARNt) et E (Exit) et l'interface 40S/60S permettant d'accueillir l'ARNm, sont entièrement composés d'ARN comme chez le ribosome bactérien (Nissen et al., 2000).

Enfin, chez la levure, trois facteurs de transcription contrôlés par la voie TOR, Fhl1, Ifh1 et Crf1p, vont à la fois réguler la transcription des ARNr, par l'ARN polymérase I, et celle des protéines ribosomiques, par l'ARN polymérase II, afin d'adapter la traduction aux réserves d'énergie disponibles (Pour une revue très complète sur ce sujet émergent; Xiao and Grove, 2009).

Le ribosome mitochondrial ou mitoribosome se distingue de son homologue cytoplasmique par beaucoup d'aspects. Tout d'abord, il possède un ratio protéine/ARNr inversé (69/31 contre 33/67) et est plus dense (55S chez l'humain, 70S chez la levure). Il diffère également par sa composition en nombre d'ARNr et de protéines, le mitoribosome des mammifères est formé de deux sous unités, la 28S (ARNr 12s plus 33 protéines) et 39S (ARNr 16S plus 48 protéines). Il est à noter que pour la majorité des eucaryotes, l'ARNr 5S est importé dans la mitochondrie (Smirnov et al., 2008; Yoshionari et al., 1994), qu'il ne fait pas partie du ribosome mitochondrial et que sa fonction précise reste inconnue ! Le 12S et le 16S sont codés par le génome mitochondrial et les protéines sont, dans leur immense majorité, codées par le génome nucléaire (certaines plantes ont des gènes de protéines ribosomiques dans leur génome mitochondrial (Mower and Bonen, 2009), la levure encode une protéine de la 28S dans le génome mitochondrial). L'hypothèse consensuelle veut que cette évolution vers un ribosome plus protéique dans la mitochondrie serait un moyen de protéger les ARNr du stress oxydatif de la matrice (Sharma et al., 2003).

	Coefficient de sédimentation et masse	ARN ribosomiques	Protéines ribosomiques
<b>Ribosome cytoplasmique eucaryote</b>	80S, 4220 kDa		
Petite sous unité	40S, 1400 kDa	18S, 1874 nts 700 kDa	33 700 kDa
Grande sous unité	60S, 2820 kDa	28S, 4718 nts; 5,8S, 160 nts; 5S, 120 nts 1820 kDa	49 1000 kDa
<b>Ribosome mitochondrial eucaryote (Humain)</b>	55S, 2640 kDa		
Petite sous unité	28S, 1040 kDa	12S, 954 nts 320 kDa	33 720 kDa
Grande sous unité	39S, 1600 kDa	16S, 1558 nts 520 kDa	48 ~1000 kDa

**Figure I-9**

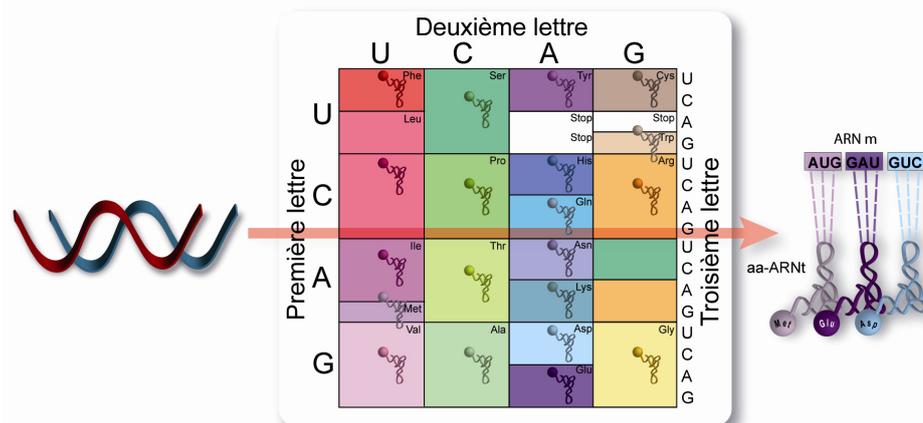
Récapitulatif de la composition des ribosomes cytoplasmique et mitochondrial

## **b) L'expression de l'information génétique.**

Le mécanisme de la traduction repose sur un code fondamental qui permet d'exprimer sous forme protéique l'information stockée sur l'ARNm. Cette loi a été mise à jour grâce aux travaux de Marshall Nirenberg, Heinrich Matthaei, Har Gobind Khorana et Robert Holley au début des années soixante (Matthaei et al., 1962; Nirenberg et al., 1962; Soll et al., 1965). Comme les premiers codes établis se sont avérés être identiques ce code génétique a été qualifié d'universel et c'est pourquoi ses découvreurs ont émis l'hypothèse qu'il était apparu une fois au cours de l'évolution et était resté inchangé depuis, c'est l'hypothèse du "frozen accident" (accident figé ; (Crick, 1968). L'aspect immuable du code génétique tirait son origine du fait que tout changement de ce code conduirait à l'altération de la signification des codons et à l'introduction d'erreurs lors de la traduction de chaque ARN messenger (ARNm). Il est cependant maintenant établi que ce code n'est pas tout à fait universel et qu'il existe des transgressions du code universel, la plus commune étant celle du codon STOP opale (UGA) qui correspond au tryptophane (W) dans quasiment tous les codes génétiques mitochondriaux.

Au travers de ce code génétique, la cellule associe à chacun des 20 acides aminés trouvés classiquement dans les protéines (il existe en tout 22 acides aminés qui peuvent être codés par le code génétique) un triplet de trois bases appelées codon. Ce système autorise  $4^3$  soit 64 combinaisons réparties de la manière suivante: 61 des 64 codons codent pour un acide aminé, les trois derniers codons UAA (ochre), UGA (opale) et UAG (ambre) ne correspondent à aucun acide aminé et servent à indiquer la fin d'une phase codante. Cependant les codons opale, UGA, et ambre, UAG, sont utilisés, chez certains organismes pour coder respectivement les 21<sup>ème</sup> et 22<sup>ème</sup> acides aminés du code que sont respectivement la sélénocystéine et la pyrrolysine.

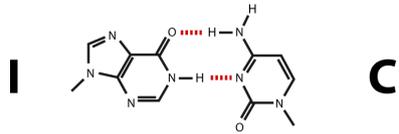
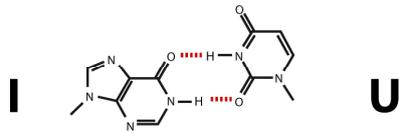
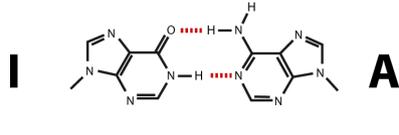
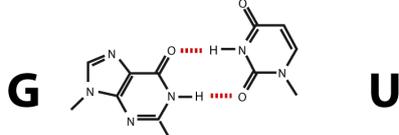
Le codon méthionine AUG est toujours utilisé pour indiquer le début d'une phase codante (avec alternativement GUG et UUG pour les bactéries). Comme vous pouvez le voir sur la **Figure I-10**, plusieurs codons peuvent spécifier le même acide aminé. Cette dégénérescence, qui concerne majoritairement la troisième base du codon, induit un effet tampon permettant de supporter un certain nombre de mutations (La robustesse au niveau le plus élémentaire !). Dans la même logique, les acides aminés de même propriétés physico-chimiques sont codés par des codons proches, ce qui permet de supporter plus facilement certaines substitutions d'acides aminés en augmentant la probabilité de maintenir la fonction de la protéine dont l'ARNm aurait été muté.



**Figure I-10**

Le déchiffrement de ce code est assuré par les ARNs de transfert (ARNt) que nous aborderons plus longuement dans un chapitre spécifique. Chaque acide aminé est fixé sur un ou un groupe d'ARNt isoaccepteurs homologue(s) qui, grâce à son (leurs) anticodon(s), va (vont)

assurer le décodage du codon correspondant au sein du ribosome. Chez les eucaryotes, et l'Homme en particulier, il y a 48 ARNt (avec un anticodon différent) alors qu'il y a 62 codons à déchiffrer (61 plus le codon UGA codant la sélénocystéine). Cette insuffisance apparente en ARNt est palliée par le phénomène de "wobble pairing" (Crick, 1966) ou appariement flottant (concernant 16 des 48 ARNt), permettant à la première base du triplet de l'anticodon (s'il s'agit d'un G ou U) de s'apparier avec 2 bases de nature différente située en dernière position du codon ( respectivement C/A et A/G). Grâce à ce système un même ARNt peut reconnaître 2 codons différents et lorsque la première base de l'anticodon (position 34 de l'ARNt) est modifiée posttranscriptionnellement en inosine, par exemple, sa capacité de décodage peut aller jusqu'à 3 codons différents (Figure I-11).

Première base de l'anticodon de 5' vers 3'	Dernière base du codon de 5' vers 3'	
<b>G</b>	<b>U,C</b>	
<b>C</b>	<b>G</b>	
<b>k<sup>2</sup>C</b>	<b>A</b>	
<b>A</b>	<b>U,C,G,(A)</b>	
<b>U non modifié</b>	<b>U,(C),G,A</b>	
<b>xm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U xm<sup>5</sup>U xm<sup>5</sup>Um Um</b>	<b>A,G</b>	
<b>xo<sup>5</sup>U</b>	<b>U,A,G</b>	
<b>I</b>	<b>A,C,U</b>	

**Figure I-11**

Ce tableau représente les interactions possibles entre la base en 5' de l'anticodon de l'ARN de transfert (position 34 de l'ARNt) et la base en 3' du codon de l'ARN messager. Les paires "wobble" sont en rouge. La modification de la base 34 de l'ARNt se fait après transcription et implique des enzymes d'hyper modification spécifiques (Agris et al., 2007). Nous pouvons ajouter que la modification de la position 37 de l'ARNt en 3' de

l'anticodon (sur une purine) est essentielle et met celui-ci dans les bonnes conditions pour que le "wobble" s'opère (Ogle and Ramakrishnan, 2005; Yarus, 1982).

La sélénocystéine et la pyrrolysine, les 21 et 22èmes acides aminés du vivant, sont un cas particulier de réassignation de la capacité codante d'un codon (Berry et al., 1991; Cone et al., 1976; Srinivasan et al., 2002) puisqu'ils sont codés respectivement par des codons STOP. L'utilisation d'un codon STOP pour coder un acide aminé nécessite que l'ARN messenger présente des caractéristiques structurelles spécifiques sur lesquelles nous reviendrons. La sélénocystéine se retrouve dans tout le vivant excepté chez la levure et certaines algues rouges, la pyrrolysine n'a été trouvée que chez certaines archaebactéries méthanogènes et une bactérie (en l'état actuel des connaissances) (Hao et al., 2002).

### **c) Les étapes de la traduction eucaryotique**

#### ***(1) L'initiation***

L'ARN messenger eucaryotique standard se caractérise par la présence d'une séquence poly-Adénine à son extrémité 3' et d'une coiffe (un méthyl-7-guanosine triphosphate, m7Gppp) à son extrémité 5'. Des protéines spécifiques se fixent sur chacune de ces structures, les PABP (polyA binding protein) forment un chapelet en 3' alors qu'en 5', eIF4E, G, A et B se fixent autour de la coiffe (eIF, eukaryotic initiation factor). Les PABP interagissent avec eIF4G de manière à circulariser l'ARNm. Cette forme est un signal pour l'export de l'ARNm hors du noyau, assure sa stabilité dans le cytoplasme (Brown, 1993) et est nécessaire à l'initiation de la traduction dite coiffe-dépendante.

Lors de l'initiation de la traduction, la sous-unité 40S du ribosome devient le complexe de pré-initiation 43S en se fixant à eIF1, 1A, 3 et 5. La présence de ces protéines empêche la reformation du 80S. Le méthionyl-ARNt<sup>Méthionine</sup> initiateur (Met-ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup>) est alors recruté sur le complexe 43S lorsque son cargo, eIF2, s'y fixe.

Le complexe de pré-initiation 43S se fixe ensuite sur l'ARNm circularisé *via* l'interaction entre eIF3 (côté 43S) et eIF4G (côté ARNm circulaire). Dans ce nouveau complexe formé, eIF4A, une hélicase ARN-dépendante, facilite la fixation de la partie 43S en abolissant les

structures secondaires de l'ARNm puis hydrolyse son ATP, marquant le départ du mécanisme de scanning.

Ce phénomène permet au 43S de progresser le long de la séquence 5' non traduite de l'ARNm et le mène vers son but, l'AUG initiateur, stoppé uniquement par une structure secondaire de l'ARNm ayant le rôle de butoir et placée judicieusement en aval de l'AUG (Pestova and Kolupaeva, 2002). eIF1 et 1A participent alors à la sélection du bon AUG (Saini et al., 2010) et l'ARNr 18S ancre le complexe d'initiation à l'ARNm en formant une double hélice avec la séquence de Kozack, 14 nucléotides en amont de l'AUG (séquence consensus de Kozak : A/GCCGCC) (Kozak, 1987).

Au même moment, les protéines de la coiffe se détachent et le complexe 43S/Met-ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup>/ARNm peut se former (Cigan et al., 1988) ce qui déclenche l'hydrolyse du GTP de eIF2. Toutes les protéines fixées à la sous unité 40S s'en détachent et il ne reste que eIF1A et 5B-GTP arrivé là pour faciliter la dissociation des facteurs d'initiation. Enfin, une dernière hydrolyse de GTP permet à ces deux protéines de s'en aller. La grosse sous-unité 60S peut alors se fixer sur la 40S portant le Met-ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup> qui est en interaction avec le codon AUG de l'ARNm et former le complexe d'initiation 80S prêt à débiter la phase d'élongation (Pestova and Kolupaeva, 2002).

Il existe également d'autres mécanismes d'initiation comme *i*) l'initiation coiffe-indépendante basée sur une structure secondaire spécifique dans l'ARN messager appelée IRES (Internal Ribosome Entry Site; Pelletier and Sonenberg, 1988) ou encore *ii*) le Shunt où le ribosome "saute" une structure secondaire trop stable lors du scanning coiffe-dépendant pour initier la traduction au niveau d'un AUG en aval (Ryabova et al., 2002). Ces stratégies sont principalement utilisées pour la traduction des ARN de virus.

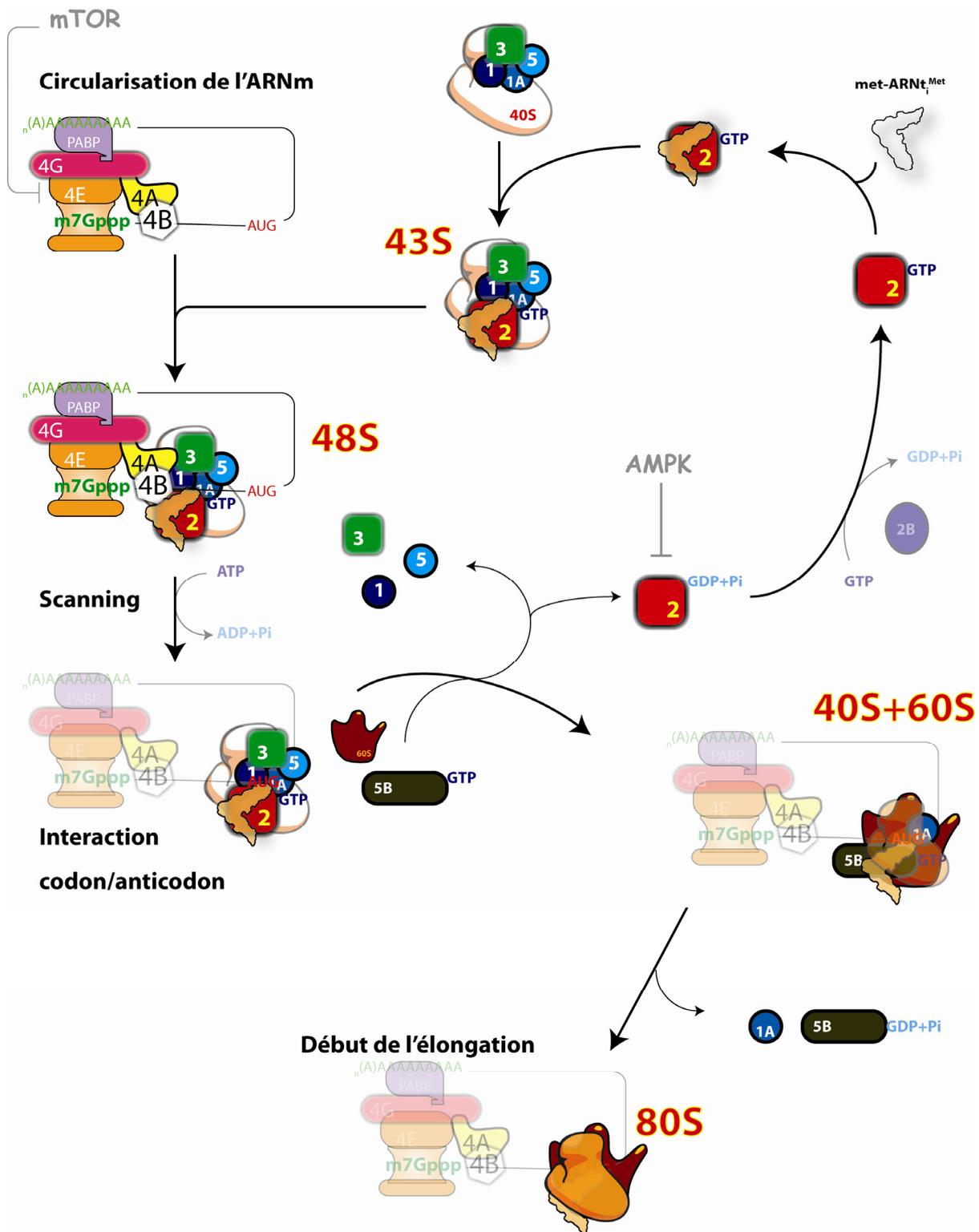


Figure I-12

Les étapes de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes. Chez les mammifère la voie mTOR contrôle la formation du complexe de la coiffe. La voie AMPK quant à elle contrôle la réactivation de eIF2 par eIF2B (Proud, 2004).

## ***(2) L'élongation***

Lors de la fin de l'initiation, le Met-ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup> fixé sur le codon AUG initiateur se retrouve dans le site P du ribosome, le second codon est dans le site A et est prêt à accueillir l'aminocyl-ARNt suivant. Pour cela le facteur eEF1A-GTP (eEF: eukaryotic Elongation Factor) se fixe aux ARNt aminocylés (excepté le Met-ARNt<sub>i</sub><sup>Met</sup>) et les apporte vers le site A du ribosome. Là, la sélection se fait grâce à l'interaction codon/anti-codon mais également grâce à plusieurs protéines ribosomiques (Jenner et al., 2010) et l'aminocyl-ARNt adapté est alors relâché grâce à l'hydrolyse du GTP de eEF1A. eEF1A-GDP sera ensuite régénéré par eEF1B pour assurer un autre cycle.

Dans le ribosome, l'hypothèse actuelle veut que la proximité des deux aminocyl-ARNt du site A et P provoque la formation de la liaison peptidique entre l'acide aminé du site A et le dernier acide aminé de protéine naissante par attaque de liaison ester de l'aminocyl-ARNt fixé dans le site A par le NH<sub>2</sub> de l'acide aminé porté par l'ARNt fixé dans le site P (Polacek et al., 2001). Après cette étape dite de "transpeptidation", l'ARNt du site A porte la protéine en cours de synthèse. eEFG-GTP se fixe alors à l'interface 40S/60S, hydrolyse son GTP et pousse le peptidyl-ARNt du site A vers le site P et l'ARNt du site P vers le site E où il est relargué pour un nouveau cycle, le codon suivant prend alors place dans le site A. Le processus recommence jusqu'à ce que le ribosome rencontre un codon stop, les mécanismes de terminaison entrent alors en jeu.

## ***(3) La terminaison***

Le ribosome s'arrête lorsqu'il atteint un codon stop, le facteur eRF1 (eRF pour eukaryotic release factor) va directement se glisser dans le site A et interagir avec n'importe lequel des trois codons stop, UAA, UAG ou UGA puis provoquer l'hydrolyse du peptidyl-ARNt (eRF1 use d'un mimétisme moléculaire en adoptant une conformation proche de celle d'eEF1A liant un aminocyl-ARNt). Le facteur eRF3 va alors se fixer à eRF1 et aux PABP puis l'hydrolyse d'un GTP va provoquer la dissociation du 80S. Comme l'ARNm est circularisé, les ribosomes dissociés en fin de traduction sont directement à proximité du complexe de la coiffe et prêts à recommencer un cycle de traduction (He and Green, 2010; Petry et al., 2008).

## d) La traduction mitochondriale

La traduction mitochondriale suit les mêmes étapes que la traduction cytoplasmique, cependant les détails des mécanismes et les partenaires impliqués sont très peu connus (Lee et al., 2009). Il semble que ce système traductionnel dans son ensemble se rapproche du système bactérien, mais si les ARN messagers mitochondriaux de levure possèdent encore une partie 5' non codante pouvant porter les signaux importants pour l'initiation, les ARNm de mammifères n'en ont plus du tout (Gaur et al., 2008). Il semblerait donc que ce soit la partie 5' codante de ces messagers qui porte les signaux nécessaires au recrutement du ribosome. La **Figure I-13** résume l'état des connaissances chez l'humain, qui est le système le mieux caractérisé aujourd'hui grâce aux efforts fait par la recherche sur les maladies mitochondriales.

Nom de la protéine	Nomenclature	Fonction au cours de la traduction
IF2mt	MTIF2	Initiation, fixe le fmet-ARNt <sub>i</sub> <sup>Met</sup> dans le 28S
IF3mt	MTIF3	Initiation, empêche le 55S de se former
EF-Tumt	TUFM	Délivre l'aminocyl-ARNt en élongation, contrôle la qualité de l'aminocylation, rôle de chaperone pour les protéines mitochondriales
EF-Tsmt	TSFM	Réactivation de EF-Tumt (remplace son GDP avec du GTP)
EF-G1mt	GFM1	Translocation
EF-G2mt	GFM2	Recyclage du ribosome
mtRRF	MRRF	Desassemblage du ribosome
mtRRF1	MTRF1	Terminaison
mtRRF1a	MTRF1L	Terminaison

**Figure I-13**

Récapitulatif des partenaires de la traduction mitochondriale qui ont été caractérisés chez les mammifères.

## e) Avancées conceptuelles récentes

### *(1) L'usage des codons synonymes comme élément de régulation de l'expression des gènes*

Nous l'avons vu, il peut exister plusieurs codons signifiant un même acide aminé. L'usage de ces codons synonymes dans les ARNs messagers n'est pas équitable, chez la levure par exemple le codon AGA est utilisé pour coder l'Arginine dans 48% des cas, alors que le codon CGG codant le même acide aminé n'est utilisé que 4 fois sur 100. De plus, les ARNs de transferts décodant les codons les plus utilisés sont plus abondants (Dong et al., 1996; Duret, 2000; Ikemura, 1985). Il est surprenant, mais logique, de constater que l'usage des codons dans l'ARNm n'est pas fait au hasard mais utilisé comme élément de régulation : l'alternance de codons synonymes pour les acides aminés tout au long d'une séquence, ou au contraire la répétition des mêmes codons, permet de créer des zones de traductions lentes ou rapides et des protéines globalement traduites rapidement ou lentement.

Deux études publiées cette année dans le journal *Cell* expliquent l'impact d'un tel mécanisme (Cannarozzi et al., 2010; Tuller et al., 2010). Cannarozzi et ses collègues ont développé un modèle mathématique permettant de traiter toutes les séquences codantes de la levure et de leur attribuer un chiffre, appelé TPI (tRNA Pairing Index). Ce chiffre caractérise de manière globale l'alternance des codons synonymes dans la séquence. Dans une séquence donnée l'acide aminé Glycine par exemple est-il toujours codé par le même codon GGU, ou y a-t-il alternance entre GGU, GGG, GGA ou GGC? Cette analyse est faite pour tous les acides aminés de chaque protéine.

Si l'alternance est forte, l'hypothèse est que le nombre d'ARNt différents nécessaires autour du ribosome en élongation devra être plus important que si l'alternance est très faible. L'étude montre qu'effectivement les gènes devant être fortement, mais surtout vite, exprimés (cycle cellulaire, shift diauxic etc.) sont caractérisés par une faible alternance dans l'usage des codons. Les auteurs concluent en montrant que la traduction d'une même protéine est impactée de manière étonnante lorsque sa séquence a été manipulée pour présenter ou non une alternance de codons.

Leur étude suggère donc, que le transport des aminoacyl-ARNt vers le ribosome (Les auteurs parlent de diffusion...) est l'étape limitante de l'élongation et non la sélection du bon aminoacyl-ARNt dans le site A. L'usage des mêmes ARNt relargués, puis recyclés, favorise une élongation rapide en créant une population locale d'aminoacyl-ARNt adaptés tout autour des ribosomes en élongation (encore un avantage de l'ARNm circularisé!). Cela suggère également que les systèmes d'aminoacylation sont proches des sites de traduction. Bref cela soulève beaucoup de questions.

L'étude de la deuxième équipe s'intéresse au même concept, cependant ils s'attachent à en expliquer l'importance pour la robustesse et le contrôle du mécanisme de traduction dans son ensemble. Ils démontrent que, de manière générale, les 50 premiers codons des ARNm sont traduits plus lentement et servent en quelque sorte de rampe de lancement pour le ribosome. Ce début d'élongation représente de fait la dernière étape de l'initiation, pour éviter que les ribosomes ne s'entrechoquent mais également pour augmenter la probabilité, si besoin est, de stopper la traduction lors de son démarrage.

## ***(2) De l'intérêt de confiner le module traductionnel***

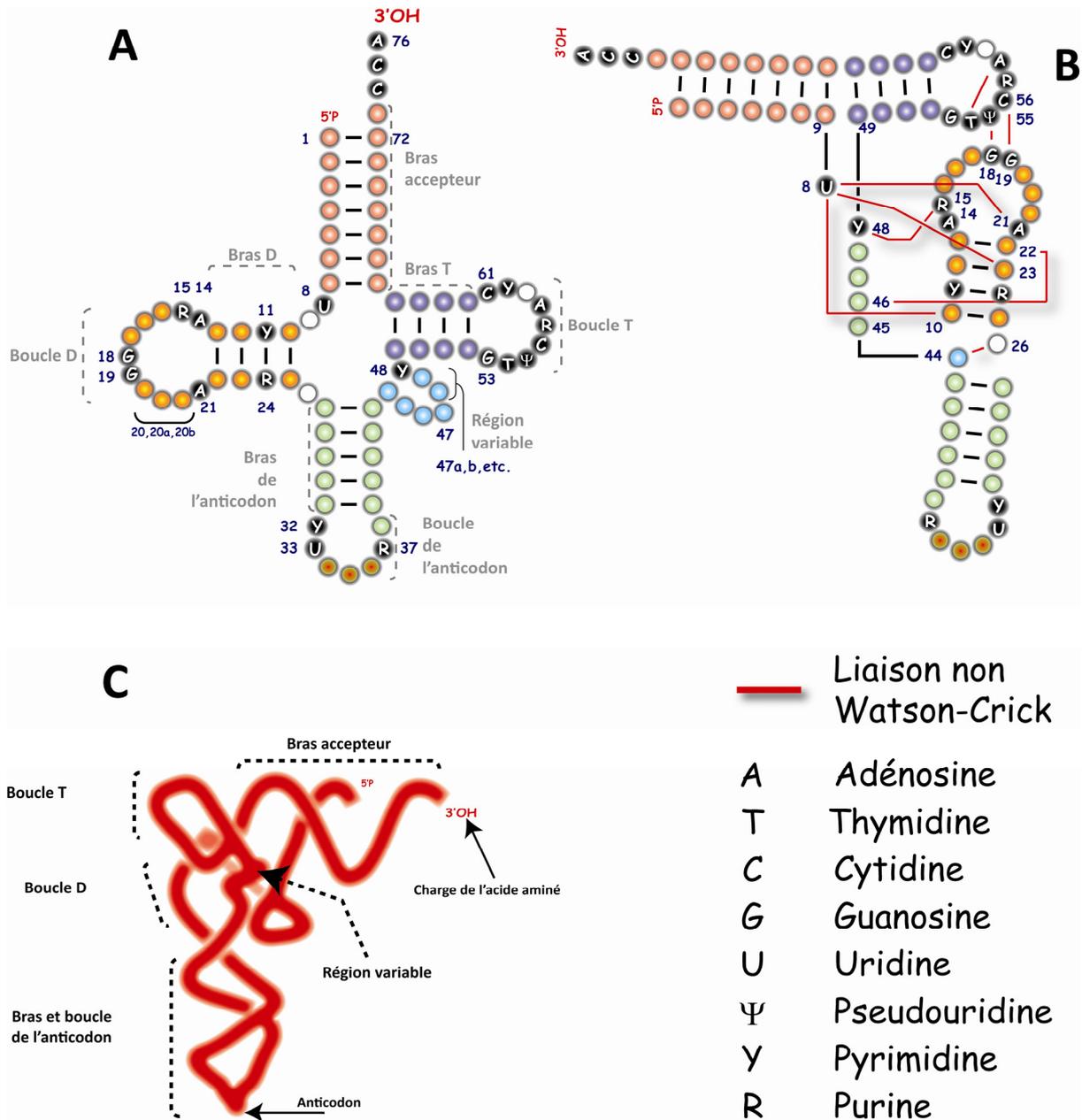
Les neurones ont la nécessité de projeter leur corps cellulaire afin d'établir des contacts avec d'autres cellules en développant des dendrites, qui vont recevoir de l'information, et des axones, qui vont la transmettre. Il arrive que ces extensions soient gigantesques en comparaison de la taille du corps cellulaire, ce qui crée un problème fondamental quant à la compréhension des mécanismes de transport, régulation etc. ayant lieu littéralement à des centimètres du génome.

Toujours cette année, une équipe de Harvard (Tcherkezian et al., 2010) a montré que dans les dendrites et les axones, le récepteur DCC non activé retient les sous unités 40S et 60S du ribosome sous forme inactive ainsi que la plupart des facteurs d'initiation de la traduction. Sous l'effet de la netrin, il relâche tous ces composants ce qui active la traduction à un niveau local. Cela explique en partie l'effet de la netrin qui est un facteur de remodelage du neurone. En activant la traduction d'un côté ou d'un autre de la cellule, ce composé participe au développement d'extensions cellulaires orientées.

## 2. Les aminoacyl-ARNt synthétases et les ARN de transfert

### a) Les ARNt, synthèse, structure, fonctions

La structure de l'ARNt en feuille de trèfle a été suggérée lors de la publication du premier séquençage d'une molécule de cette espèce, l'ARNt<sup>Alanine</sup> de levure (Holley et al., 1965). Hormis ce que l'on peut voir sur la **Figure I-14**, il faut noter que la taille de la boucle D peut varier de 7 à 12 nucléotides, tout comme la région (ou boucle) variable qui porte bien son nom et peut compter de 4 à 23 nucléotides. On distingue deux classes d'ARNt, la classe 1 rassemblant toutes les molécules avec au plus 5 nucléotides dans la partie variable, et la classe 2 composée des ARNt<sup>Sélocystéine, Leucine, Serine</sup> de la majorité des organismes ainsi que l'ARNt<sup>Tyrosine</sup> procaryotique (Rich and RajBhandary, 1976) dont les boucles variables peuvent aller jusqu'à 23 nucléotides. On sait aujourd'hui également que certains ARNt mitochondriaux comme l'ARNt<sup>Serine</sup> humain ne possèdent pas de boucle D sans connaître la raison d'une telle différence (Kumazawa et al., 1988 ainsi que <http://mamit-trna.u-strasbg.fr>).



**Figure I-14**

Représentation schématique du repliement secondaire en feuille de trèfle (A), tertiaire en L renversé (B) et tridimensionnel (C) spécifique de l'ARNt. (A) Structure et composition commune à tous les ARNt (sauf quelques espèces mitochondriales) et numérotation officielle des bases. La forme en feuille de trèfle est permise grâce aux liaisons hydrogènes de type Watson-Crick qui s'établissent entre les bases. (B) Sont représentées en rouge les liaisons non Watson-Crick responsables du repliement en L renversé de la structure tertiaire. (C) Structure tridimensionnelle de l'ARNt<sup>Phe</sup> cytoplasmique de levure qui fut la première structure d'ARNt résolue (Kim et al., 1974).

Les gènes d'ARNt eucaryotiques sont transcrits spécifiquement par l'ARN polymérase III grâce aux éléments de reconnaissance contenus à l'intérieur de la séquence du gène. Ces éléments correspondent aux résidus 8 à 19 et 52 à 62 du futur ARNt et sont appelés boîte A et B (Smith et al., 1995). Chez les procaryotes, les ARNt sont le plus souvent inclus dans un long transcrit contenant également des ARN ribosomiques ou messagers. Ce transcrit primaire sera, par la suite, mûré pour obtenir les ARN individuels qui le compose.

Tous les ARNs de transfert possèdent des extrémités 5' et 3' excédentaires qui seront enlevées lors d'étapes de maturation posttranscriptionnelles. L'excision du fragment en 5' est effectuée par un complexe ribonucléoprotéique, la ribonucléase P (RNaseP). Cette enzyme est capable de reconnaître et de mûrer les ARNt mais également certains ARN messagers, viraux et d'autres encore (Christian et al., 2002). Son activité est portée par un ARN catalytique de 400 nucléotides, en moyenne (Torres-Larios et al., 2006). Il faut toutefois préciser que la RNaseP de la mitochondrie humaine ne possède plus d'ARN (Holzmann et al., 2008).

La maturation en 3' est largement plus complexe et diffère entre les eucaryotes, les archaea et les bactéries, c'est pourquoi je me concentrerai sur le mécanisme eucaryotique (Pour une bonne revue sur ce sujet: Schurer et al., 2001). La partie 3' est excisée jusqu'à la base discriminatrice (nucléotide 73 de l'ARNt) grâce à l'action de plusieurs endo- et exonucléases lors d'une étape qui n'est toujours pas parfaitement caractérisée. l'ARNt nucléotidyl-transférase se fixe alors sur le bras accepteur et ajoute le triplet invariable CCA qui se situera à l'extrémité 3' terminale de tous les ARNt (Solari and Deutscher, 1982). Les ARNt eucaryotiques peuvent cependant encore présenter des introns qu'il faut exciser afin de permettre leur repliement tridimensionnel sous une forme active. C'est le cas chez la levure pour 61 gènes de 10 espèces différentes d'ARN de transfert. Tout d'abord une endonucléase excise l'intron (Trotta et al., 2006) puis l'action concertée d'une CDPase (Cyclic DiesterPhosphatase), d'une ARN ligase, d'une adénylyl-synthétase et enfin d'une 2'phosphatase permet de religuer les deux parties encadrant l'intron pour reformer l'ARNt, on retrouve même des gènes d'ARNt bipartite codant chacun une partie du futur ARN de transfert qui seront rassemblées ensuite (Randau et al., 2005). La molécule est à ce moment presque mature, il faut encore que certains de ses nucléotides soient modifiés afin de rendre l'ARNt pleinement fonctionnel.

La modification posttranscriptionnelle des nucléosides des ARNs est très courante et représente à elle seule un pan entier de recherches. On recense actuellement plus de 100 types de nucléosides modifiés (base de données : <http://modomics.genesilico.pl>) mais parmi tous les types d'ARN modifiés les ARNt sont ceux qui présentent le plus de modifications aussi bien quantité qu'en diversité. Chez les eucaryotes, jusqu'à 25% des nucléosides d'un ARNt peuvent être modifiés. Le rôle des modifications est structural et fonctionnel, elles stabilisent et protègent l'architecture (Dao et al., 1992; Perret et al., 1990) de la molécule tout comme elles favorisent les interactions ARNt/aminoacyl-ARNt synthétase. Nombre d'ARNt transcrits *in vitro* sont peu ou pas chargés par leur aminoacyl-ARNt synthétase homologue (Tamura et al., 1992). Plus précisément plusieurs études (Agris et al., 1973; Kern and Lapointe, 1979) ont montré que la modification 5-méthylaminométhyl-2-thiouridine en position 34 de l'ARNt<sup>Glutamate</sup> d'*E.coli* par du bromure de cyanogène réduit sa capacité à être aminoacylé. Cela signifie que cette modification intervient précisément dans les mécanismes de reconnaissance aminoacyl-ARNt synthétase/ARNt. Nous pouvons encore citer les modifications universellement trouvées dans les ARNt que sont la pseudouridine, la ribothymidine dans la boucle T ou encore la dihydrouridine de la boucle D (Figure I-14). Enfin les modifications de la position 34 de l'anticodon interviennent souvent dans la reconnaissance flottante des codons (wobble pairing) comme le montre la Figure I-11.

Pour clore ce chapitre il faut aborder les fonctions non canoniques des ARNt qui peuvent assurer de nombreux rôles dans des processus autres que la traduction. Sans être exhaustif, l'ARNt<sup>Glycine</sup> de *S.aureus* par exemple est reconnu par un homologue d'EF-Tu et participe à la synthèse du pont penta-glycine de la paroi de *Staphylococcus epidermidis* et *aureus* (Giannouli et al., 2009). On peut encore citer l'ARNt<sup>Lysine3</sup> des mammifères qui sert d'initiateur à la transcription inverse du génome du VIH (Litvak et al., 1994).

## b) Caractéristiques des aminoacyl-ARNt synthétases

Les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) sont les enzymes modulaires responsables de la fixation du bon acide aminé sur son ou ses ARNs de transfert homologues. Le respect du code génétique va donc dépendre de la précision avec laquelle ses enzymes reconnaissent leur(s) ARNt(s).

Ces enzymes fonctionnent en deux étapes, elles activent tout d'abord l'acide aminé grâce à la fixation d'AMP sur sa fonction  $\alpha$ -carboxylique puis dans un deuxième temps le transfert sur le 2' ou 3' OH du ribose de l'adénosine 3' terminale de l'ARNt. La première étape nécessite du magnésium comme cofacteur. On peut distinguer les aaRS qui doivent se lier à l'ARNt pour pouvoir activer l'acide aminé (ArgRS, GluRS, GlnRS, LysRS; Ibba et al., 1997; Kern and Lapointe, 1980) des autres qui n'en ont pas besoin.

Des alignements de séquences, des expériences de mutagenèse ainsi que les apports des premières structures de aaRS ont permis à Gilbert Eriani et ses collègues d'établir une classification universelle des aminoacyl-ARNt synthétases proposant deux groupes bien distincts en terme d'architecture et de fonctionnement (Eriani et al., 1990).

Classe I	Classe II
<p><b>Ia</b></p> <p>méthionyl-ARNt synthétase <math>\alpha 2, \alpha</math></p> <p>valyl-ARNt synthétase <math>\alpha</math></p> <p>isoleucyl-ARNt synthétase <math>\alpha</math></p> <p>leucyl-ARNt synthétase <math>\alpha</math></p> <p>cystéinyl-ARNt synthétase <math>\alpha</math></p> <p>arginyl-ARNt synthétase <math>\alpha</math></p>	<p><b>IIa</b></p> <p>séryl-ARNt synthétase <math>\alpha 2</math></p> <p>thréonyl-ARNt synthétase <math>\alpha 2</math></p> <p>alanyl-ARNt synthétase <math>\alpha 2, \alpha</math></p> <p>glycyl-ARNt synthétase <math>\alpha 2, \alpha 2, \alpha 2\beta 2</math></p> <p>prolyl-ARNt synthétase <math>\alpha 2</math></p> <p>histidyl-ARNt synthétase <math>\alpha 2</math></p>
<p><b>Ib</b></p> <p>glutamyl-ARNt synthétase <math>\alpha</math></p> <p>glutaminyl-ARNt synthétase <math>\alpha</math></p> <p>lysyl-ARNt synthétase <math>\alpha^*</math></p>	<p><b>IIb</b></p> <p>aspartyl-ARNt synthétase <math>\alpha 2</math></p> <p>asparaginyl-ARNt synthétase <math>\alpha 2</math></p> <p>lysyl-ARNt synthétase <math>\alpha 2</math></p>
<p><b>Ic</b></p> <p>tyrosyl-ARNt synthétase <math>\alpha 2</math></p> <p>tryptophanyl-ARNt synthétase <math>\alpha 2</math></p>	<p><b>IIc</b></p> <p>phénylalananyl-ARNt synthétase <math>\alpha 2\beta 2, \alpha</math></p> <p>**pyrolysyl-ARNt synthétase <math>\alpha 2</math></p> <p>**O-phosphoséryl-ARNt synthétase <math>\alpha 4</math></p>

Classement des aminoacyl-ARNt synthétases. Leur structure oligomérique est indiquée en regard du nom. Si nécessaire se suivent dans l'ordre la structure bactérienne, archaéa et eucaryotique.

\*La lysyl-ARNt synthétase de classe I n'est retrouvée que chez certaines archaéa et bactéries.

\*\*Ces deux enzymes ne se trouvent que chez certaines archaéa méthanogènes.

**Figure I-15**

### ***(1) La classe I***

Les aminoacyl-ARNt synthétases de classe I reconnaissent et fixent leur ARNt par le petit sillon puis courbent son extrémité 3'. L'ATP est fixé sous forme linéaire avant d'être hydrolysé afin d'activer l'acide aminé, celui-ci est ensuite transféré sur le 2'OH du ribose accepteur à l'extrémité de l'ARN de transfert (Excepté la tyrosyl et cystéinyl-ARNt synthétase qui le fixent sur le 3'OH ; (Cramer et al., 1975). Le facteur de transport de l' aminoacyl-ARNt (eEF1A chez les eucaryotes, EF-Tu chez les procaryotes) va ensuite induire une réaction d'isomérisation en transférant l'acide aminé du 2' vers le 3'OH du ribose (Forster et al., 1994).

Les enzymes appartenant à cette classe se caractérisent par un site actif dont l'architecture correspond à un domaine de Rossmann (Rossmann et al., 1974). Ce domaine structural se compose de cinq brins bêta parallèles reliés par des hélices alpha. On y retrouve systématiquement deux séquences signature plus ou moins dégénérées HIGH et KMSKS (Brick et al., 1989; Hountondji et al., 1986; Rould et al., 1989), le premier motif est impliqué dans la fixation de l'ATP et de l'acide aminé alors que le second semble impliqué dans l'étape d' aminoacylation de l'ARNt du fait de la proximité entre la seconde lysine du motif KMSKS et l'adénosine acceptrice (Hountondji et al., 1985; Hountondji et al., 1990; Mechulam et al., 1991). Enfin, la classe I peut être subdivisée, par homologie de séquence, en trois sous-classes : Ia, b et c. On retrouve dans la sous classe Ia les aaRS ayant développé une fonction de correction (editing) des acides aminés non homologues ayant été activés par erreur.

### ***(2) La classe II***

Les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) de classe II reconnaissent et fixent leur ARNt par le grand sillon et ne contraignent pas son extrémité 3' qui reste linéaire. L'ATP cependant est fixée sous forme repliée et est complexée à trois ions magnésium dans le site actif de l'enzyme. Une fois activé, l'acide aminé est fixé sur le 3'OH du ribose accepteur à l'extrémité de l'ARN de transfert (à l'exception de la PheRS qui peut charger le 2'OH ou le 3'OH).

Ces enzymes sont toutes dimériques ou tétramériques (homo ou hétéro), à l'exception de la phenylalanyl-ARNt synthétase mitochondriale. Ces aaRS n'ont pas de domaine de Rossmann pour fixer les nucléotides adénylés, leur domaine catalytique est formé des motifs 1, 2 et 3, caractéristiques des aaRS de cette classe, qui sont composés de neuf brins bêta antiparallèles et de quatre hélices alpha (Cusack et al., 1990; Ruff et al., 1991). Au sein des 3 motifs se trouvent trois séquences consensus largement dégénérées. Le motif 1 contient une Proline invariante essentielle pour la formation du site catalytique et éventuellement pour la dimérisation des enzymes (Eriani et al., 1993), elle peut être ponctuellement substituée par une Sérine ou une Thréonine (C'est le cas de la GlyRS de *T.thermophilus*; Mazauric et al., 1998). Les motifs 2 et 3 possèdent deux Arginines fortement conservées qui semblent impliquées dans la reconnaissance de l'ATP et de l'acide aminé (Iwasaki et al., 2006; Schmitt et al., 1998).

Comme la classe I, la classe II est divisée en trois sous-classes basées sur des homologies de séquence et de structure. La sous-classe IIa rassemble des aaRS dont les sites catalytiques sont fortement homologues et qui possèdent un domaine C-terminal en feuillet bêta (sauf la séryl-ARNt synthétase), la sous-classe IIb est constituée de trois enzymes dont le domaine de liaison à l'anticodon est constitué d'un tonneau bêta, et la sous-classe IIc rassemble le reste des enzymes ne montrant que peu ou pas d'homologie dans leurs structures ou séquences.

### ***(3) La spécificité des aminoacyl-ARNt synthétases***

Les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) ont acquis des mécanismes d'édition pré- et post-transfert de l'acide aminé activé. Les premières études menées dans les années 1970 montrent que ces enzymes sélectionnent tout d'abord leur acide aminé sur des critères d'encombrement si bien que des acides aminés plus petits ou de même taille peuvent être reconnus et activés, si toutefois les propriétés chimiques du l'acide aminé incorrectement reconnu sont assez similaires à celles du bon acide aminé (Baldwin and Berg, 1966; Fersht, 1977). Un deuxième filtre, assuré par les mécanismes de fixation de l'aminoacyl-AMP, permet d'hydrolyser un mauvais adénylate. Si malgré tout le transfert a lieu, un mécanisme d'édition post-transfert hydrolyse l'aminoacyl-ARNt mésacylé (Ce mécanisme est particulièrement bien caractérisé pour l'IleRS activant la Valine; Hale et al., 1997; Nureki et al., 1998; Silvian et al., 1999). La correction post-transfert peut être assurée par un module spécifique de l'enzyme, on parle

alors de module d'édition (au sens structural), ce domaine se nomme Cp1 (connective peptide 1) pour l'isoleucyl-ARNt synthétase.

Notons enfin que le facteur d'élongation véhiculant l'aminoacyl-ARNt vers le ribosome (eEF1A ou EF-Tu) présente une affinité faible pour les molécules mésacylées, diminuant encore la probabilité d'insérer un mauvais acide aminé dans une protéine (LaRiviere et al., 2001). Au final, la fréquence d'insertion d'un acide aminé incorrect dans une protéine en cours d'élongation est d'un pour dix mille, ce qui constitue tout de même une erreur toute les dix à vingt protéines synthétisées.

Il semble cependant qu'*in vivo* ces erreurs soient peu détectables. Elles seraient même un avantage en terme d'évolution en permettant de "tester" et même d'adapter les partenaires de la molécule à certaines mutations. Ainsi la cellule disposerait d'un moyen pour imposer progressivement une pression de sélection sur une mutation avantageuse qui serait directement maintenue lors de son apparition dans le génome (Drummond and Wilke, 2009; Moura et al., 2009). La présence au cœur des cellules de systèmes moléculaires suffisamment robustes pour maintenir un fonctionnement stable à l'échelle d'une vie, mais avec toutefois une certaine permissivité à l'erreur permet d'investiguer, au hasard, le champ des possibilités pour finalement faire évoluer l'espèce.

Tous les ARNt adoptent la même structure tridimensionnelle et l'affinité d'une aminoacyl-ARNt synthétase pour son substrat homologue n'est en moyenne que 100 fois supérieure à son affinité pour un ARNt hétérologue. La reconnaissance et surtout l'aminoacylation de la molécule homologue impliquent l'existence dans les ARNt de nucléotides appelés déterminants d'identité ou antidéterminants (Giege, 2003; Giege et al., 1993). Ils permettent, après fixation de l'ARNt sur l'enzyme, d'induire ou non les changements conformationnels du couple enzyme/substrat aboutissant à un complexe productif ou abortif. C'est donc une cinétique de reconnaissance et non la simple fixation de l'ARNt qui va permettre un réarrangement de l'enzyme et la rendre active (Ebel et al., 1973). Un très bon résumé de ces éléments est fait dans (Giege et al., 1998). Les expériences de mutagenèse dirigée sur le couple ARNt/aminoacyl-ARNt synthétase, couplées à l'analyse des constantes cinétiques d'aminoacylation ont montré que les nucléotides de l'anticodon ainsi que la base discriminatrice semblent être les déterminants majeurs de la plupart des jeux d'identités des ARNt.

### 3. Mécanismes particuliers

#### a) Les voies indirectes

Le séquençage systématique des génomes nous a montré que seul le cytoplasme eucaryotique ainsi qu'un tout petit nombre de bactéries utilisent une aminoacyl-ARNt synthétase (aaRS) pour fixer directement chacun des 20 acides aminés sur son ou ses ARNt homologues. Ainsi pour presque toutes les bactéries, pour toutes les archaea et pour la majorité des organites, il n'existe pas de gène codant une glutaminyl-ARNt synthétase (QRS). La plupart des procaryotes ne possèdent pas d'asparaginyl-ARNt synthétase (NRS) (Roy et al., 2003; Sheppard et al., 2007; Tumbula et al., 2000), certaines archaea méthanogènes ne possèdent pas de cystéinyl-ARNt synthétase (CRS) (Bult et al., 1996; Slesarev et al., 2002; Smith et al., 1997) et enfin aucune sélénocystéinyl-ARNt synthétase (URS) n'a été découverte à ce jour (Ibba et al., 2005). Comment se fait alors la synthèse de ces aminoacyl-ARNt orphelins de leurs aaRS ?

Pour compenser ces absences la cellule a mis en place des voies indirectes mettant en jeu plusieurs enzymes. Invariablement, une aminoacyl-ARNt synthétase (aaRS) va tout d'abord charger un acide aminé (aa) précurseur sur l'ARNt codant pour l'acide aminé final, la correspondance aa/anticodon n'est à ce moment pas respectée. Une enzyme ARNt-dépendante reconnaît alors l'aminocyl-ARNt mésacylée et corrige l'erreur afin de restaurer la correspondance acide aminé/anticodon. Le nouvel aminoacyl-ARNt peut alors prendre part à la traduction.

#### *(1) Les voies de transamidation*

Lorsque la glutaminyl-ARNt synthétase (QRS) est manquante, la formation du glutaminyl-ARNt<sup>glutamine</sup> (Q-ARNt<sup>Q</sup>) fait intervenir une glutamyl-ARNt synthétase dite non discriminante (ND-ERS) à spécificité double pour l'ARNt (Lapointe et al., 1986). Cette enzyme est capable de fixer du glutamate (E) à la fois sur l'ARNt<sup>glutamate</sup> (ARNt<sup>E</sup>) et sur l'ARNt<sup>Q</sup>. L'intermédiaire mésacylé glutamyl-ARNt<sup>glutamine</sup> (E-ARNt<sup>Q</sup>) est ensuite transformé en Q-ARNt<sup>Q</sup> par une amidotransferase ARNt-dépendante (AdT) (Schon et al., 1988; Wilcox and Nirenberg, 1968). Lors de cette étape, le  $\gamma$ -carboxyl du E est activé par transfert d'un phosphate de l'ATP (également substrat de l'AdT) avant qu'un groupement amido (NH<sub>3</sub>) y soit fixé par l'AdT. Ce

groupement amido provient quasi-exclusivement de la déamidation d'une glutamine ou d'une asparagine catalysée par une des sous-unités de l'AdT, comme nous le verrons plus loin.

L'étape de transamidation ARNt-dépendante peut être assurée par deux enzymes différentes, l'une est trimérique et composée de trois sous-unités nommées GatA, B et C assurant respectivement les fonctions d'amidase, de kinase/transamidase et de chaperonne et se retrouve dans toutes les branches du vivant, des bactéries aux organelles, en passant par les archaea. L'autre se compose de deux sous unités différentes, GatD, la glutaminase, homologue d'une L-Asparaginase de type I et GatE, la kinase/transamidase paralogue de GatB (Curnow et al., 1997; Tumbula et al., 2000)(Figure I-16). L'enzyme GatDE se retrouve quant à elle uniquement chez les archaea.

Le mécanisme général de transamidation implique l'hydrolyse au niveau de GatA ou D d'un donneur d'amide (Q ou N) générant un  $\text{NH}_4^+$  qui rejoindra ensuite la sous unité GatB ou E *via* un canal à ion ammonium long de 30 à 40 Angström (Nakamura et al., 2006) . L'ion ammonium sera ensuite transféré sur la chaîne latérale de l'acide aminé fixé à l'ARNt. Comme nous l'avons dit, on ne trouve l'AdT GatDE que chez les archaea où elle assure le rôle exclusif d'E-ARNt<sup>Q</sup> amidotransférase ou E-AdT.

En effet, l'AdT GatDE est spécifique de la transamidation du glutamate (E) en glutamine (Q) mais les AdTs de type GatCAB sont capables de transamider à la fois le glutamyl-ARNt<sup>glutamine</sup> (E-ARNt<sup>Q</sup>) ou l'aspartyl-ARNt<sup>asparagine</sup> (D-ARNt<sup>N</sup>); elles sont donc double spécifiques et appelées E-D-AdT. Cela s'explique par la nature chimique du couple E/Q qui ne diffère du couple D/N que par un carbone supplémentaire dans sa chaîne latérale, si bien que le site de transamidation de l'AdT GatCAB s'accommode des deux composés.

À l'instar du E-ARNt<sup>Q</sup>, le D-ARNt<sup>N</sup> est lui aussi formé par une aminoacyl-ARNt synthétase (aaRS) à double spécificité, l'aspartyl-ARNt synthétase non discriminante (ND-DRS) que l'on retrouve dans beaucoup de procaryotes (Figure I-16) (Sheppard et al., 2007). C'est donc le bagage moléculaire de la cellule qui définira le rôle et la spécificité de l'AdT GatCAB. Ainsi, chez les archaea la coexistence des deux types d'AdTs cantonne la GatCAB au seul rôle d'Asp-AdT. De manière générale, c'est la présence d'une ND-ERS ou d'une ND-DRS qui devrait permettre de définir la spécificité de l'AdT GatCAB dans un organisme (Becker and Kern, 1998; Becker et al., 1997; Curnow et al., 1998), mais à l'heure actuelle il est très

difficile, voir impossible, de prédire par sa seule séquence si une D- ou une ERS est double spécifique.

C'est pourquoi la spécificité de l'AdT GatCAB est déduite de l'absence ou de la présence des deux aaRS dont elle peut compenser la fonction : la glutaminyl-ARNt synthétase (QRS) et l'asparaginyl-ARNt synthétase (NRS).

Par exemple, un organisme comme *H.pylori* possède une seule AdT GatCAB et est dépourvu de Q- et NRS, sa GatCAB est donc une E-D-AdT. Par extension, sa E- et sa DRS doivent être toutes deux mésacylantes. Dans ce cas précis, il se pose une question intéressante et non élucidée pour le moment: comment se partage l'AdT entre ses deux substrats E-etD-ARNt<sup>Qet N</sup> naturels (Sheppard et al., 2007)?

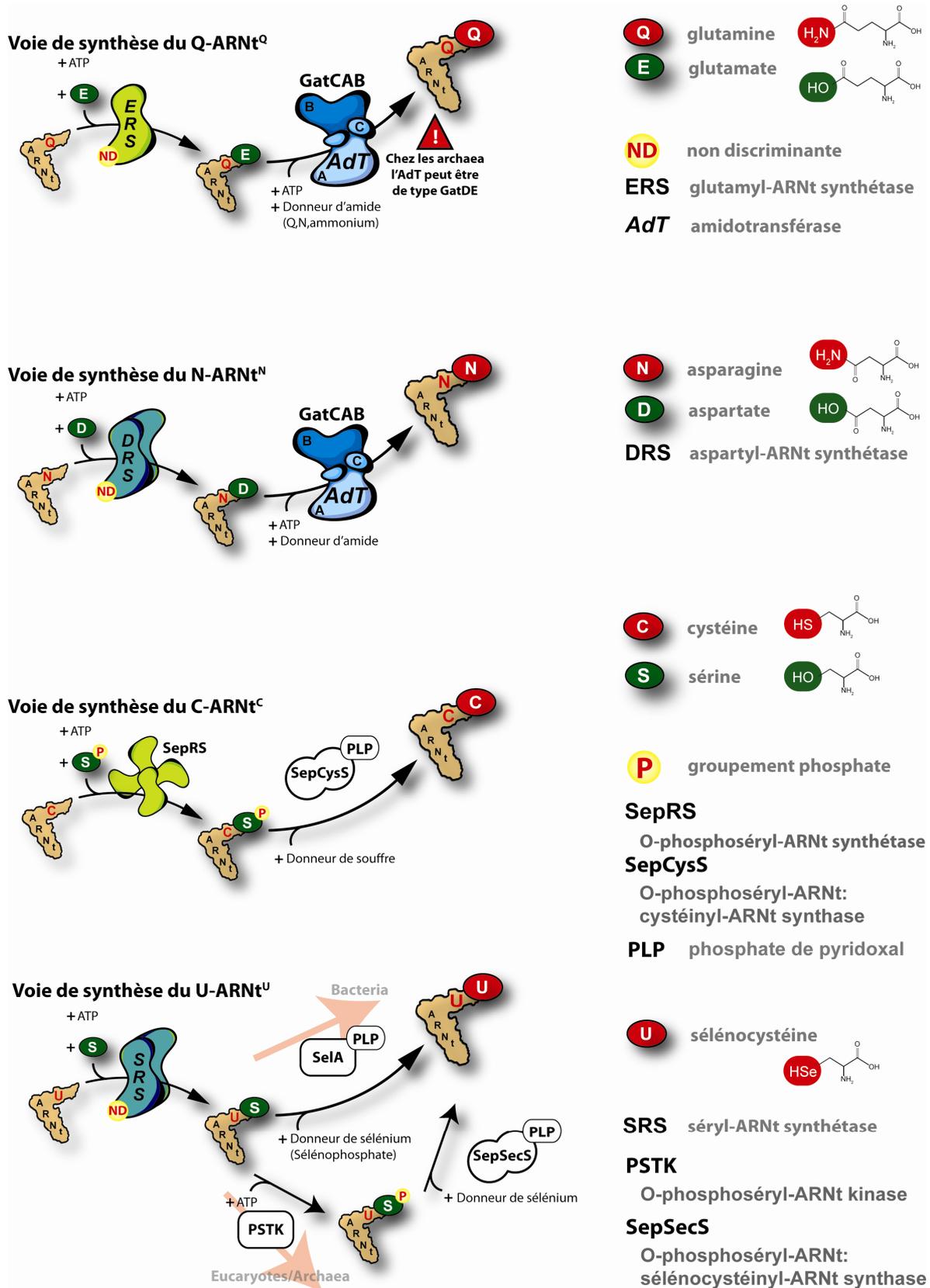


Figure I-16

Schéma des voies indirectes de synthèse d'aminoacyl-ARNt

Les structures des amidotransférases obtenues récemment ainsi que plusieurs études de mutagenèse montrent que les AdTs reconnaissent l'ARNt par le bras accepteur, la boucle D et T (Oshikane et al., 2006). Elles mettent également en évidence l'importance de la base U1-A72 pour les ARNt<sup>Q ou N</sup> devant être reconnus par les AdTs GatCAB (à l'exception des D-AdT GatCAB des archaea) et de la base A1-U72 pour les ARNt<sup>Q</sup> reconnus par une AdT GatDE (Bailly et al., 2006; Nakamura et al., 2006; Namgoong et al., 2007).

La formation de Q-ARNt<sup>Q</sup> dans les organites est un domaine de recherche actuellement très dynamique, c'est également le sujet qui a servi de point de départ pour mon travail de recherche. Il semble qu'il y ait une très grande variété de systèmes et de scénarios, propre à chaque organisme. Nous avons tenté de défricher ce sujet et de faire ressortir quelques règles générales dans la première revue présentée dans ce manuscrit, je vous invite donc à vous y référer. (Chapitre II.A).

## ***(2) Les voies impliquant une enzyme à phosphate de pyridoxal***

Pour terminer ce chapitre parlons des mécanismes de formation ARNt-dépendante du cystéinyl-ARNt<sup>cystéine</sup> (C-ARNt<sup>C</sup>) et sélénocystéinyl-ARNt<sup>sélénocystéine</sup> (U-ARNt<sup>U</sup>). Le premier de ces mécanismes est uniquement retrouvé chez les archaea méthanogènes possédant une O-phosphoséryl-ARNt synthétase (SepRS) qui est une synthétase de la classe IIc dérivant de la phénylalaninyl-ARNt synthétase (O'Donoghue et al., 2005). Classiquement, cette enzyme mésacyle l'ARNt<sup>C</sup> avec de la O-phosphosérine (Sep) produite à partir de phosphohydroxypyruvate (Helgadottir et al., 2007). Le O-phosphoséryl-ARNt<sup>Cystéine</sup> (Sep-ARNt<sup>C</sup>) est ensuite reconnu par une Sep-ARNt:Cys-ARNt synthase ou SepCysS qui va remplacer le groupement hydroxyle (OH) phosphorylé de la chaîne latérale par un groupement thiol (SH) de manière ARNt-dépendante (Figure I-16).

La voie de formation du U-ARNt<sup>U</sup> est retrouvée dans quasiment tout le règne vivant, en effet le sélénium est un excellent nucléophile essentiel à de nombreuses enzymes chargées de réactions d'oxydoréduction comme la glutathion peroxydase impliquée dans la prise en charge des radicaux libres (Lobanov et al., 2009; Ran et al., 2007). Ainsi, le groupement sélénol a un pKa bien plus faible que celui du groupement thiol (5,2 contre 8,5) lui permettant de rester ionisé au pH cellulaire. L'insertion de U est faite par lecture du codon stop UGA car

l'ARN messenger encodant une sélénoprotéine possède une structure secondaire appelée SECIS. L'insertion du U-ARNt<sup>U</sup> se fait grâce à SelB qui le transporte spécifiquement (EF-Tu ou eEF1A ne reconnaissent pas le U-ARNt<sup>U</sup>). Cette protéine se fixe directement sur l'élément SECIS ou, chez les eucaryotes, *via* une protéine d'interface SBP2, qui place idéalement le U-ARNt<sup>U</sup> près du ribosome. Les mécanismes de formation de cet aminoacyl-ARNt divergent pour les bactéries et les eucaryotes/archaea, je vous invite donc à vous référer à la **Figure I-16**. La voie fait intervenir, dans tous les cas, une séryl-ARNt synthétase (ND-SRS) à double spécificité. Notons, que les enzymes ARNt-dépendantes SelA et SepSecS fonctionnent avec du phosphate de pyridoxal comme cofacteur tout comme la SepCysS.

Je vous invite à lire la revue suivante faite par le Pr. Dieter Söll. (Sheppard et al., 2008) si vous désirez encore plus de détails concernant les questions évolutives, structurales ou mécanistiques que les voies indirectes ne manquent pas de soulever.

### **b) Complexes et concept de channeling.**

Une des questions majeure à laquelle les spécialistes de la traduction et de l'amination essayent de répondre actuellement concerne les moyens mis en œuvre par la cellule pour maintenir la stabilité de l'amination-ARNt. Cette molécule est caractérisée par sa liaison ester très riche en énergie, reliant l'acide aminé et le ribose accepteur de l'ARNt. Il faut donc en permanence assurer sa protection depuis son lieu de synthèse jusqu'au ribosome. L'effet protecteur du facteur d'élongation EF-Tu (ou eEF1A) est largement documenté, une fois activé sous forme GTP il stabilise la liaison ester, protège l'amination-ARNt et discrimine les espèces bien appariées de celles qui sont mésacylées (Ibba, 2001; Ling et al., 2009). Le mécanisme de sélection se base sur la capacité de la "partie acides aminé" et de la "partie ARNt" de chaque aminoacyl-ARNt à se lier fortement ou faiblement à EF-Tu.

Pour pouvoir se lier efficacement au facteur d'élongation l'amination-ARNt doit être le résultat d'un couplage d'un acide aminé de faible affinité pour EF-Tu avec un ARNt de forte affinité pour EF-Tu ou *vice-versa* (LaRiviere et al., 2001). C'est le cas de tous les aminoacyl-ARNt correctement chargés. Les aminoacyl-ARNt dont le couple acide aminé/ARNt est

fort/fort ou faible/faible sont exclus de la synthèse protéique par EF-Tu, le premier parce qu'il ne pourra plus se détacher d'EF-Tu et le deuxième parce qu'il ne pourra pas se lier à EF-Tu. Notons que les aminoacyl-ARNt mischargés utilisés par les voies indirectes comme la voie de transamidation, appartiennent tous à la catégorie des couples acide aminé/ARNt faible/faible.

On ne disposait cependant que d'hypothèses pour expliquer le problème de la stabilisation des aminoacyl-ARNt intermédiaires E, D, Sep et S-ARNt<sup>Q, N, C et U</sup> utilisés par les voies indirectes. En effet, ces intermédiaires mésacylés posent problème, ils ne doivent pas être reconnus par le facteur d'élongation pour ne pas provoquer d'erreur de décodage (Q par E, N par D, C et U par Sep), mais s'ils ne sont pas reconnus comment se fait la protection de la liaison ester de ces aminoacyl-ARNt ?

La publication d'un travail majeur fait dans notre laboratoire basé sur l'étude des constantes cinétiques globales et spécifiques régissant la synthèse indirecte de N-ARNt<sup>N</sup> chez *T.thermophilus* (Bailly et al., 2007) couplée à des expériences de gel filtration, ont démontré l'existence en solution d'un complexe très stable entre l'ARNt<sup>N</sup>, la ND-DRS et l'AdT GatCAB.

Cette ribonucléoprotéine a été baptisée "transamidosome". Il semble donc que les voies indirectes de synthèse des aminoacyl-ARNt s'organisent autour de complexes regroupant tous les partenaires, ARNt et enzymes, de la voie. Une organisation de ce type présente plusieurs avantages, notamment l'amélioration de l'efficacité globale de synthèse du produit final par compensation des points faibles d'un partenaire par les points fort de l'autre (augmentation du  $k_{cat}$  de la ND-DRS, la charge de l'ARNt<sup>N</sup> par du D est l'étape limitante au cœur du complexe), protection de la liaison ester car l'intermédiaire mésacylé n'est pas relâché mais également, dans le cas de *T.thermophilus*, stabilisation des partenaires lors de l'augmentation de la température (cette bactérie est thermophile, sa température de croissance optimale est de 65-70°C). Cette stratégie qui consiste à maintenir l'ARNt en permanence en complexe, dans le transamidosome, avec EF-Tu, puis dans le ribosome, tout cela pour le protéger se nomme channeling (canalisation) de l'ARNt.

La mise en évidence de complexes équivalents pour d'autres voies indirectes est un sujet de recherche très dynamique actuellement, notamment en biologie structurale. J'ai participé, lors de l'étape d'affinement des données cristallographiques, à la résolution de la structure du transamidosome de *T.thermophilus* qui est la première structure d'une ribonucléoprotéine de transfert. Ce travail, mené principalement par Michael Blaise et Daniel Kern est présenté puis discuté au chapitre III.

#### **4. Localisation subcellulaire et fonctions secondaires des aminoacyl-ARNt synthétases**

##### **a) Les complexes multi-synthétasiques et le contrôle des fonctions secondaires des aminoacyl-ARNt synthétases**

On pourrait penser que les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) sont des enzymes fonctionnant seules, or il n'en est rien et on retrouve dans tous les domaines du vivant des complexes macromoléculaires plus ou moins importants et élaborés impliquant une ou plusieurs aaRS dont le rôle va du contrôle de la qualité de l'aminacylation à la régulation des fonctions secondaires des partenaires (Figure I-17).

##### ***(1) Chez les bactéries***

Malgré leur apparente simplicité, on retrouve dans les systèmes bactériens trois complexes impliquant des aaRS. Ces complexes prennent une forme simple et n'impliquent qu'un type de synthétase à la fois. Le premier exemple est le transamidosome formé de l'ARNt<sup>N</sup>, de la ND-DRS et d'une GatCAB dont nous avons déjà parlé au chapitre précédent et dont nous reparlerons.

Organisme	Aminoacyl-ARNt synthétase(s) (aaRS)	Partenaire(s)	Fonction(s)	Références	
Bactéries					
<i>E.coli</i>	PRS	YbaK	Hydrolyse du C-ARNtP	An & Musier-Forsyth (2004) Ruan & Söll (2005)	
<i>T.thermophilus</i>	DRS	GatCAB	Transamidation du D-ARNtN en N-ARNtN	Bailly et al. (2007)	
<i>D.radiodurans</i>	TRS	Nitric Oxyde Synthase (NOS)	Production de 4-nitro-T par nitration du T. Potentiellement impliqué dans la réparation de la paroi.	Buddha et al. (2004a) Buddha et al. (2004b) Buddha & Crane (2005)	
Archaea					
<i>M. janaschii</i>	PRS KRS DRS	Mj1338	Inconnu	Lipman et al. (2003)	
<i>M. thermautotrophicus</i>	KRS LRS PRS	EF1A	Amélioration de l'aminocyclation Channeling de l'aa-ARNt	Praetorius-Ibba et al. (2005) Praetorius-Ibba et al. (2007) Hausmann et al. (2007)	
Eucaryotes					
<i>S.cerevisiae</i>	MRS ERS	Arc1p	Amélioration de l'aminocyclation et autres: voir partie résultats	Frechin et al. (2010) Frechin et al. (2009)	
<i>S.cerevisiae</i>	SRS	Pex21p	Meilleure fixation de l'ARNt	Rocak et al. (2002) Godinic et al. (2007)	
<i>S.cerevisiae</i>	YRS	Knr4	Inconnu, formation de dityrosine lors de la sporulation	Dagkessamanskaia et al. (2001) Ivakhno & Kornelyuk (2005)	
<i>H.sapiens</i>	VRS	EF1A	Meilleure efficacité d'aminocyclation	Motorin et al. (1988) Venema et al. (1991) Bec et al. (1994) Negrutskii et al. (1999)	
<i>H.sapiens</i>	DRS	EF1A	Channeling de l'ARNt?	Reed et al. (1994) Reed & Yang (1994)	
<i>H.sapiens</i>	KRS DRS	p38 et EF1A	Amélioration de l'aminocyclation Channeling de l'aa-ARNt	Guzzo & Yang (2008)	
<i>H.sapiens</i>	EPRS	L13a GAPDH NSAP1	Inhibition de la traduction de protéines pro-inflammatoires	Mazumder et al. (2003b) Sampath et al. (2004) Ray et al. (2007)	
<i>H.sapiens</i>	KRS	Protéine Gag de HIV-1	Assemblage du VIH	Javanbakht et al. (2003) Guo et al. (2005) Kovaleski et al. (2006)	
Chordés	KRS QRS RRS EPRS	MRS DRS IRS LRS	p18 p38 p43	Contrôle des fonctions secondaires des aaRS?	Bandyopadhyay & Deutscher (1971) Mirande et al. (1985) Kerjan et al. (1994) Quevillon et al. (1999) Robinson et al. (2000) Kaminska et al. (2009)

**Figure I-17**

Résumé des complexes impliquant une ou plusieurs aminoacyl-ARNt synthétases. Ce tableau est adapté de (Hausmann and Ibba, 2008).

Le deuxième exemple concerne la protéine YbaK qui forme un complexe hétérodimérique avec la prolyl-ARNt synthétase (PRS) (An and Musier-Forsyth, 2005). Nous l'avons déjà dit, certaines aaRS ont développé des domaines spécifiques d'édition afin de corriger les erreurs d'activation d'acides aminés et de charges qu'elles font en quantité non négligeable, on peut également retrouver ces domaines d'édition sous forme libre (Ahel et al., 2003), c'est le cas d'YbaK qui est un homologue du domaine de correction de la PRS (on peut citer également d'autres domaines d'édition libres comme AlaX ou PrdX). En plus de la proline (P), la PRS est capable d'activer et de charger l'alanine (A) et la cystéine (C) sur son ARNt<sup>Proline</sup> (ARNt<sup>P</sup>) homologue. Cependant, si elle est capable d'hydrolyser le A-ARNt<sup>P</sup>, elle est incapable de faire de même pour le C-ARNt<sup>P</sup> (Ambrogelly et al., 2002). Ce problème est résolu par la formation du complexe YbaK/PRS (Ruan and Soll, 2005).

La bactérie *D.radiodurans* présente la particularité d'avoir deux gènes de tryptophanyl-ARNt synthétase (WRS) différents (tout comme d'autres bactéries; Brown et al., 2003). La WRS II est plus proche de la WRS humaine que de son homologue bactérien et est notamment surexprimée en réponse au stress. Grâce à son domaine N-terminal supplémentaire, elle forme un complexe avec la Nitric Oxyde Synthase (NOS) ce qui permet la formation de 4-nitro-tryptophane fixé ou non sur l'ARNt<sup>Tryptophane</sup> (ARNt<sup>W</sup>) à partir d'un donneur : l'arginine. La formation de ce complexe profite aux deux enzymes en augmentant l'affinité de la NOS pour l'arginine et de la WRS II pour l'ARNt<sup>W</sup>. Il semble que ce mécanisme soit important pour la synthèse de la paroi de cette bactérie en conditions de stress comme une exposition aux radiations (Buddha et al., 2004a). Notons que la partie N-terminale supplémentaire de la WRS II est retrouvée sur d'autres protéines de réponse au stress (Buddha et al., 2004b).

## **(2) Chez les archaea**

On retrouve dans ces organismes des complexes impliquant plus d'une aminoacyl-ARNt synthétase (Goldgur and Safro, 1994), il faut maintenant identifier leurs fonctions biologiques.

Le premier exemple concerne la prolyl-ARNt synthétase (PRS) de *Methanocaldococcus jannaschii* qui se fixe à la protéine de fonction inconnue Mj1338 prédite comme ayant un rôle dans le métabolisme du carbone. On ne connaît pas le rôle de cette association qui ne

semble pas augmenter l'affinité de la PRS pour l'ARNt<sup>Proline</sup> (ARNt<sup>P</sup>), il semble également que Mj1338 puisse se lier avec la lysyl-ARNt synthétase (KRS) et l'aspartyl-ARNt synthétase. Cela suggère l'existence d'un complexe tétramérique entre ces trois aaRS et la protéine Mj1338 de fonction encore inconnue (Lipman et al., 2003).

Chez *Methanothermobacter thermautotrophicus* a été identifié un complexe stable entre la leucyl-ARNt synthétase (LRS), la PRS et la KRS permettant d'augmenter l'efficacité des deux derniers partenaires mais pas de la LRS. De plus, un complexe stable entre la LRS et EF1A a également été identifié, augmentant cette fois-ci l'efficacité de la LRS, ce qui laisse croire à l'existence d'un complexe multi-synthétasique comprenant trois aaRS et le facteur d'élongation EF1A. La présence d'EF1A au sein de ce complexe pourrait permettre de faciliter le transfert des aminoacyl-ARNt selon le principe du channeling (Hausmann et al., 2007; Praetorius-Ibba et al., 2007; Praetorius-Ibba et al., 2005).

### **(3) Chez les eucaryotes**

Les complexes multisynthétasiques eucaryotiques sont particulièrement bien caractérisés dans deux organismes modèles, la levure *Saccharomyces cerevisiae* ainsi que les cellules de mammifères. Ces investigations démontrent que les complexes multisynthétasiques gagnent en taille et en fonctions à mesure que l'organisme se complexifie, laissant supposer le rôle que jouent ces dépôts de protéines dans la sophistication progressive des modules fonctionnels de la cellule.

La séryl-ARNt synthétase de levure forme un complexe stable avec une protéine impliquée dans la biogenèse des peroxisomes, Pex21p, *via* un domaine C-terminal supplémentaire (Godinic et al., 2007; Mocibob and Weygand-Durasevic, 2008; Rocak et al., 2002). Ce dimère semble augmenter l'affinité de la synthétase pour son ARNt mais représente surtout un lien très intéressant entre l'amination et la formation des peroxisomes. Ce lien sera discuté lors de la présentation de la deuxième revue portant sur un autre complexe multisynthétasique de levure, le complexe méthionyl-ARNt synthétase/Arc1p/glutamyl-ARNt synthétases (complexe AME) qui a été l'objet central de mes derniers travaux de thèse. Ainsi, je ne vais

pas aborder la description structurale et fonctionnelle du complexe AME tout de suite et vous invite à lire la revue et la discussion qui lui sont dédiées (chapitre II.D).

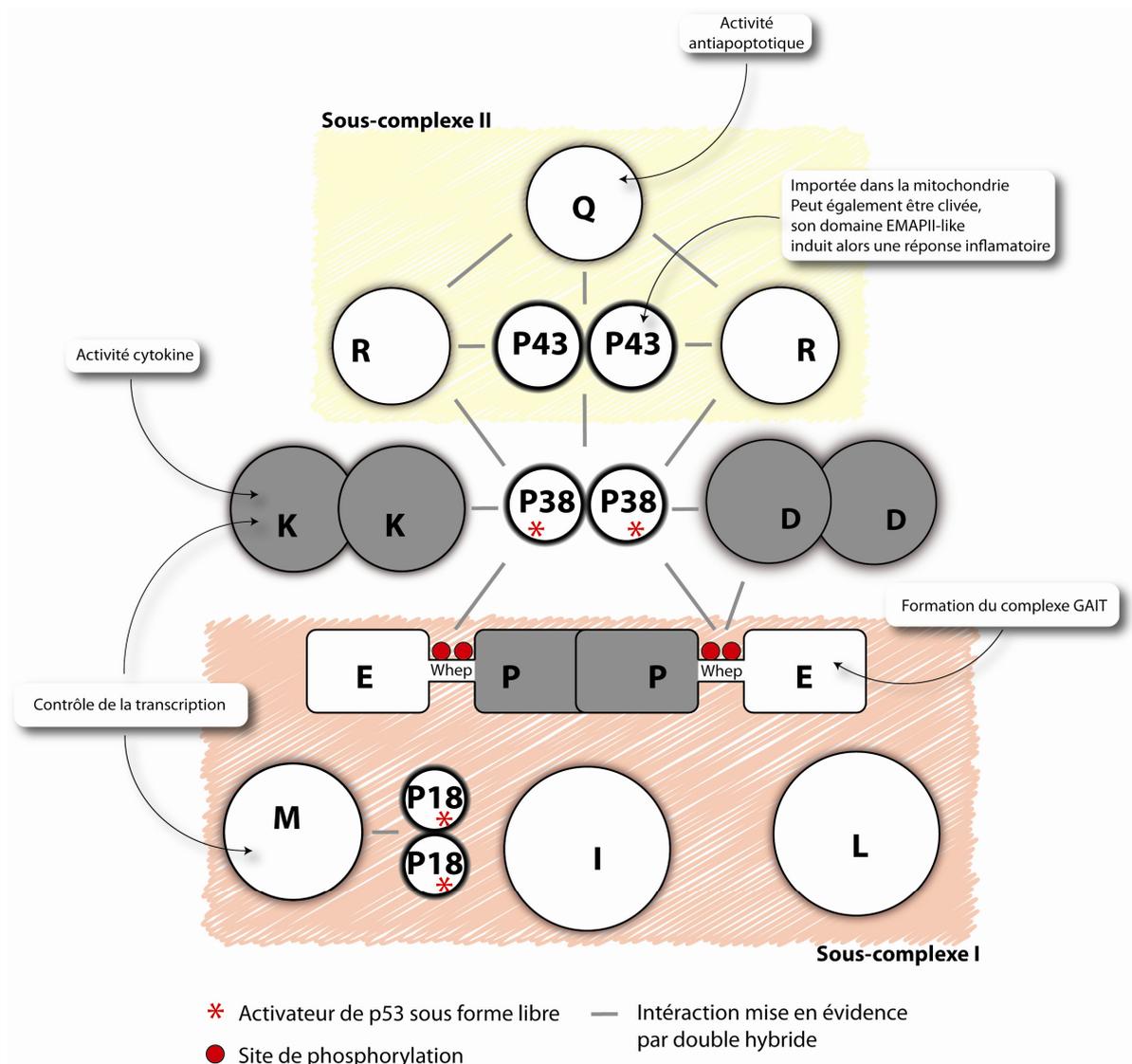
Toujours chez la levure, la tyrosyl-ARNt synthétase forme un complexe avec la protéine Knr4 (Dagkessamanskaia et al., 2001) impliquée dans la synthèse de la membrane plasmique, le rôle de ce complexe n'a pas encore été identifié, mais il pourrait avoir son importance lors de la sporulation où ces deux protéines participeraient à la formation de di-tyrosine, un composant essentiel de la paroi des spores (Coluccio et al., 2004; Ivakhno and Kornelyuk, 2005).

Chez l'Homme et les eucaryotes supérieurs, un complexe se démarque des autres, le complexe multi-synthétasique ou MSC (Bandyopadhyay and Deutscher, 1971; Kerjan et al., 1994). Celui-ci englobe neuf activités aminoacyl-ARNt synthétases assurées par huit enzymes différentes, ainsi que trois protéines auxiliaires assurant le maintien de la structure globale, p38, p43 et p18 (Robinson et al., 2000). On y trouve les lysyl-, isoleucyl-, leucyl-, méthionyl-, glutaminyl-, arginyl- et aspartyl-ARNt synthétases (respectivement K-, I-, L-, M-, Q-, R- et DRS) ainsi que la glutamyl-prolyl-ARNt synthétase (EPRS) composée d'un même peptide dans lequel les deux aminoacyl-ARNt synthétases sont fusionnées dans l'ordre suivant : E- puis PRS de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale, grâce un linker.

En plus de ce complexe massif de 1.4 MDa, on retrouve également un complexe dimérique entre la valyl-ARNt synthétase (VRS) et eEF1A ou entre la DRS ou la KRS qui se sont détachées du MSC et eEF1A. Comme pour ces deux dernières, l'EPRS peut se détacher du MSC pour former un complexe d'inhibition de la traduction, appelé complexe GAIT, dans lequel l'EPRS interagit avec la protéine ribosomique L13a, la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), et NSAP1 sur lequel nous allons revenir un peu plus longuement. Enfin, il existe également un complexe entre la KRS et la protéine Gag du VIH impliquée dans l'assemblage de la particule virale et l'empaquetage de l'ARNt<sup>Lysine</sup>, même si on ne peut pas réellement qualifier cet assemblage de complexe synthétasique eucaryotique.

Il est intéressant de voir que le MSC contient uniquement des aaRS activant des acides aminés chargés ou hydrophobes, mais non aromatiques, alors que les aaRS dédiées aux plus petits ou aux plus grands acides aminés sont absentes (Wolfson and Knight, 2005) de ce complexe. Il est finalement possible que toutes ces enzymes rejoignent le complexe à un moment ou à un

autre et que notre vision actuelle du MSC est altérée par les limites des techniques utilisées pour le caractériser (Hausmann and Ibba, 2008).



**Figure I-18**

Représentation schématique de la composition du MSC et des fonctions secondaires de ses composants d'après les données les plus récentes (Kaminska et al., 2009), les sous-complexe I et II peuvent se former en l'absence de p38. Les interactions double-hybride proviennent de (Quevillon et al., 1999). Les détails des fonctions secondaires sont exposés dans le texte principal.

La cryo-microscopie a permis de voir que le MSC est une particule compacte en forme de V (Norcum, 1989, 1999). Une étude basée sur une approche de double hybride indique qu'il y a 11 interactions entre les domaines additionnels des aaRS au sein du complexe (Vellekamp and Deutscher, 1987), sans compter les interactions potentielles entre les corps catalytiques (Agou and Mirande, 1997; Han et al., 2003; Kaminska et al., 2009; Kim et al., 2000; Quevillon et al., 1999; Rho et al., 1999). Ainsi, il semble que les interactions soient nombreuses et se stabilisent mutuellement. On sait par exemple, que la liaison de p38 à la QRS est stabilisée par la présence de p43 et de la RRS. La KRS et la DRS sont les enzymes les moins fortement ancrées dans le complexe et peuvent être détachées du MSC par simple augmentation de la concentration en sel, suivent ensuite la MRS, la QRS et la RRS que l'on retrouve libres dans la cellule (Cirakoglu et al., 1985; Han et al., 2006a; Han et al., 2006b; Ko et al., 2001; Norcum, 1991).

Les protéines p38, p43 et p18 sont essentielles à l'existence du complexe, p38 semble interagir plus ou moins fortement (affinité de 0.3 nM à 5  $\mu$ M ; (Robinson et al., 2000) avec toutes les protéines du complexe mais selon des canevas qui n'ont pas encore été clairement déchiffrés (Kim et al., 2002). Il a cependant été démontré qu'elle peut interagir fortement avec le domaine WHEP, présent sur la WRS, HRS, EPRS, GRS et MRS (Jia et al., 2008; Shiba, 2002). Cette protéine possède également une fonction en dehors du MSC. En se liant à la protéine FUSE, elle promeut l'inhibition de c-myc qui est lui-même un activateur transcriptionnel à large champ. P38 semble également être un activateur de p53 (Han et al., 2008) . Comme p38, p43 est une protéine qui stabilise l'ensemble du MSC (Wolfe et al., 2003) et qui peut se relocaliser dans la mitochondrie, bien que l'on ne connaisse pas sa fonction dans ce compartiment (utilisation d'un site d'initiation alternatif ; (Shalak et al., 2009). P43 est également l'homologue d'Arc1p et partage avec lui le domaine EMAPII-like (que l'on retrouve également dans certaines aaRS) qui peut lui être retiré lors d'un clivage apoptotique afin de déclencher toute une panoplie de mécanismes inflammatoires (Shalak et al., 2001).

Enfin, le rôle de p18 n'est pas encore bien défini, dans le MSC, elle assure un rôle similaire à celui de ses deux partenaires, mais son homologie avec la partie N-terminale de la VRS impliquée dans la liaison avec eEF1A pourrait permettre à p18 de recruter ce cargo et créer un phénomène de channeling d'aminoacyl-ARNt entre le MSC et le ribosome (Sang Lee et al.,

2002). Pour être complet j'ajouterai que p18, comme p38, active p53 dont nous avons parlé au début de l'introduction (Park et al., 2005). Pour approfondir le sujet, vous pouvez vous référer à deux excellentes revues, *Aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multifunctional proteins (AIMPs): a triad for cellular homeostasis* de S. Kim (Park et al., 2010) ainsi que *Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: molecular multitasking revealed* écrite par Michael Ibba et ses collègues (Hausmann and Ibba, 2008).

L'exposition de la multitude des fonctions connues pour ces complexes est faite à dessein. En effet, à travers le prisme de nos connaissances sur le sujet, on peut distinguer le rôle central de ces assemblages dans l'organisation et le contrôle des fonctions de la cellule. La formation de ces complexes ne semble pas uniquement faite pour rassembler les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) afin d'augmenter leur capacité d'amination, effet qui d'ailleurs n'est pas mis en évidence dans le cas du MSC, mais plutôt de contrôler par rétention ou relargage, des fonctions secondaires que les aaRS auraient acquises au cours de l'évolution, par l'addition de domaines supplémentaires ou apparition d'interactants permettant d'étendre leur réseaux fonctionnel (Ray et al., 2007).

Ainsi la première hypothèse avancée quant au rôle de ces complexes est de confiner les partenaires dans le cytoplasme. Il semble que la majorité des aaRS soient présentes dans le noyau humain et formeraient même un potentiel MSC pour y assurer un rôle de contrôle de la qualité des ARNt avant export vers le cytoplasme (Steiner-Mosonyi and Mangroo, 2004; Wolfe et al., 2003). La MRS humaine, clairement présente dans les nucléoles, est même chargée de promouvoir la transcription des ARN ribosomiques (Ko et al., 2000). Ce sujet est abordé plus en détail dans la deuxième revue ainsi que dans les commentaires des premier et deuxième articles. Cette discussion est faite en parallèle avec l'import mitochondrial des aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS). En effet nous avons montré que le complexe AME assure un rôle essentiel dans la synchronisation de l'import de ses deux partenaires la MRS et l'ERS, importés respectivement dans le noyau et la mitochondrie.

Le plus bel exemple du rôle de régulation des fonctions secondaires portées par les enzymes du MSC est celui de la glutamyl-prolyl-ARNt synthétase (EPRS). Le Pr. Paul Fox et son équipe ont montré dans une succession de travaux que cette enzyme peut quitter le MSC après une double phosphorylation du triple domaine WHEP, assurant le rôle de linker entre les parties ERS et PRS (Jia et al., 2008). Cette phosphorylation est déclenchée par un traitement de

deux heures à l'interféron  $\gamma$  et semble impliquer la voie PKA et/ou CDK (Arif et al., 2009). Une fois libre, cette enzyme se lie à un premier partenaire NSAP1 pour former un pré complexe inactif puis, environ 14 à 16h plus tard, à deux autres partenaires, L13a et la GAPDH pour former le complexe GAIT ( $\gamma$ -interferon activated inhibition of translation) actif capable de se fixer sur un motif spécifique en 3' d'une trentaine d'ARN messagers codant pour des protéines de la réponse inflammatoire (Kapasi et al., 2007; Mazumder et al., 2003; Sampath et al., 2003; Sampath et al., 2004). L'EPRS englobée dans le complexe GAIT s'ancre sur la tige-boucle et maintient la protéine d'initiation de la traduction eIF4G afin de stopper la traduction. Ainsi au bout de 14h une partie de la réponse inflammatoire induite par l'interféron est stoppée.

### **b) Autres fonctions secondaires des aminoacyl-ARNt synthétases**

Pour terminer cette introduction j'aimerais brièvement évoquer les fonctions alternatives des aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) libres qui peuvent également assurer des fonctions secondaires.

L'alanyl- et la thréonyl-ARNt synthétases (A- et TRS) d'*Escherichia coli* ainsi que l'aspartyl-ARNt synthétase (DRS) de levure obéissent à un mécanisme d'auto rétrocontrôle qui, comme nous l'avons vu, permet de stabiliser leur expression. La première se fixe directement sur son gène et inhibe la transcription (Putney and Schimmel, 1981), les deux suivantes inhibent leur traduction en se fixant sur une structure en 5' de l'ARNm mimant la structure de l'ARNt homologue (Frugier et al., 2005; Romby and Springer, 2003).

La TRS et la tyrosyl-ARNt synthétase (YRS) humaines possèdent après clivage et sécrétion une activité de cytokine (Fleckner et al., 1991; Liu et al., 2004; Wakasugi et al., 2002a; Wakasugi et al., 2002b), tout comme l'histidyl-ARNt synthétase, l'asparaginyl-ARNt synthétase et la séryl-ARNt synthétase. Cependant ces trois dernières enzymes ne semblent pas nécessiter de clivage pour activer leur fonction secondaire (Ramirez et al., 2006).

<b>Organisme</b>	<b>Aminoacyl-ARNt synthétase (aaRS)</b>	<b>Localisation</b>	<b>Fonction</b>	<b>Références</b>
<i>E.coli</i>	TRS	Cytoplasme	Contrôle de la traduction	Brunel et al. (1993) Romby et al. (1996) Torres-Larios et al. (2002)
	ARS	Cytoplasme	Contrôle de la transcription	Putney & Schimmel (1981)
<i>S.cerevisiae</i>	LRS	Mitochondrie	Splicing des introns de groupe I	Herbert et al. (1988) Labouesse (1990) Rho et al. (2002)
<i>N.crassa</i>	YRS	Mitochondrie	Splicing des introns de groupe I	Akins & Lambowitz (1987) Cherniack et al. (1990) Paukstelis et al. (2005)
<i>H.sapiens</i>	MRS	Noyau	Contrôle de la transcription	Ko et al. (2000)
	QRS	Cytoplasme	Inhibition de l'apoptose	Ko et al. (2001)
	TRS	Milieu extracellulaire	Effet angiostatique	Otani et al. (2002) Wakasugi et al. (2002b) Kise et al. (2004)
	YRS	Milieu extracellulaire	Effet angiogénique	Wakasugi et al. (2002a) Greenberg et al. (2008)
	KRS	Milieu extracellulaire	Rôle de cytokine pro-inflammatoire	Park et al. (2005c)
	KRS	Membrane plasmique	Assemblage du VIH	Javanbakht et al. (2003) Guo et al. (2005) Kovaleski et al. (2006)
	KRS	Noyau	Contrôle de la transcription	Lee et al. (2004b)
	HRS	Milieu extracellulaire	Chimiotaxie des leucocytes	Howard et al. (2002)
	EPRS	Cytoplasme	Inhibition de la traduction	Sampath et al. (2004) Ray et al. (2007)

**Figure I-19**

Résumé des fonctions secondaires attribuées aux différentes aminoacyl-ARNt synthétases.

## ***D. Les complexes multi protéiques, une stratégie simple pour coordonner les modules fonctionnels de la cellule***

Une étude systématique des complexes de la levure a démontré qu'il existe dans cet organisme plus de 500 complexes différents formés en moyenne de 5 partenaires (Krogan et al., 2006). Ces complexes peuvent être stables afin d'exécuter des tâches complexes (ribosome, récepteurs etc.), ou dynamiques dans le but de transférer de l'information (complexes d'activation de la transcription, transmission du signal etc.). Mais au-delà de leur fonction primaire, ces complexes pourraient nous cacher leur rôle le plus fondamental : la régulation des fonctions secondaires de leurs partenaires.

Les travaux de Paul Fox et de ses collaborateurs sur le complexe GAIT et le rôle de l'EPRS illustrent ce concept et nous ont amené à repenser les complexes sous un nouveau jour, en montrant qu'une fois relâchée, l'EPRS inhibe la traduction et est donc capable d'assurer un rôle qui dévie de sa fonction primaire d'aminacylation.

Ainsi, le MSC (et le ribosome également) peut être considéré comme un dépôt de molécules assurant des fonctions primaires en complexe mais pouvant être chargés d'autres fonctions non encore élucidées une fois relâchées, qu'il faut alors arriver à isoler en se mettant dans des conditions où la fonction primaire n'interfère pas. Si les exemples ne sont pas nombreux, tout complexe macromoléculaire, stable ou non doit être considéré comme étant potentiellement une stratégie de contrôle de la fonction alternative de ses partenaires.

Mon travail de thèse a débuté par l'étude du rôle d'une protéine mitochondriale de levure dont la fonction était alors inconnue, Pet112. Cette protéine est un homologue des GatB de bactéries, cependant, une étude publiée un an avant ma thèse semblait confirmer l'absence de voie de transamidation dans la mitochondrie de levure (Rinehart et al., 2005). Après une année et demie, mon travail a permis de prouver que cette protéine fait partie d'une amidotransférase ARNt-dépendante (AdT) mitochondriale chargée de synthétiser le Q-ARNt<sup>Q</sup> mitochondrial. La surprise est venue du premier partenaire de la voie de transamidation. En effet, la glutamyl-ARNt synthétase non discriminante essentielle à la production du précurseur mitochondrial E-ARNt<sup>Q</sup> s'est avéré être l'ERS cytoplasmique (ND-<sub>c</sub>ERS) qui est

*de facto* doublement localisée entre le cytoplasme et la mitochondrie. Cette double localisation est contrôlée par Arc1p le partenaire cytoplasmique de la ND- $\epsilon$ ERS, une protéine à ce moment là déjà bien connue. J'ai alors vérifié l'évolution de l'expression de cette protéine au cours de l'adaptation de la levure à la respiration. En effet, la levure se prête bien à ce genre d'investigations. Il s'est avéré qu'Arc1p est fortement sous exprimée lors de l'adaptation à la respiration, alors que la ND- $\epsilon$ ERS, son partenaire, reste exprimée de manière stable. Ce comportement génère un import plus important de la synthétase en augmentant la proportion de sa forme libre, seule forme capable d'être importée. Nous avons alors fait un bilan des connaissances sur Arc1p qui s'avère être une protéine aux fonctions diverses et mal connues, mais qui respecte cette idée d'une protéine nodale au cœur de multiples modules.

Au regard des résultats obtenus, je me suis interrogé sur le rôle cellulaire de Arc1p et de sa place vraisemblable à l'interface d'au moins deux modules, l'adaptation à la respiration et la traduction, *via* son rôle dans l'import mitochondrial de la ND- $\epsilon$ ERS afin que celle-ci permette la synthèse de Q-ARNt<sup>Q</sup> dans la mitochondrie. Nous avons alors cherché à savoir quel est le rôle physiologique et cellulaire du complexe impliquant Arc1p, le complexe AME, dans l'adaptation à la respiration. Ces travaux sont présentés dans le dernier manuscrit de la partie principale de ma thèse.

Mon investigation des voies de signalisation de la levure et du schéma transcriptionnel de Arc1p nous ont permis de prouver que Arc1p est contrôlé par la voie Snf1/4 et que sa répression augmente la quantité de formes libre des deux aaRS qui lui sont fixées, la MRS cytoplasmique et la ND- $\epsilon$ ERS. Ces deux enzymes vont alors respectivement rejoindre le noyau et la mitochondrie afin de déclencher de manière synchronisée la production de partenaires essentiels à la respiration : les sous unités de la chaîne respiratoire.

Ce rôle de synchroniseur est apparu essentiel et représente le cœur de ces travaux, en effet la cellule, pour coordonner spatialement l'expression de gènes de génomes présents dans deux compartiments bien distincts, utilise le complexe AME. Ce complexe endosse le rôle de relai qui a la charge de transformer un signal qui lui provient de manière verticale en deux signaux distincts. Il parvient à le faire *via* le relargage synchrone de ses deux partenaires. Par cette approche, nous avons également pu découvrir par quel moyen est synchronisée une partie de la chaîne respiratoire car le respect de la stoechiométrie dans les complexes de la chaîne

respiratoire est vital. En effet la désynchronisation de ce système peut mener à la mort de la cellule par production massive de radicaux libres.

C'est dans ce rôle de synchronisation et de division du signal reçu par relargage ou rétention de ses partenaires que les complexes deviennent essentiels selon nous. Il est certain que ce type de système et de signalisation va devenir de plus en plus courant à mesure que l'évolution des techniques permettra de séparer la fonction primaire de la fonction secondaire d'une protéine afin de contrôler celle-ci et d'étudier son rôle.

## II. Résultats et discussion

### ***A. La formation de glutaminyl-ARNt<sup>glutamine</sup> dans les organites***

Les mitochondries et chloroplastes ont la particularité de posséder leur propre génome qu'il faut transcrire puis traduire. En ce qui concerne la traduction, les organites possèdent leur propre système d'aminacylation ainsi qu'un ribosome organellaire spécifique. Cependant le génome mitochondrial humain, par exemple, n'a conservé que 13 gènes codant pour des partenaires de la chaîne respiratoire ou des protéines impliquées dans la régulation de sa formation, 22 gènes d'ARN de transfert et 2 gènes d'ARN ribosomiques (le 16S et le 12S *cf.* I.C.1.d). Le génome de la levure quant-à lui code 18 gènes de protéines, 25 gènes d'ARN de transfert 2 gènes d'ARN ribosomiques (21S et 15S) (Gray et al., 2001) et un gène de l'ARN catalytique de la RNaseP. Il arrive même que le génome mitochondrial de certains organismes primitifs ne codent plus aucun gène d'ARNt (C'est le cas des trypanosomes; Benne, 1994).

Comme le génome mitochondrial ne code aucune aminoacyl-ARNt synthetase et que parfois certains gènes d'ARNt sont manquant, cet organite doit absolument importer ses aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) et éventuellement les ARNts qui manquent. C'est pourquoi nous devrions trouver dans le génome nucléaire de tous les eucaryotes étudiés jusqu'à présent 20 gènes codant les aaRSs dédiées à l'aminacylation cytoplasmique et 20 codant les aaRSs mitochondriales. Ces dernières, uniquement dédiées à l'aminacylation des ARNt mitochondriaux portent, en général, une pré-séquence d'adressage du côté N-terminal qui sert de signal d'import. Cette séquence est globalement basique et prend généralement la forme d'une hélice  $\alpha$ . Elle permet à la protéine d'être reconnue par le système TOM d'import mitochondrial, qui va la déplier puis la transférer au complexe TIM. Ce dernier fait pénétrer la protéine dans la matrice mitochondriale où la séquence d'adressage est clivée grâce à la chaperone HSP70 qui assiste une protéase spécifique. Il existe d'autres types de séquences

d'adressage internes qui sont beaucoup moins bien caractérisées car plus difficilement identifiables. (Pour une bonne revue cf: Bolender et al., 2008).

On retrouve donc dans les génomes nucléaires des gènes spécifiques d'aaRS mitochondriales facilement identifiés par la présence de pré séquences d'adressage. Il arrive cependant qu'on ne puisse pas trouver la version mitochondriale et qu'il n'y ait qu'une version cytoplasmique du gène l'aminocyl-ARNt synthétase en question. Dans ce cas le gène encode la plupart du temps les deux formes grâce à deux sites alternatifs d'initiation de la traduction, aboutissant à deux produits traductionnels différents, l'un importable car synthétisé avec une pré séquence d'adressage et l'autre qui reste dans le cytoplasme (Chatton et al., 1988; Tang et al., 2004; Turner et al., 2000).

Il existe cependant un exemple échappant à tous ces cas de figure, la glutaminyl-ARNt synthétase mitochondriale ( $_m$ QRS). En effet on ne retrouve jamais de gène codant pour cette enzyme, et ceci dans tous les génomes des eucaryotes séquencés à ce jour. De plus dans la quasi-totalité de ces eucaryotes, le gène de la QRS cytoplasmique ne possède pas de site alternatif d'initiation de la traduction. La seule exception recensée à ce jour est celle des eucaryotes unicellulaires *Leishmania tarentolae* et *Trypanosoma brucei* où il a été montré qu'il existe une activité  $_m$ QRS mais la forme mitochondriale issue de la traduction alternative du gène unique de QRS n'a pas encore été caractérisée (Nabholz et al, 1994 ; Rinehart et al, 2004)

Ainsi, plusieurs cas de figures peuvent être envisagés afin de synthétiser le Q-ARNt<sup>Q</sup> mitochondrial : premièrement la QRS cytoplasmique est importée grâce à des séquences d'adressage internes, soit il y a utilisation d'une voie de transamidation organellaire. Ce dernier cas de figure nécessiterait l'import d'une glutamyl-ARNt synthétase non discriminante (ND-ERS) et d'une amidotransférase ARNt-dépendante (AdT) qui assureront la synthèse du Q-ARNt<sup>Q</sup> mitochondrial.

Au moment où nous avons rédigé cette revue, l'équipe de Laurence Drouard-Maréchal en collaboration avec notre équipe venait de démontrer que la voie de transamidation est utilisée pour la synthèse du Q-ARNt<sup>Q</sup> dans la mitochondrie et le chloroplaste d'*A.thaliana* et que ces 2 organites utilisent la même AdT organellaire doublement adressée (Pujol et al., 2008). En revanche, trois années plus tôt, l'équipe de Dieter Söll publiait un article suggérant que cette

même voie indirecte était absente de la mitochondrie de levure (Rinehart et al., 2005). Ainsi, nous discutons dans la revue suivante le problème que pose l'identification de la voie de formation du Q-ARNt<sup>Q</sup> dans les organites, en nous appuyant sur les informations disponibles à ce moment sur les plantes (*A.thaliana* et l'orge), la levure, ainsi que deux parasites, *T.brucei* et *L.tarentolae*.

À la lumière des informations disponibles nous avançons un concept général, si l'organisme en question possède un gène d'ARNt<sup>Q</sup> dans son génome mitochondrial et que son génome nucléaire code la protéine Pet112, homologue de la sous-unité GatB des AdT procaryotiques, il est très probable qu'il utilise une voie de transamidation organellaire. Il doit donc y avoir import d'une ND-ERS ainsi que d'une AdT dans la mitochondrie.

À l'inverse, s'il n'y a pas d'ARNt<sup>Q</sup> codé par le génome mitochondrial et que le gène codant la protéine Pet112 est absent du génome nucléaire, il est vraisemblable que cet eucaryote importe la voie cytoplasmique (la QRS cytoplasmique et l'ARNt<sup>Q</sup> cytoplasmique) de formation du Q-ARNt<sup>Q</sup>. La seule exception à ce paradigme restait la levure *S. cerevisiae*, qui possède la protéine Pet112 et un gène codant l'ARNt<sup>Q</sup> dans le génome mitochondrial alors qu'il avait été montré qu'elle importe la voie cytoplasmique de formation du Q-ARNt<sup>Q</sup>. Nous le verrons dans la partie suivante, les travaux menés au cours de ma thèse sur la protéine mitochondriale de levure Pet112 rétabliront le paradigme que nous avons établi dans cette revue.

## Point of View

# Translating organellar glutamine codons

## A case by case scenario?

Mathieu Frechin,<sup>1</sup> Anne-Marie Duchêne<sup>2</sup> and Hubert Dominique Becker<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>UPR 'Architecture et Réactivité de l'ARN'; Université Louis Pasteur de Strasbourg; CNRS; Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire; Strasbourg, France; <sup>2</sup>Institut de Biologie Moléculaire des Plantes; UPR 2357 du CNRS; Université Louis Pasteur de Strasbourg; Strasbourg, France

**Abbreviations:** AdT, tRNA-dependent amidotransferase; *c*, cytosolic; *ch*, chloroplastic; E, glutamate; E-tRNA, glutamyl-tRNA; *m*, mitochondrial; ND-ERS, nondiscriminating glutamyl-tRNA synthetase; Q, glutamine; QRS, glutamyl-tRNA synthetase; Q-tRNA, glutamyl-tRNA; tRNA<sup>Q</sup>, tRNA<sup>Gln</sup>

**Key words:** aminoacyl-tRNA synthetase, tRNA-dependent amidotransferase, AdT, chloroplast, glutamyl-tRNA synthetase, glutamyl-tRNA synthetase, mitochondria

Aminoacyl-tRNAs are generally formed by direct attachment of an amino acid to tRNAs by aminoacyl-tRNA synthetases, but glutamyl-tRNA (Q-tRNA) is an exception to this rule. Glutamyl-tRNA<sup>Gln</sup> (Q-tRNA<sup>Q</sup>) is formed by this direct pathway in the eukaryotic cytosol and in a small subset of bacteria, but is formed by an indirect transamidation pathway in most bacteria and archaea. To date it is almost impossible to predict what pathway generates organellar Q-tRNA<sup>Q</sup> in a given eukaryote. All eukaryotic genomes sequenced so far, display a single glutamyl-tRNA synthetase (QRS) gene which is at least responsible for the cytosolic QRS activity, as well as a gene coding for a mitochondrial ortholog of the essential GatB subunit of the tRNA-dependent amidotransferase (AdT). Indeed, QRS activity was found in protozoan mitochondria while AdT activity was characterized in plant organelles. The pathway for Q-tRNA<sup>Q</sup> synthesis in yeast and mammals mitochondria is still questionable.

Eukaryotes have organellar-entrapped genomes, and as a consequence all essential biological processes that sustain transfer of the genetic information occur in a compartmentalized fashion. There are compartment-specific sets of enzyme used for translation of genes localized in the nucleus and in organelles. Since organellar genomes do not encode enzymes used for their translation, the nuclear genome usually encodes two pools of enzymes, one used for cytosolic translation and another that is specifically addressed to the organelle via addition of targeting sequences. The protein components of the translation machinery typically fall into this category, the nuclear genome encoding both cytosolic and organellar forms. Thus, the formation of the twenty canonical aminoacyl-tRNA (aa-tRNA) species used as substrates for ribosomal-directed

translation of organellar messenger RNA will require import, in these compartments, of a complete set of twenty organellar-targeted aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS) encoded by the nuclear genome.<sup>1,2</sup> In some species, the gene encoding a given organellar aaRS can be missing and a single gene encodes both cytosolic and organellar isoforms as the result of translation of either an alternative splice variant or because translation begins at an alternative start site.<sup>3,4</sup> Consequently, both isoforms will have different sequences and, since only one has an organellar targeting sequence, each isoform is specific for a single cellular compartment. However, the translation of glutamine codons in mitochondria cannot be resolved within the existing paradigm of organellar aa-tRNA synthesis. A single QRS gene encoding the cytosolic QRS is found in all eukaryotic genomes analyzed so far, but the gene that would specifically encode the organellar QRS is always missing. This is probably due to the bacterial origin of these organelles, since the vast majority of bacteria is also lacking the gene encoding QRS and use an alternative pathway to generate glutamyl-tRNA<sup>Gln</sup> (Q-tRNA<sup>Q</sup>). This pathway is called the transamidation pathway, whereby a glutamate mischarged onto tRNA<sup>Q</sup>, produced by a non-discriminating glutamyl-tRNA synthetase (ND-ERS), is subsequently transamidated into glutamine by a tRNA-dependent amidotransferase (AdT).<sup>5-7</sup> In bacteria, the AdT catalyzing this process is a hetero-trimeric enzyme called the GatCAB AdT.<sup>6</sup> To date organellar Q-tRNA<sup>Q</sup> formation has only been examined in a few eukaryote species and led to the discovery that eukaryotes can use two different pathways to generate this particular aa-tRNA species. Either they import the cytosolic pathway, meaning cytosolic QRS (*c*QRS) and cytosolic tRNA<sup>Gln</sup> (*c*tRNA<sup>Q</sup>) or they use an organellar transamidation pathway. Yet, all eukaryotes, except some protozoans, encode organellar orthologs of GatCAB AdT subunits, even in the species that have been shown not to use the transamidation pathway to form organellar Q-tRNA<sup>Q</sup>. Therefore, it is almost impossible to predict, based on genomics, what pathway generates mitochondrial glutamyl-tRNA<sup>Gln</sup> (Q<sub>m</sub>tRNA<sup>Q</sup>) in a given eukaryotic species. The same is true for the tRNA<sup>Q</sup> species that will be used by the organellar translation machinery. With the exception of protozoans all organellar genomes encode a tRNA<sup>Q</sup> species,

\*Correspondence to: Hubert Dominique Becker; Université Louis Pasteur de Strasbourg; IBMC; 15, rue René Descartes; Strasbourg 67084 France; Tel.: +33.388417041; Fax: +33.388602218; Email: h.becker@ibmc.u-strasbg.fr

Submitted: 06/26/08; Accepted: 12/02/08

Previously published online as an RNA Biology E-publication:  
<http://www.landesbioscience.com/journals/mabiology/article/7564>

however some eukaryotic species additionally import nuclear-encoded tRNA<sup>Q</sup>. It is now very clear that formation of organellar Q-tRNA<sup>Q</sup> is far from being uniform and that very likely there will be species-specific if not organelle-specific strategies for the synthesis of Q-tRNA<sup>Q</sup>.

**The Transamidation Strategy Used by Plants**

The first report on organellar Q-tRNA<sup>Q</sup> synthesis came from experiments with barley chloroplast extracts, performed twenty years ago, and unambiguously showed that Q-tRNA<sup>Q</sup> synthesis proceeds by transamidation of a mischarged chloroplastic glutamyl-tRNA<sup>Gln</sup> (E<sub>ch</sub>-tRNA<sup>Q</sup>),<sup>8</sup> like in prokaryotes lacking QRS (Fig. 1). This work additionally suggested that plant and mouse mitochondria also use the transamidation pathway to form Q<sub>m</sub>-tRNA<sup>Q</sup>, based on the result that QRS activity could not be detected in any of the mitochondrial extract that were assayed. The general idea that organellar and especially Q<sub>m</sub>-tRNA<sup>Q</sup> synthesis uniformly proceeds via the transamidation pathway was later reinforced by accumulating sequence data coming from whole genome sequencing projects. All eukaryotic genomes sequenced so far are deprived of the gene encoding a <sub>m</sub>QRS. With the exception of some protozoan parasites, they all concomitantly display a gene of a GatB ortholog, named Pet12, which is always predicted to be mitochondrial.<sup>9</sup> Since the presence of a *gatB* gene in a given genome invariably signs the presence of an AdT in the corresponding organism, the presence of mitochondrial GatB (Pet12) proteins in eukaryotes should prefigure the existence of a mitochondrial AdT. We showed, twenty years after the biochemical characterization of the transamidation reaction, that *Arabidopsis thaliana* mitochondrial- and chloroplastic-encoded Q-tRNA<sup>Q</sup> are actually made by a unique dual targeted GatCAB AdT that transamidate both organellar E<sub>ch</sub>-tRNA<sup>Q</sup> and E<sub>m</sub>-tRNA<sup>Q</sup> formed by a unique mischarging organellar ERS also dual targeted (Fig. 1).<sup>10</sup>

**The QRS/tRNA<sup>Q</sup> Import Strategy Used by Protozoans and Fungi**

The paradigm of mitochondrial Q-tRNA<sup>Q</sup> formation established through

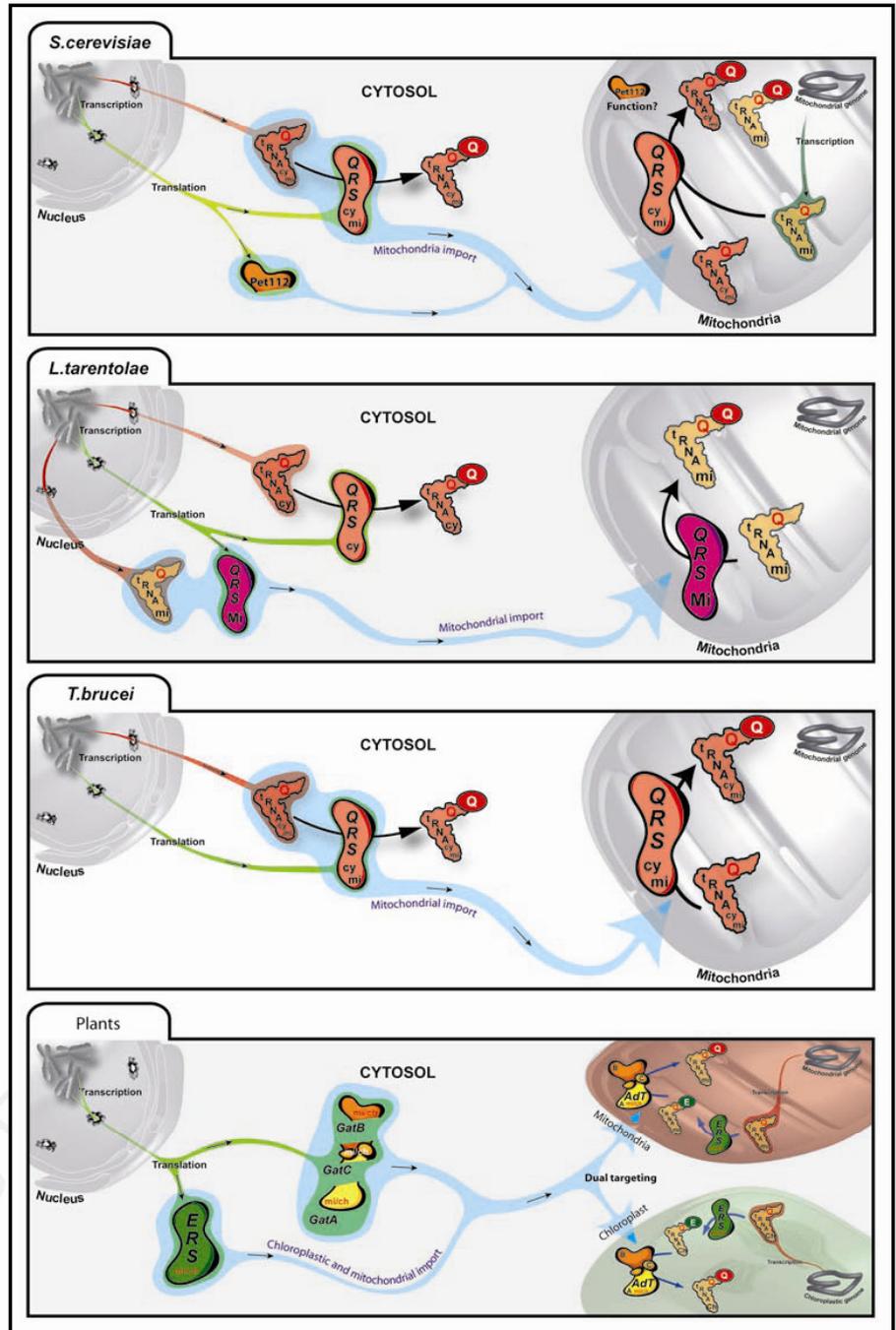


Figure 1. The various enzymes and tRNA<sup>Q</sup> species used by eukaryotes to generate organellar Q-tRNA<sup>Q</sup>. In higher plants like *A. thaliana*, the mitochondrial [m] tRNA<sup>Q</sup> and chloroplastic [ch] tRNA<sup>Q</sup> are encoded by the respective organellar genomes. The dual targeted [m i/ch] ND-ERS and AdT are responsible for Q-tRNA<sup>Q</sup> formation in both organelles. *L. tarentolae* has two tRNA<sup>Q</sup> isoacceptors which are used for cytosolic [cy] or mitochondrial Q-tRNA<sup>Q</sup> formation. Additionally, there are two compartment-specific QRS activities. In *T. brucei* a single nuclear-encoded tRNA<sup>Q</sup> [cy/mi] is used for both cytosolic and mitochondrial Q-tRNA<sup>Q</sup> formation, and a single QRS [cy/mi] is dually localized in the cytosol and mitochondria. In *S. cerevisiae*, both mitochondrial-encoded [mi] and imported nuclear-encoded tRNA<sup>Q</sup> [cy/mi] coexist in mitochondria. The cytosolic QRS [cy] was shown to be imported but an ortholog of GatB is also present in mitochondria.

the pioneering study made by Schön and coworkers is, however, contradicted by different studies.<sup>11-14</sup> Two distinct QRS activities, one being specifically mitochondrial, were detected in the parasite *Leishmania tarentolae*,<sup>12</sup> but a single QRS gene is annotated in *L. major* genome (www.genedb.org). It was later shown that a related parasite, *Trypanosoma brucei*, does not contain two distinct QRSs, but that the single QRS gene encodes a QRS that is responsible for both cytosolic and mitochondrial Q-tRNA<sup>Q</sup> formation.<sup>13</sup> In addition, *T. brucei* and *L. tarentolae*, which have lost their entire set of mitochondrial tRNA genes, must import all the tRNAs necessary for mitochondrial protein synthesis (Fig. 1). It is still unknown whether protozoan mitochondrial and cytosolic QRS activities are displayed by a single translational product that will be dual localized or if there are two genes each encoding a compartment-specific isoform. Along the same line, a recent study reports that in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the <sub>c</sub>QRS together with two nuclear-encoded tRNA<sup>Q</sup> are also addressed to the mitochondrion and might be used by this organelle to generate Q-tRNA<sup>Q</sup> used for mitochondrial protein synthesis<sup>14</sup> (Fig. 1). This result came to a big surprise for two reasons, (1) it was contradicting several earlier studies suggesting that yeast mitochondrial Q-tRNA<sup>Q</sup> was not generated by direct charging of mitochondrial tRNA<sup>Q</sup> by a <sub>m</sub>QRS but rather by a mitochondrial transamidation pathway,<sup>8,9,12,15,16</sup> and (2) yeast mitochondrial genome encodes a tRNA<sup>Q</sup> competent for decoding glutamine codons.<sup>17</sup> Indeed, Nabholz and coworkers reported that they could not detect any <sub>m</sub>QRS activity using yeast mitochondrial extract and total mitochondrial tRNA.<sup>12</sup> In addition, it had been shown that the yeast *gatB* gene (*pet112*) is essential for mitochondrial viability and that the respiratory deficiency induced by its alteration can be rescued by expression of a mitochondrially-targeted version of *Bacillus subtilis* GatB subunit.<sup>15</sup> Taken together, these data would suggest that a mitochondrial AdT could as well also be responsible for Q-tRNA<sup>Q</sup> formation in this organelle. It was found twenty years ago that the mitochondrial genome encodes a single tRNA<sup>Q</sup> and tRNA<sup>E</sup> gene, however, two different E-tRNAs species were identified. Using ribosome-binding assays, one of them was shown, as expected, to translate glutamate codons, while the second one translated glutamine CAA codons, suggesting the existence of E-tRNA<sup>Q</sup> in yeast mitochondria. However, Rinehart and coworkers unambiguously demonstrated that the yeast mitochondrial glutamyl-tRNA synthetase (<sub>m</sub>ERS) is incapable of charging, with glutamate, any of the tRNA<sup>Q</sup> species present in yeast mitochondria.<sup>14</sup> Thus, if the mischarged E-tRNA<sup>Q</sup>, which is the obligatory substrate intermediate for the AdT, cannot be synthesized by the mitochondrion, there can't be a transamidation pathway responsible for Q-<sub>m</sub>tRNA<sup>Q</sup> formation in yeast. Following this report, earlier this year, it was shown that human mitochondria import, like yeast and protozoans, nuclear-encoded tRNA<sup>Q</sup>,<sup>18</sup> although, the human mitochondrial genome encodes its own tRNA<sup>Q</sup> species. Finally, the enzymatic pathway that generates human mitochondrial Q-<sub>m</sub>tRNA<sup>Q</sup> remains still unknown.<sup>18</sup>

## Concluding Remarks

It appears that, to date, the plant organellar Q-tRNA<sup>Q</sup> pathway constitutes the only example where there is a good correlation between the origin of <sub>m</sub>tRNA<sup>Q</sup> and the enzymes used for Q-tRNA<sup>Q</sup> formation. For the four other eukaryotic species in which Q-tRNA<sup>Q</sup>

has been analyzed, many questions are still pending answers. In *Leishmania*, are the two QRS activities encoded by different QRS genes or is there a single gene producing two different translational variants? In *Trypanosoma*, how is the dual localization of a single QRS activity in two different subcellular compartments achieved? In yeast, what is the functional gain, for mitochondrial protein synthesis to import nuclear-encoded tRNA<sup>Q</sup> when a functional mitochondrial-encoded species already exists? The single yeast QRS was shown to be imported into mitochondria, yet, the two yeast AdT orthologs, GatA and GatB, have also been identified as mitochondrial and even shown to display essential mitochondrial functions.<sup>9,19</sup> Interestingly, neither QRS, nor ND-ERS or AdT activities were rigorously identified using a yeast mitochondrial extract, suggesting that it is still an open question as to whether the direct or the indirect pathway is responsible for Q-tRNA<sup>Q</sup> synthesis in yeast mitochondria. One possibility that could reconcile these opposing reports would be that the yeast mitochondrial Gat proteins or the portion of QRS that is addressed to the mitochondrion have deviated from their canonical participation to mitochondrial protein synthesis and exhibits an essential alternative mitochondrial function.

## Acknowledgements

This work was supported by the University Louis Pasteur (Strasbourg), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). M. Frechin was a recipient of a fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie.

## References

- Duchêne AM, Giritch A, Hoffmann B, Cognat V, Lancelin D, Peeters NM, Zaepfel M, Maréchal-Drouard L, Small ID. Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102:16484-9.
- Bonnefond L, Fender A, Rudinger-Thirion J, Giegé R, Florentz C, Sissler M. Toward the full set of human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases: characterization of AspRS and TyrRS. Biochemistry 2005; 44:4805-16.
- Tolkunova E, Park H, Xia J, King MR, Davidson E. The human lysyl-tRNA synthetase gene encodes both the cytoplasmic and mitochondrial enzymes by means of an unusual alternative splicing of the primary transcript. J Biol Chem 2000; 275:35063-9.
- Tang HL, Yeh LS, Chen NK, Ripmaster T, Schimmel R, Wang CC. Translation of a yeast mitochondrial tRNA synthetase initiated at redundant non-AUG codons. J Biol Chem 2004; 279:49656-63.
- Lapointe J, Duplain L, Proulx M. A single glutamyl-tRNA synthetase aminoacylates tRNA<sup>Glu</sup> and tRNA<sup>Gln</sup> in *Bacillus subtilis* and efficiently misacylates *Escherichia coli* tRNA<sup>Gln</sup>, in vitro. J Bacteriol 1986; 165:88-93.
- Curnow AW, Hong K, Yuan R, Kim S, Martins O, Winckler W, Henkin TM, Söll D. Glut-tRNA<sup>Gln</sup> amidotransferase: a novel heterotrimeric enzyme required for correct decoding of glutamine codons during translation. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:11819-26.
- Becker HD, Kern D. *Thermus thermophilus*: a link in the evolution of the tRNA-dependent amino acid amidation pathway. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 95:12832-7.
- Schön A, Kannangara CG, Gough S, Söll D. Protein biosynthesis in organelles requires misaminoacylation of tRNA. Nature 1988; 331:187-90.
- Mulero JJ, Rosenthal JK, Fox TD. PET112, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene required to maintain rho<sup>+</sup> mitochondrial DNA. Curr Genet 1994; 25:299-304.
- Pujol C, Bailly M, Kern D, Maréchal-Drouard L, Becker H, Duchêne AM. Dual-targeted tRNA-dependent amidotransferase ensures both mitochondrial and chloroplastic Gln-tRNA<sup>Gln</sup> synthesis in plants. Proc Natl Acad Sci USA 2008; 105:6481-5.
- Rusconi CR, Cech TR. Mitochondrial import of only one of three nuclear-encoded glutamine tRNAs in *Tetrahymena thermophila*. EMBO J 1996; 15:3286-95.
- Nabholz CE, Hauser R, Schneider A. *Leishmania tarentolae* contains distinct cytosolic and mitochondrial glutamyl-tRNA synthetase activities. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:7903-8.
- Rinehart J, Horn EK, Wei D, Söll D, Schneider A. Non-canonical eukaryotic glutamyl- and glutamyl-tRNA synthetases form mitochondrial aminoacyl-tRNA in *Trypanosoma brucei*. J Biol Chem 2004; 279:1161-6.
- Rinehart J, Krett B, Rubio MA, Alfonso JD, Söll D. *Saccharomyces cerevisiae* imports the cytosolic pathway for Gln-tRNA synthesis into the mitochondrion. Genes Dev 2005; 19:583-92.

15. Kim SI, Stange-Thomann N, Martins O, Hong KW, Söll D, Fox TD. A nuclear genetic lesion affecting *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial translation is complemented by a homologous *Bacillus* gene. *J Bacteriol* 1997; 179:5625-7.
16. Martin NC, Rabinowitz M. Glu-tRNA<sup>Gln</sup>: an intermediate in yeast mitochondrial protein synthesis. *Methods Enzymol* 1984; 106:152-7.
17. Yokoyama S and Nishimura S. Modified nucleosides and codon recognition. In *rRNA: Structure, biosynthesis and function* (eds. U. RajBhandary and D. Söll), pp. 207-233. American Society for Microbiology Press, Washington, DC 1995.
18. Rubio MA, Rinehart JJ, Krett B, Duvezin-Caubet S, Reichert AS, Söll D and Alfonzo JD. Mammalian mitochondria have the innate ability to import tRNAs by a mechanism distinct from protein import. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:9186-91.
19. Hughes TR, et al. Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell* 2000; 102:109-26.

## **B. Composants et mécanismes de contrôle de la voie de formation du glutaminyl-ARNt<sup>glutamine</sup> dans la mitochondrie de *Saccharomyces cerevisiae***

Notre revue se termine sur un constat, la glutaminyl-ARNt synthétase (QRS) du cytoplasme de levure est importée dans la mitochondrie, avec deux des trois types d'ARNt<sup>glutamine</sup> cytoplasmique différents par leur anticodon (ARNt<sup>Q1</sup> : UUG, ARNt<sup>Q3</sup> : CUG) (Rinehart et al., 2005).

Des indices semblent, cependant, indiquer que la levure pourrait utiliser une amidotransférase pour la synthèse du glutaminyl-ARNt<sup>glutamine</sup> (Q-ARNt<sup>Q</sup>) mitochondrial. En effet, elle possède un gène mitochondrial codant pour un ARNt<sup>Q</sup> ainsi que des gènes nucléaires codant des homologues des sous-unités GatB et GatA des amidotransférases ARNt-dépendantes (AdT) bactériennes, respectivement *PET112* (codant la protéine Pet112) et *YMR293C*. La délétion de *PET112* générant un phénotype "petite" qui est caractéristique d'un gène codant une protéine essentielle de la mitochondrie (Mulero et al., 1994), il était envisageable qu'une AdT mitochondriale existe dans la mitochondrie de levure. Cette hypothèse était d'autant plus réaliste que le phénotype petite induit par la délétion du gène *PET112* pouvait être complétée par l'expression d'une sous-unité GatB bactérienne fusionnée à une séquence N-terminale d'adressage mitochondrial (Kim et al., 1997).

Cependant, si la voie cytoplasmique de formation du Q-ARNt<sup>Q</sup> est effectivement importée dans la mitochondrie de levure, Pet112 n'a pas de raison de faire partie d'une AdT. L'alternative qu'il restait à vérifier était si l'évolution de la levure avait effectivement fait dévier la protéine Pet112 de son rôle de sous-unité d'une enzyme de la traduction, ce qui était un projet particulièrement intéressant.

J'ai donc débuté ce projet, que mon directeur de thèse m'a proposé, en 2006 en cherchant les interactants de la protéine Pet112 par purification d'affinité en tandem (TAP), à partir d'une souche de levure dans laquelle la séquence de l'étiquette TAP avait été introduite en 3' du gène *PET112*. Cette purification a permis d'isoler un complexe trimérique parfaitement semblable à une AdT puisqu'il est composé de Pet112 (orthologue de GatB), de l'amidase *YMR293C* (orthologue de GatA) et d'une troisième sous-unité dont la fonction était inconnue, *YGR102C* mais identifiée comme une chaperonne mitochondriale putative

(orthologue de GatC). Nous avons par la suite renommé cette dernière GatF en raison de l'absence d'homologie de séquence avec les sous-unités GatC bactériennes (F car les lettres A, B, C, D, et E avaient été utilisées successivement, mais également parce que F correspond à la première lettre de Fungi)

J'ai alors cloné les trois gènes de l'AdT GatFAB de levure sous forme d'opéron artificiel (avec une étiquette hexahistidine en C-terminal de la protéine GatB) dans un plasmide d'expression bactérien et cherché à obtenir un clone surexprimant l'AdT. Mais aucun des plasmides d'expression que j'ai créés ni aucune des techniques classiques d'expression utilisées n'ont permis d'obtenir l'AdT recombinante. Au bout d'un an et demi de tests d'expression et après avoir utilisé la plateforme de l'IGBMC et testé de nombreuses constructions (plasmides, promoteurs différents etc...) dans autant de systèmes d'expression (Gateway pour différentes souches d'*E.coli*, de Baculovirus, de Pichia) nous avons opté pour la fabrication d'un opéron synthétique composé des gènes *gatf*, *gata* et *gath* auprès d'une compagnie privée nommée GenScript. Leur stratégie est très intéressante : ils optimisent l'usage des codons en fonction de l'organisme (et même de la souche) utilisée pour l'expression hétérologue (en l'occurrence *E.coli* BL21) et surtout ils introduisent des mutations conservatives qui abolissent les structures secondaires que pourrait adopter le messager afin de faciliter le passage des ribosomes sur l'ARNm lors de la traduction.

Cela m'a permis, après transformation dans la souche BL21, d'obtenir une souche surexprimant une quantité suffisante de protéine pour commencer les tests fonctionnels. Les expériences que j'ai menées nous ont d'abord permis de prouver que les trois protéines s'assemblent bien en un trimère et que ce trimère GatFAB possède une activité AdT. Ces premiers tests ont été réalisés avec un aspartyl-ARNt<sup>asparagine</sup> (D-ARNt<sup>N</sup>) hétérologue bactérien, en partant du principe que l'AdT GatFAB comme toutes les AdT trimériques de type GatCAB est une E-D-AdT (Curnow et al., 1998). En parallèle, des tests de transamidation effectués grâce à des extraits protéiques mitochondriaux et de l'ARNt mitochondrial total, couplés à des expériences de localisation mitochondriale pour chacune des trois sous-unités fusionnées à la GFP, nous ont permis de montrer que tous les partenaires de la voie de transamidation (activité glutamyl-ARNt synthétase non discriminante ou ND-ERS ainsi que AdT) sont bien présents dans cet organite et sont bien responsables de la formation de Q-ARNt<sup>Q</sup> mitochondrial.

Afin de disposer de tous les outils nécessaires à la caractérisation *in vitro* des étapes de la voie mitochondriale de transamidation, j'ai tout d'abord dû purifier les ARNt<sup>E et Q</sup> mitochondriaux à partir d'ARNt mitochondrial non-fractionné. Une adaptation de la méthode de purification par oligonucléotides biotinylés décrite dans l'article de Rinehart et de ses collègues fut nécessaire, car les conditions qu'ils utilisaient ne m'ont pas permis de reproduire la purification de l'ARNt<sup>Q</sup> mitochondrial telle qu'ils la décrivaient. Cette technique se base sur la complémentarité de séquence entre un oligonucléotide biotinylé immobilisé sur une matrice de streptavidine-Sepharose et l'espèce d'ARNt que l'on veut purifier.

A ce stade de l'étude, nous avons caractérisé l'AdT mitochondriale, et prouvé qu'il existait bien une voie de transamidation mitochondriale responsable de la formation de Q-ARNt<sup>Q</sup>. Il nous restait encore à identifier la glutamyl-ARNt synthétase mitochondriale non discriminante (ND-ERS) responsable de la formation du E-ARNt<sup>Q</sup> substrat de l'AdT.

J'ai tout d'abord cloné, surexprimé et purifié l'ERS mitochondriale, mais les tests d'activité que j'ai effectué avec de l'ARNt<sup>Q</sup> mitochondrial pur de levure ont confirmé son caractère discriminant montré également par Rinehart et ses collègues quelques années auparavant (Rinehart et al., 2005). L'ERS mitochondriale est incapable de charger l'ARNt<sup>Q</sup> mitochondrial avec du E et donc n'est pas la ND-ERS mitochondriale que nous recherchions.

Comme le génome de la levure ne code que deux glutamyl-ARNt synthétases distinctes (ERS), celle que nous venions de tester (l'ERS mitochondriale) et la glutamyl-ARNt synthétase cytoplasmique, nous en avons en quelque sorte "mathématiquement" déduit que si l'ERS mitochondriale n'était pas la ND-ERS, alors l'ERS cytoplasmique devait l'être. Bien que mathématiquement inattaquable notre hypothèse se heurtait à deux obstacles majeurs : cette aaRS avait déjà fait l'objet d'études très approfondies qui ont indubitablement prouvées qu'elle est bien cytoplasmique et ne possède pas de séquence d'import mitochondrial à son extrémité N-terminale, et jamais il n'a été rapporté qu'elle pouvait charger un autre ARNt que l'ARNt<sup>E</sup> cytoplasmique. J'ai tout de même surproduit et purifié l'ERS cytoplasmique qui s'est avérée être non-discriminante dans une expérience d'aminocyclation *in vitro*, puisque capable de charger l'ARNt<sup>Q</sup> mitochondrial purifié avec du E. Nous nous sommes dès lors attelés à vérifier si cette ND-ERS pouvait être importée dans la mitochondrie.

Mélanie Brayé, notre technicienne, m'a aidé à mettre en évidence la localisation mitochondriale de l'ERS cytoplasmique par Western Blot. J'ai confirmé ces résultats avec l'aide de Bruno Senger grâce à des approches de génétique de levure qui nous ont permis de montrer que la séquence d'import mitochondriale de la ND-ERS cytoplasmique (ND-<sub>c</sub>ERS) est composée des résidus 191 à 199. En effet, la levure est encore capable de croître sur milieu respiratoire avec une ND-ERS progressivement raccourcie de N vers C, jusqu'à ce que le peptide 191-199 soit retiré. Ces expériences et les précieux conseils de Bruno m'ont également permis de m'initier à la puissance de ce type de techniques de croisement puis de chasse de plasmide permettant de remplacer très facilement un gène essentiel par une copie modifiée.

Cette expérience montrait indubitablement que l'ERS cytoplasmique était une enzyme essentielle à la mitochondrie. Comme son activité de formation du E-ARNt<sup>E</sup> cytoplasmique est également essentielle pour la synthèse protéique cytoplasmique, nous nous sommes demandés comment cette enzyme essentielle pour les deux compartiments pouvait être doublement localisée.

L'ERS cytoplasmique de levure et la méthionyl-ARNt synthétase se distinguent de toutes les autres aaRSs cytoplasmiques de cet organisme puisqu'elles forment un complexe avec une protéine appelée Arc1p. Cependant la raison pour laquelle ce complexe se forme est encore en grande partie méconnue.

Nos résultats suggèrent une explication plausible à ce phénomène : comme cette ERS peut charger l'ARNt<sup>Q</sup> dans la mitochondrie, la liaison à Arc1p restreint la spécificité de l'ERS au seul ARNt<sup>E</sup> lorsqu'elle est dans le cytoplasme. Nous avons alors émis l'hypothèse qu'en plus de restreindre sa spécificité pour l'ARNt, elle pourrait aussi, en se liant à l'ERS, restreindre ou réguler sa localisation subcellulaire.

Pour vérifier notre hypothèse nous avons comparé par Western Blot et microscopie confocale, la quantité d'ERS cytoplasmique importée dans les mitochondries de levure d'une souche sauvage et d'une souche privée d'Arc1p (le gène *ARCI* n'est pas essentiel). Ces expériences ont montré qu'il y a nettement plus de ND-ERS cytoplasmique dans la mitochondrie d'une souche qui n'exprime pas Arc1p. Ce partenaire cytoplasmique maintient donc la ND-ERS dans le cytoplasme en se fixant sur sa partie N-terminale et en masquant la séquence d'import

mitochondriale. Enfin, nous avons pu montrer, par Western Blot, qu'Arc1p est fortement sous exprimé lorsque la levure respire, et ceci de façon à libérer et permettre l'import d'une quantité plus importante de ND-ERS dans la mitochondrie qui devient essentielle pour la levure qui adopte ce métabolisme. C'est ce résultat qui a servit de point de départ pour la dernière étude que j'ai menée au cours de ma thèse et qui concerne la dynamique de régulation d'Arc1p au cours de l'adaptation à la respiration. Nous le verrons un peu plus loin, ce mécanisme est essentiel pour la mise en place du métabolisme respiratoire.

# Yeast mitochondrial Gln-tRNA<sup>Gln</sup> is generated by a GatFAB-mediated transamidation pathway involving Arc1p-controlled subcellular sorting of cytosolic GluRS

Mathieu Frechin,<sup>1</sup> Bruno Senger,<sup>1</sup> Mélanie Brayé,<sup>1</sup> Daniel Kern,<sup>1</sup> Robert Pierre Martin,<sup>2,4</sup> and Hubert Dominique Becker<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>UPR 9002, "Architecture et Réactivité de l'ARN," Université de Strasbourg, CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, F-67084 Strasbourg Cédex, France; <sup>2</sup>UMR 7156, "Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie," Department of Molecular and Cellular Genetics, CNRS, Université de Strasbourg, 67084 Strasbourg, France

It is impossible to predict which pathway, direct glutamylation of tRNA<sup>Gln</sup> or tRNA-dependent transamidation of glutamyl-tRNA<sup>Gln</sup>, generates mitochondrial glutamyl-tRNA<sup>Gln</sup> for protein synthesis in a given species. The report that yeast mitochondria import both cytosolic glutamyl-tRNA synthetase and tRNA<sup>Gln</sup> has challenged the widespread use of the transamidation pathway in organelles. Here we demonstrate that yeast mitochondrial glutamyl-tRNA<sup>Gln</sup> is in fact generated by a transamidation pathway involving a novel type of trimeric tRNA-dependent amidotransferase (AdT). More surprising is the fact that cytosolic glutamyl-tRNA synthetase (cERS) is imported into mitochondria, where it constitutes the mitochondrial nondiscriminating ERS that generates the mitochondrial mischarged glutamyl-tRNA<sup>Gln</sup> substrate for the AdT. We show that dual localization of cERS is controlled by binding to Arc1p, a tRNA nuclear export cofactor that behaves as a cytosolic anchoring platform for cERS. Expression of Arc1p is down-regulated when yeast cells are switched from fermentation to respiratory metabolism, thus allowing increased import of cERS to satisfy a higher demand of mitochondrial glutamyl-tRNA<sup>Gln</sup> for mitochondrial protein synthesis. This novel strategy that enables a single protein to be localized in both the cytosol and mitochondria provides a new paradigm for regulation of the dynamic subcellular distribution of proteins between membrane-separated compartments.

[*Keywords:* Dual localization; tRNA-dependent amidotransferase; tRNA<sup>Gln</sup>; mitochondria; metabolism; *Saccharomyces cerevisiae*]

Supplemental material is available at <http://www.genesdev.org>.

Received December 12, 2008; revised version accepted March 13, 2009.

In all living organisms, ribosome-mediated protein synthesis requires the supply of a set of at least 20 perfectly paired aminoacyl-transfer RNA (aa-tRNA) species, one for each of the canonical amino acids found in proteins. Although most of the aa-tRNA is made by aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS), a family of 20 enzymes that catalyze direct acylation of each tRNA species with its cognate amino acid [Ibba and Söll 2000], it is now clear that the process of aa-tRNA synthesis is far from universally conserved. In different organisms, up to four aa-tRNA species are, or can be, generated by two-step

indirect pathways invariably involving tRNA-dependent conversion of a precursor mischarged aa-tRNA [Sheppard et al. 2008]. These pathways, which usually compensate for the absence of a given aaRS, are not oddities of the translation machinery, since they sometimes constitute the sole route for synthesis of a given aa-tRNA. Among all aa-tRNA species used for mRNA translation, one, glutamyl-tRNA<sup>Gln</sup> (Q-tRNA<sup>Q</sup>), is of particular interest, not only because it displays the unique feature of being generated by kingdom-specific pathways or enzymes [Tumbula et al. 2000], but also because its synthesis is still a matter of debate and remains to be elucidated for the majority of eukaryotic organelles. To date, all eukaryotes studied so far use glutamyl-tRNA synthetase (QRS) for the formation of cytosolic glutamyl-tRNA<sup>Gln</sup> (Q-c-tRNA<sup>Q</sup>) [Ibba et al. 2000], whereas the vast majority

Corresponding authors.

<sup>3</sup>E-MAIL [h.becker@ibmc.u-strasbg.fr](mailto:h.becker@ibmc.u-strasbg.fr); FAX 33-3-88-60-22-18.

<sup>4</sup>E-MAIL [r.martin@ibmc.u-strasbg.fr](mailto:r.martin@ibmc.u-strasbg.fr); FAX 33-3-88-41-70-70.

Article is online at <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.518109>.

of prokaryotes use the two-step transamidation pathway in which two enzymes are working in tandem. First, a nondiscriminating glutamyl-tRNA synthetase (ND-ERS) generates a mischarged Glu-tRNA<sup>Gln</sup> (E-tRNA<sup>Q</sup>) (Lapointe et al. 1986), then, the glutamate-charged tRNA<sup>Q</sup> is transamidated into glutamine by a tRNA-dependent amidotransferase (AdT). The AdT enzymes catalyzing this process differ between bacteria and archaea. Bacteria solely use a heterotrimeric enzyme called the GatCAB AdT (Curnow et al. 1997; Becker and Kern 1998), while archaea utilize an archaeal-specific heterodimeric GatDE AdT (Tumbula et al. 2000).

The way Q-tRNA<sup>Q</sup> is generated in organelles is far from uniform among eukaryotes and is unknown for many organisms. The first report on organellar Q-tRNA<sup>Q</sup> synthesis came from experiments with barley chloroplast extracts, which unambiguously showed that Q-tRNA<sup>Q</sup> synthesis proceeds by transamidation of a mischarged glutamyl-tRNA<sup>Gln</sup> (E-tRNA<sup>Q</sup>) (Schön et al. 1988). In addition, this work suggested that plant and mouse mitochondria use the same transamidation pathway to form mitochondrial glutaminyl-tRNA<sup>Gln</sup> (Q-mtRNA<sup>Q</sup>), based on the result that QRS activity could not be detected in any of the mitochondrial extracts that were assayed. The general idea that organellar and especially mitochondrial Q-tRNA<sup>Q</sup> synthesis uniformly proceeds via the transamidation pathway was later reinforced by accumulating sequence data coming from whole-genome sequencing projects. All eukaryotic genomes sequenced so far are deprived of the gene encoding a mitochondrial QRS (mQRS). With the exception of a few protozoans, they concomitantly all display a gene for a GatB ortholog, named *PET112*, which is always predicted to encode a mitochondrial protein. Since the presence of a *gatB* gene in a given prokaryotic genome invariably signifies the presence of an AdT in the corresponding organism, the presence of mitochondrial GatB homologs (Pet112p) in eukaryotes should predict the existence of a mitochondrial AdT. Recent studies with *Arabidopsis thaliana* validated this assumption by showing that mitochondrial and chloroplastic Q-tRNA<sup>Q</sup> are actually made by a unique dual-targeted GatCAB AdT (Pujol et al. 2008) that transamidates both mitochondrial and chloroplastic E-tRNA<sup>Q</sup> formed by a unique mischarging ERS also addressed to both cellular compartments. This paradigm is, however, contradicted by two studies reporting the existence of a mQRS in trypanosomatidae (Nabholz et al. 1997; Rinehart et al. 2004). Likewise, a recent study reported that in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the cQRS and two nuclear-encoded tRNAs<sup>Q</sup> are imported in the mitochondria and used to generate Q-tRNA<sup>Q</sup> that participates to mitochondrial protein synthesis (Rinehart et al. 2005). This result is somewhat surprising since it contradicts several earlier studies suggesting that yeast mitochondrial Q-tRNA<sup>Q</sup> was not generated by direct charging of mitochondrial tRNA<sup>Q</sup> by a mQRS, but rather by a mitochondrial transamidation pathway. For example, it had been shown that the yeast *gatB* ortholog, *PET112* (Mulero et al. 1994), is essential for respiratory metabolism and that the respiratory deficiency induced by its alteration

can be rescued by expression of a mitochondrially targeted version of the *Bacillus subtilis* GatB subunit (Kim et al. 1997). This suggests that a mitochondrial AdT could well exist and be responsible for Q-tRNA<sup>Q</sup> formation in yeast mitochondria. However, Rinehart et al. (2005) demonstrated that the yeast mitochondrial glutamyl-tRNA synthetase (mERS) is incapable of charging with glutamate any of the tRNA<sup>Q</sup> species present in yeast mitochondria. This constitutes a strong argument against the existence of a mitochondrial transamidation pathway in yeast. Indeed, if there is no ND-ERS in mitochondria, then the mischarged E-tRNA<sup>Q</sup>, which is the obligatory substrate intermediate for the AdT, cannot be generated. Consequently, with no means of supplying the AdT with its substrate, the existence of a mitochondrial tRNA-dependent transamidation pathway makes no sense. Yet, the *S. cerevisiae* genome encodes a mitochondrial GatB ortholog. The logical deduction one would make is that the yeast mitochondrial GatB protein, Pet112p, has deviated from its canonical function in tRNA-dependent transamidation and exhibits an essential alternative mitochondrial function. We therefore designed a series of experiments to identify the functional role of this protein.

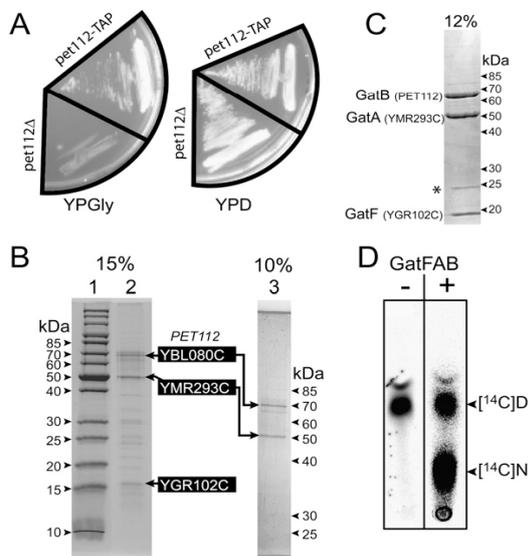
Using a systems-based approach and despite expectations to the contrary, we characterized a novel type of trimeric AdT in yeast mitochondria. Biochemical, genetic, and subcellular localization experiments unambiguously prove that this AdT is mitochondrial and is responsible for Q-mtRNA<sup>Q</sup> formation. We confirm that yeast mERS is indeed a discriminating ERS and cannot produce E-mtRNA<sup>Q</sup>. However, to our surprise, we found that the cytosolic ERS (cERS) can synthesize the mischarged E-tRNA<sup>Q</sup> substrate for the AdT. In agreement with this result, we found that a fraction of cERS localizes to mitochondria and is in fact the missing nondiscriminating ERS. By trying to understand how the cERS can be dual localized, we found that the major portion of cERS is sequestered in the cytoplasm by binding to Arc1p, a protein that serves as a cytoplasmic anchoring platform for cERS but also for cytosolic methionyl-tRNA synthetase (cMRS). Finally, we also found that the level of Arc1p expression is decreased when the cells are switched from fermentation to respiratory metabolism, which results in increased cERS import to allow higher levels of Q-mtRNA<sup>Q</sup> formation for elevated mitochondrial protein synthesis. We propose that Arc1p constitutes a relay in the molecular pathway that allows yeast cells to switch from fermentation to respiration. This constitutes a novel mechanism of regulation of dual localization of a protein that is used and essential in both the cytoplasm and mitochondria.

## Results

### *The yeast mitochondrial GatB protein (Pet112p) participates in the assembly of an AdT-like trimeric particle*

To identify Pet112p interactants, we engineered a yeast strain in which a tandem affinity purification (TAP) tag coding sequence was chromosomally fused, in-frame, to

the 3'-end of *PET112* [Puig et al. 2001]. Figure 1A shows that fusion of this tag does not interfere with the mitochondrial function of the recombinant protein, since unlike the *pet112* deletion strain (*pet112Δ*) [Supplemental Table 1], the *PET112*-TAP cells still grow on a respiratory medium. The *Pet112*-TAP fusion protein and associated components were recovered from cell extracts by TAP. Analysis of the final pull-down fraction by SDS-PAGE showed several proteins associated with the *Pet112* bait (Fig. 1B). Mass spectrometry analysis of the band recovered from the gel identified seven *Pet112*-interacting proteins, among which two were annotated as mitochondrial and were present in stoichiometric amounts when compared with the *Pet112*-TAP fusion protein. These two interactants are *Ymr293c* and *Ygr102c*. *Ymr293c* is annotated as being an amidase that displays an amidohydrolase signature motif and is homologous to bacterial *GatA* proteins [*Saccharomyces*



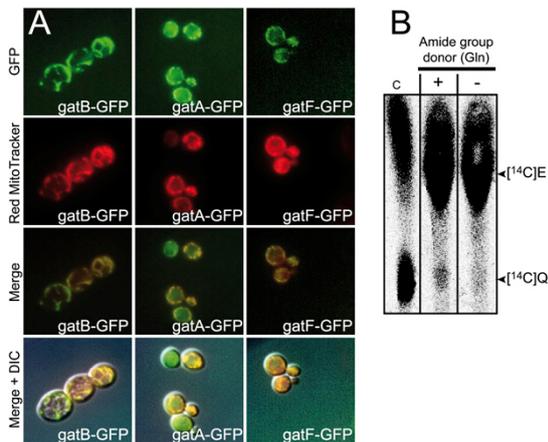
**Figure 1.** Identification of a GatCAB-like AdT in yeast. (A) Growth phenotypes of the *pet112Δ* and *pet112*-TAP strains obtained in fermentation (YPD) and respiratory (YPGly) conditions after 48 h of incubation at 30°C. Origin and engineering of the strains are described in the Materials and Methods and Supplemental Table 1. (B, lanes 2,3) G250 Colloidal Blue-stained SDS-PAGE separation of the *Pet112*-TAP interactants purified by TAP. (Lane 1) Molecular weight standards. The three putative mitochondrial proteins, identified by mass spectrometry, are highlighted. (C) Coomassie Blue-stained SDS-PAGE of the overexpressed *S. cerevisiae* GatFAB AdT purified on an immobilized Co<sup>2+</sup> column. The band labeled with an asterisk (\*) corresponds to contaminating *E. coli* prolyl-isomerase (25 kDa; Mukherjee et al. 2003). (D) Autoradiogram of the TLC plate analyzing the conversion of 10 μM tRNA<sup>Asn</sup>-bound [<sup>14</sup>C]aspartate ([<sup>14</sup>C]D) into [<sup>14</sup>C]asparagine ([<sup>14</sup>C]N) catalyzed by 0.1 μM pure *S. cerevisiae* GatFAB AdT in the presence (+) or absence (-) of glutamine as an amide group donor. Aspartylation and transamidation reactions of the *Thermus thermophilus* tRNA<sup>Asn</sup> were performed as described previously [Bailey et al. 2007].

Genome Database]. In addition, *YMR293C* has recently been renamed *HER2* (Hmg2p ER remodeling) because it has been reported to be involved in proliferation or remodeling of the endoplasmic reticulum that is caused by overexpression of Hmg2p [Federovitch et al. 2008]. *Ygr102c* is a small protein of unknown function that has been detected in highly purified mitochondria in high-throughput studies [Reinders et al. 2006]. When we crossed the available functional and structural data, we realized that we purified a mitochondrial heterotrimer composed of a *GatB* ortholog (*Pet112*), a *GatA* homolog (*Ymr293c*), and a small protein like *GatC* (*Ygr102c*), matching almost perfectly with the bacterial *GatCAB* AdT. To confirm the existence of this trimeric particle, we performed TAP on extracts of a strain expressing C-terminally TAP-tagged *Ymr293c*. Analysis of the purified fraction shows that *Pet112p* and *Ygr102c* coelute with the *Ymr293c* fusion protein (Supplemental Fig. 1). The three genes encoding *Pet112p*, *Ymr293c*, and *Ygr102c* were then synthetically reconstructed with codon optimization to allow efficient expression in *Escherichia coli*. For coexpression purposes, the three genes were subcloned into pET-20b in an operonal arrangement, and to facilitate identification and purification of the putative AdT, sequences encoding the V5 viral epitope and a 6xHis tag were fused to the 3'-end of *PET112*. *E. coli* strain BL21 was transformed with the overexpressing plasmid, and operon expression was induced. Figure 1C shows that *Ymr293c* and *Ygr102c* coelute with *Pet112p* from an immobilized Co<sup>2+</sup> resin, showing that the three proteins can assemble into a trimer in the heterologous *E. coli* expression system. Having purified a particle that structurally resembles an AdT, we wanted to check whether this putative AdT can indeed catalyze tRNA-dependent transamidation. Since no mischarging ERS could be identified in yeast, and having shown that the plant mitochondrial *GatCAB* AdT [Pujol et al. 2008], like all *GatCAB* AdTs studied so far, can transamidate both E-tRNA<sup>Q</sup> and aspartyl-tRNA<sup>Asn</sup> (D-tRNA<sup>N</sup>), we attempted transamidation of a heterologous bacterial D-tRNA<sup>N</sup> with the purified putative yeast AdT. Figure 1D shows that the yeast *GatCAB*-like AdT very efficiently transamidates *Thermus thermophilus* D-tRNA<sup>N</sup>. This amidation is strictly tRNA-dependent since pure yeast AdT does not convert free [<sup>14</sup>C]Asp into [<sup>14</sup>C]Asn (data not shown). While *Pet112p* and *Ymr293c* are highly similar to the bacterial *GatB* and *GatA* subunits, respectively, and can therefore be considered as real orthologs of *GatB* and *GatA*, *Ygr102c* has no similarity to any bacterial *GatC* subunit; we therefore named this subunit *GatF*. These lines of experiments show that using a systems-based approach we isolated a *GatFAB* trimeric AdT able to catalyze tRNA-dependent amidation of a mischarged D-tRNA<sup>N</sup>.

*Existence of a yeast mitochondrial tRNA-dependent transamidation pathway that generates glutamyl-tRNA<sup>Gln</sup>*

Although genetic experiments showed that *Pet112p* is a mitochondrial protein, evidence for a mitochondrial

localization of Ymr293c and Ygr102c comes from whole high-throughput localization studies (<http://www.yeastgenome.org>; Huh et al. 2003). Moreover, no mitochondrial targeting sequence can be detected in Ymr293c using standard bioinformatics tools (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html>). We therefore examined the intracellular localization of the three subunits of our putative trimeric AdT by expressing in yeast versions of Pet112p, Ymr293c, and Ygr102c fused to GFP at their C termini. Adding the GFP tag does not interfere with the mitochondrial function of the recombinant proteins, since the yeast strains expressing the Gat-GFP fusion proteins instead of the normal Gat subunits do not display any growth defect when plated on respiratory medium (Supplemental Fig. 2). Figure 2A shows that all three proteins are localized within the mitochondria as demonstrated by the colocalization (merge) of GFP fluorescence with that of the red-MitoTracker. The observed mitochondrial GFP fluorescence is solely due to the fact that GFP is fused to mitochondrial-targeted proteins, since GFP alone has been reported to be exclusively

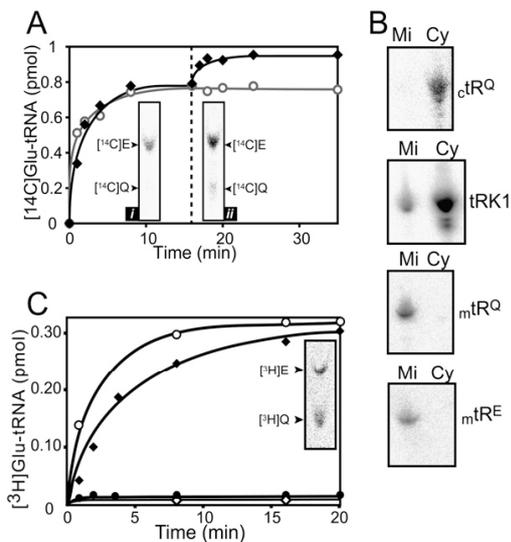


**Figure 2.** Mitochondrial localization and activity of the *S. cerevisiae* GatFAB AdT. (A) Visualization of the mitochondrial localization of the C-terminally GFP-tagged GatA, GatB, and GatF subunits by fluorescence microscopy. Yeast *gatA-GFP*, *gatB-GFP*, and *gatF-GFP* strains were logarithmically grown on synthetic medium as described in the Materials and Methods. Living cells were stained with Red MitoTracker and examined with a phase interference microscope as described in the Materials and Methods. GFP fluorescence can be overlapped with the Red MitoTracker staining of mitochondria. Note that a fraction of Ymr293c localizes also in the cytosol in agreement with a recent report on a possible additional function of this protein in this compartment (Federovitch et al. 2008). (B) Autoradiogram of the TLC plate showing the conversion of yeast mitochondrial tRNA-bound  $^{14}\text{C}[\text{E}]$  into  $^{14}\text{C}[\text{Q}]$  catalyzed by a yeast mitochondrial extract. Coupled aminoacylation and transamidation of 16  $\mu\text{g}$  of unfractionated mitochondrial tRNA, using 10  $\mu\text{g}$  of a tRNA-free mitochondrial protein extract, was performed in 50  $\mu\text{L}$  of transamidation buffer supplemented with 20  $\mu\text{M}$  of  $^{14}\text{C}[\text{E}]$  and with (+) or without (-) 1 mM of glutamine (amide group donor). After 40 min of incubation, samples were treated as described in the Materials and Methods.

cytosolic (Bordonné 2000; Navarro et al. 2004). Having confirmed by direct visualization that the three subunits localize to mitochondria, we checked whether mitochondrial extracts can catalyze transamidation of mitochondrial E-tRNA<sup>Q</sup> into Q-tRNA<sup>Q</sup>. Total mitochondrial tRNA and total mitochondrial protein extract were assayed for the capacity of the protein extract to catalyze mischarging of m-tRNA<sup>Q</sup> with  $^{14}\text{C}$ glutamate ( $^{14}\text{C}[\text{E}]$ ) and subsequent amidation of the  $^{14}\text{C}[\text{E}]$  into  $^{14}\text{C}$ glutamine ( $^{14}\text{C}[\text{Q}]$ ). Figure 2B shows that the mitochondrial extract is able to generate a mischarged mitochondrial  $^{14}\text{C}[\text{E}]$ -tRNA<sup>Q</sup> species and to convert the  $^{14}\text{C}[\text{E}]$  into  $^{14}\text{C}[\text{Q}]$  only in the presence of an amide group donor. The above results demonstrate that there exists a yeast mitochondrial tRNA-dependent transamidation pathway responsible for the formation of Q-m-tRNA<sup>Q</sup>. This suggests that the mitochondrial GatFAB AdT we identified may well catalyze transamidation of E-tRNA<sup>Q</sup>. However, while the transamidation that we observed using mitochondrial extracts undoubtedly shows that E-tRNA<sup>Q</sup> can be formed in yeast mitochondria, the nondiscriminating glutamyl-tRNA synthetase (ND-ERS) that generates this intermediate inside mitochondria remained to be identified.

*The cytosolic glutamyl-tRNA synthetase is nondiscriminating and charges the mitochondria-encoded tRNA<sup>Gln</sup> with glutamate*

It has been established that the *S. cerevisiae* genome encodes only two distinct ERSs, one being mitochondrial and the other cytosolic (Tzagoloff and Shtanko 1995; Gagnon et al. 1996). Furthermore, it has been shown that the m-ERS is of a discriminating nature and cannot generate the E-m-tRNA<sup>Q</sup> obligatory substrate of the AdT (Rinehart et al. 2005). Our data fully support this result since the  $^{14}\text{C}[\text{E}]$ -tRNA formed by charging of total mitochondrial tRNA with purified yeast m-ERS and  $^{14}\text{C}[\text{E}]$  does not yield any tRNA-dependent synthesis of  $^{14}\text{C}[\text{Q}]$  when incubated with pure yeast GatFAB AdT (Fig. 3A, inset i). Moreover, m-tRNA<sup>E</sup> is perfectly charged by m-ERS, while m-tRNA<sup>Q</sup> is not (Fig. 3C). We then examined the possibility that the cytosolic glutamyl-tRNA synthetase (c-ERS) can carry out mischarging of m-tRNA<sup>Q</sup>, despite the fact that this ERS has so far never been reported to be localized in mitochondria and does not display any identifiable mitochondrial targeting sequence (MTS). If c-ERS is capable of mischarging m-tRNA<sup>Q</sup>, then when the aminoacylation plateau of total mitochondrial tRNA with m-ERS is reached, addition of c-ERS should promote an increase in the aminoacylation plateau level because a m-tRNA species different from m-tRNA<sup>E</sup> would additionally be aminoacylated. Figure 3A shows that upon addition of c-ERS there is an increase in the amount of m-tRNA that can be glutamylated. This increase is c-ERS-dependent since addition of the same amount of m-ERS resulted in an unchanged plateau level. The fact that the additional glutamylated m-tRNA formed by c-ERS can be transamidated by purified yeast GatFAB AdT confirms that c-ERS mischarges m-tRNA<sup>Q</sup> (Fig. 3A, inset ii). However, it has been reported that three tRNA<sup>Q</sup> species can be



**Figure 3.** Identification of the missing nondiscriminating ERS and of the AdT tRNA<sup>Gln</sup> substrate. *[A]* Aminoacylation curves of unfractionated m<sup>3</sup>tRNA with m<sup>3</sup>ERS and subsequent addition of c<sup>3</sup>ERS (—○—) or c<sup>3</sup>ERS (—◆—) when the aminoacylation plateau with m<sup>3</sup>ERS was reached (16 min, dashed line). Autoradiogram of the TLC plate analyzing transamidation by purified yeast GatFAB AdT of [<sup>14</sup>C]E-m<sup>3</sup>tRNA (40 μL) generated at plateau level by m<sup>3</sup>ERS (*inset i*) or generated at plateau level by combined charging with m<sup>3</sup>ERS and c<sup>3</sup>ERS (*inset ii*). *[B]* Identification by Northern blotting of the tRNA<sup>Gln</sup> and tRNA<sup>E</sup> species present in our unfractionated m<sup>3</sup>tRNA preparations. 15 μg of unfractionated m<sup>3</sup>tRNA (mi) was hybridized with probes specific for mitochondrial-encoded tRNA<sup>Gln</sup> (m<sup>3</sup>tRNA<sup>Gln</sup>), tRNA<sup>E</sup> (m<sup>3</sup>tRNA<sup>E</sup>), and nuclear-encoded tRNA<sup>Gln</sup> (c<sup>3</sup>tRNA<sup>Gln</sup>) and tRNA<sup>K</sup> (tRK1) shown previously to be imported into mitochondria. As a control, 15 μg of unfractionated c<sup>3</sup>tRNA (cy) was probed with the same probes. *[C]* Charging curves of purified m<sup>3</sup>tRNA<sup>Gln</sup> and m<sup>3</sup>tRNA<sup>E</sup> by c<sup>3</sup>ERS (respectively, —◆— and —●—) and m<sup>3</sup>ERS (respectively, —◇— and —○—). (*Inset*) Transamidation of the pure mischarged [<sup>14</sup>C]E-m<sup>3</sup>tRNA<sup>Gln</sup> by pure yeast GatFAB AdT.

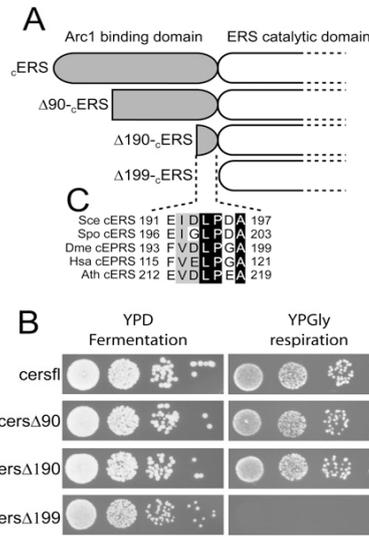
found in yeast mitochondria: one mitochondrial-encoded species and two nuclear-encoded species (c<sup>3</sup>tRNAs<sup>Gln</sup>) that are mainly cytosolic but that are also imported to some extent into these organelles (Rinehart et al. 2005). To identify the tRNA<sup>Gln</sup> species charged by c<sup>3</sup>ERS and subsequently transamidated by the AdT, we probed, by Northern-blotting, our total mitochondrial tRNA preparation for the presence of the three tRNA<sup>Gln</sup> species using a probe specific for m<sup>3</sup>tRNA<sup>Gln</sup> and one that hybridizes to both c<sup>3</sup>tRNAs<sup>Gln</sup> that are believed to be imported from the cytoplasm. Figure 3B shows that the total mitochondrial tRNA contains both m<sup>3</sup>tRNA<sup>Gln</sup> and m<sup>3</sup>tRNA<sup>E</sup> and that our probes are highly specific since they do not cross-hybridize to any cytosolic tRNA species. While we could, as expected, detect the presence of both c<sup>3</sup>tRNAs<sup>Gln</sup> species in the total cytosolic tRNA sample, we could not detect any trace of these two tRNAs in our mitochondrial tRNA sample (Fig. 3B). We confirmed that absence of c<sup>3</sup>tRNAs<sup>Gln</sup> in our mitochondrial tRNA sample was not biased by the extraction procedure, since it contained tRK1 (Fig. 3B),

a yeast cytosolic tRNA<sup>Lys</sup> that has been shown to be imported at a level of 5% in yeast mitochondria (Martin et al. 1979; Entelis et al. 1998). Figure 3B shows that the amount of tRK1 present in our mitochondrial tRNA corresponds to the expected quantity.

These data show that c<sup>3</sup>ERS has the potential to be the missing nondiscriminating ERS used for the mitochondrial transamidation pathway, since it is capable of charging the m<sup>3</sup>tRNA<sup>Gln</sup> (Fig. 3C). In addition, the inset in Figure 3C shows that the E-m<sup>3</sup>tRNA<sup>Gln</sup> generated by c<sup>3</sup>ERS can subsequently be transamidated by the recombinant yeast GatFAB. Notably, while c<sup>3</sup>ERS is able to charge c<sup>3</sup>tRNA<sup>E</sup>, it is unable to charge the m<sup>3</sup>tRNA<sup>E</sup> (Fig. 3C).

#### *A fraction of the cytoplasmic glutamyl-tRNA synthetase is imported into mitochondria*

While the yeast c<sup>3</sup>ERS possesses all the biochemical features of the missing ND-m<sup>3</sup>ERS that catalyzes the first step of the transamidation pathway, it was not known whether this enzyme can be imported into mitochondria. When compared with prokaryotic ERSs, the yeast c<sup>3</sup>ERS possesses 200 additional residues appended to the N terminus. While this additional domain does not display any recognizable MTS, we hypothesized that a nonconventional signaling sequence might be embedded in this part of the protein. We therefore constructed a series of c<sup>3</sup>ERS N-terminal deletion mutants with the expectation of cleaving off the signaling sequence without impairing the cytoplasmic catalytic activity of this enzyme (Fig. 4A). Such mutant c<sup>3</sup>ERSs should still be able to promote growth on fermentable medium (glucose) but not on respiratory medium (glycerol). We used a yeast shuffling strain in which a plasmid-borne wild-type c<sup>3</sup>ERS gene complements the chromosomal deletion of this gene. This strain was transformed with the recombinant plasmids expressing our three deletion mutants and subsequently plated on 5-FOA to select for loss of the plasmid encoding wild-type c<sup>3</sup>ERS. Figure 4B shows that growth on glucose and glycerol media of the strains expressing either ΔN90-c<sup>3</sup>ERS (cersΔ90) or ΔN190-c<sup>3</sup>ERS (cersΔ190) is comparable with that of the wild-type strain (cersfl). However, growth of the cersΔ199 strain that expresses the ΔN199-c<sup>3</sup>ERS mutant is severely impaired in respiratory conditions but is almost unchanged on fermentable medium when compared with the wild-type strain (Fig. 4B). The *petite* phenotype observed for the cersΔ199 mutant strain demonstrates that c<sup>3</sup>ERS has an essential mitochondrial function that is lost upon removal of its N-terminal extension. Since the catalytic activity of the mutant ΔN199-c<sup>3</sup>ERS seems unaltered in the cytoplasm, the deletion very likely hindered the import of the mutant c<sup>3</sup>ERS into mitochondria. To confirm that the c<sup>3</sup>ERS is imported into mitochondria, we probed protein extracts from purified mitochondria for the presence of c<sup>3</sup>ERS using antibodies directed against yeast c<sup>3</sup>ERS. Figure 5A shows that c<sup>3</sup>ERS is present in mitochondria of a wild-type yeast strain. When compared with the amount found in a cytosolic fraction from the same strain, it appears that a significant amount of c<sup>3</sup>ERS is

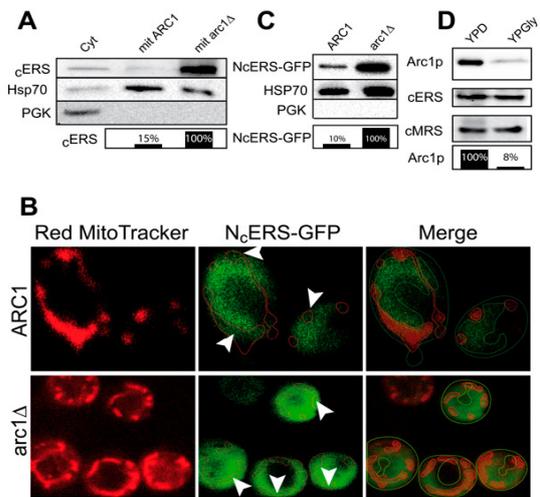


**Figure 4.** A noncanonical MTS located after the first 190 residues of  $c_{\text{ERS}}$  is responsible for its mitochondrial import. (A) Schematic representation of the different  $c_{\text{ERS}}$  variants. (B) Growth phenotypes on fermentative (YPD) or respiratory (YPGly) media of haploid *S. cerevisiae* *cersfl*, *cersΔ90*, *cersΔ190*, and *cersΔ199* strains (see Supplemental Table 1). (C) Multiple alignment of *S. cerevisiae*  $c_{\text{ERS}}$  with other eukaryotic  $c_{\text{ERS}}$ s and glutamyl-prolyl-tRNA synthetases (EPRS). [Sce] *S. cerevisiae*, [Spo] *Schizosaccharomyces pombe*, [Dme] *Drosophila melanogaster*, [Ath] *A. thaliana*, [Hsa] *Homo sapiens*. The region analyzed corresponds to the residues 190–199 of the *S. cerevisiae*  $c_{\text{ERS}}$ . Black shading denotes 100% amino acid identity, while gray signifies at least 80% homology (amino acid conservation in at least four out of the five proteins).

imported into the mitochondria. Our mitochondrial extracts were free of any cytosolic contaminants as shown by the absence of a cytosolic marker (PGK) in the mitochondrial proteins. To further confirm that the MTS of  $c_{\text{ERS}}$  is embedded within its first 199 residues, we subcloned into pRS315 the part of the  $c_{\text{ERS}}$  gene encoding the first 199 amino acids in-frame and upstream of the gene encoding GFP ( $N_{c_{\text{ERS}}}$ -GFP). The chimeric gene was cloned under the control of its own promoter in order to not bias the amount of  $N_{c_{\text{ERS}}}$ -GFP that would be targeted to the mitochondria by overexpression of the fusion protein. The transformed yeast cells were grown in respiratory conditions, and the subcellular localization of the  $N_{c_{\text{ERS}}}$ -GFP was analyzed by confocal laser scanning microscopy. Figure 5B (top panels) shows that  $N_{c_{\text{ERS}}}$ -GFP, as expected, is abundantly localized in the cytoplasm. However, a visible amount of  $N_{c_{\text{ERS}}}$ -GFP is undoubtedly localized in mitochondria, as shown by overlapping GFP and red MitoTracker signals (Fig. 5B, white arrows). Since we used a focal plane as thin as 900 nm, the portion of the GFP fluorescence that colocalizes with the red MitoTracker emission cannot be due to interfering cytosolic GFP fluorescence that would overlap mitochondria. This demonstrates that the MTS of  $c_{\text{ERS}}$  is

indeed localized within the 199 N-terminal residues. Taking into account that the  $\Delta N190$ - $c_{\text{ERS}}$  variant did not induce respiratory deficiency whereas the  $\Delta N199$ - $c_{\text{ERS}}$  variant did, the MTS is very likely localized between residues 191 and 199.

These lines of experimental evidence demonstrate that  $c_{\text{ERS}}$ , in addition to being nondiscriminating, is also mitochondrial. Therefore, upon import into the organelle,  $c_{\text{ERS}}$  is able to synthesize the mischarged E- $m\text{tRNA}^{\text{Q}}$  that will subsequently be transamidated by the mitochondrial GatFAB AdT, generating the Q- $m\text{tRNA}^{\text{Q}}$  necessary for mitochondrial protein synthesis.



**Figure 5.**  $c_{\text{ERS}}$  is maintained in the cytosol by binding to Arc1p, a cytosolic retention platform, whose expression is down-regulated in response to a switch from fermentation to respiration. (A) Immunodetection, by Western blot, of  $c_{\text{ERS}}$  in purified cytosolic (cyt) and mitochondrial (mit) protein extracts of ARC1 (wild type, RS354) or *arc1Δ* strains. Amounts of total protein and cross-contamination of each mitochondrial extract were controlled using antibodies against Hsp70 (Hsp70) as a mitochondrial marker and against phosphoglycerokinase (PGK) as a cytosolic marker. (B) Analysis of the subcellular localization of  $N_{c_{\text{ERS}}}$ -GFP in ARC1 (wild type, RS354) or *arc1Δ* yeast strains transformed with pRS315/*Nter* $c_{\text{ERS}}$ -GFP. Living cells were stained with Red MitoTracker and examined with a confocal microscope as described in the Materials and Methods. Cellular areas where fluorescence of  $N_{c_{\text{ERS}}}$ -GFP overlaps with the Red MitoTracker staining of mitochondria are indicated by white arrowheads. (C) Western blot quantification of import of  $N_{c_{\text{ERS}}}$ -GFP in mitochondria of ARC1 (wild type, RS354) or *arc1Δ* strains. Amounts of total protein and level of cytosolic contamination of each mitochondrial extract were controlled using anti-Hsp70 (Hsp70) and anti-PGK (PGK) antibodies, respectively. (D) Western blot quantification of the variation in expression, by wild-type yeast strain (ARC1), of Arc1p,  $c_{\text{ERS}}$ , and  $c_{\text{MRS}}$  during fermentation (YPD) or respiration (YPGly). Histograms representing quantifications of the relative amounts of  $c_{\text{ERS}}$  (A),  $N_{c_{\text{ERS}}}$ -GFP (C), and Arc1p (D) present in extracts were performed with ImageJ software.

*Arc1p acts as a cytosolic anchoring platform for regulated retention of cERS in the cytoplasm*

An important issue raised by our findings is the understanding of the mechanism that regulates the dual localization of cERS, since its activity is essential for both cytosolic and mitochondrial protein synthesis. It is already known from previous studies that both yeast cERS and cytosolic methionyl-tRNA synthetase (cMRS) are associated with Arc1p, a cofactor of nuclear export (Simos et al. 1996). Interaction of cMRS and cERS with Arc1p, mediated by their N termini (Deinert et al. 2001), increases their tRNA aminoacylation efficiencies and prevents nuclear translocation of the two aaRS (Galani et al. 2001). While nuclear localization of cMRS has been confidently shown, the nuclear localization of yeast cERS is somewhat less clear (Golinelli-Cohen and Mirande 2007). Since Arc1p entraps yeast cERS in the cytosol, we surmised that this aaRS is preferentially a mitochondrial protein, and that Arc1p captures and holds in the cytoplasm the portion of cERS required for cytosolic translation. To verify this hypothesis, we checked by Western blotting whether removal of Arc1p directly impacts the fraction of cERS addressed to the mitochondrion. Figure 5A shows that, indeed, in an Arc1p deletion strain (*arc1Δ*), the pool of cERS imported into mitochondria is drastically increased when compared with the amount found in mitochondria purified from the wild-type strain [ARC1]. The absence of PGK and presence of HspP70 in comparable amounts in both the *arc1Δ* and wild-type [ARC1] mitochondrial extracts shows that there is no contamination by a cytosolic portion of cERS and that comparable amounts of total mitochondrial protein extracts were subjected to PAGE and transferred onto the membrane. A similar result was observed when comparing, by confocal laser scanning microscopy, the amount of the N<sub>c</sub>ERS-GFP fusion protein addressed to mitochondria in wild type [ARC1] and an *arc1Δ* strain transformed with the plasmid expressing N<sub>c</sub>ERS-GFP. Figure 5B shows that the portion of N<sub>c</sub>ERS-GFP addressed to the organelle, in the absence of Arc1p, is increased in such a manner that the intensity of the mitochondrial fluorescence signal equals that of the cytosolic one. We observed a comparable increased import of N<sub>c</sub>ERS-GFP in the *arc1Δ* mutant as compared with the wild type by Western blotting using anti-GFP antibodies (Fig. 5C). These experiments confirm that Arc1p retains in the cytoplasm a pool of cERS that otherwise would naturally be imported by mitochondria. Taking into account that the mitochondrial pool of cERS is increased by more than one order of magnitude upon depletion of Arc1p, we conclude that, in an *arc1Δ* background, cERS is preferentially a mitochondrial protein.

Increased import of cERS into mitochondria is needed only when yeast cells are grown on a respiratory carbon source, suggesting that Arc1p regulates the subcellular sorting of cERS in response to metabolic changes. Figure 5D indeed shows that the amount of Arc1p is drastically decreased when yeast uses respiration as compared with fermentation, while the content of cMRS and cERS does

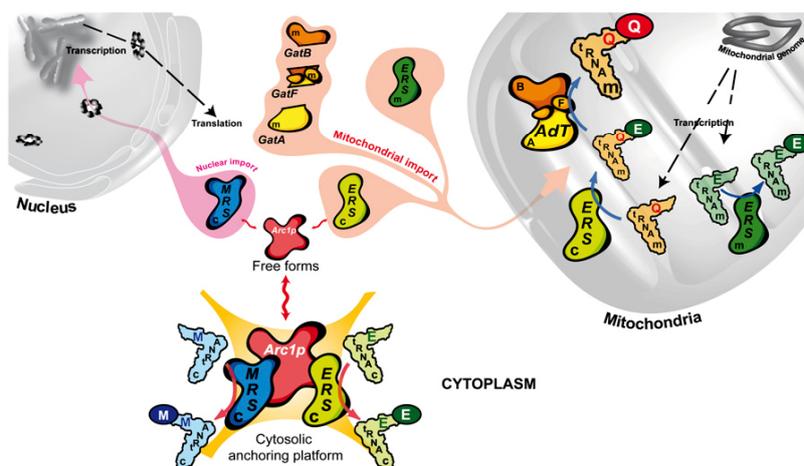
not vary. In addition, in cells grown on glucose, cERS, cMRS, and Arc1p seem to be present in stoichiometric amounts, in agreement with previous studies reporting that Arc1p always copurifies with equivalent amounts of cERS and cMRS (Graindorge et al. 2005). During respiration, however, there is an excess of free cERS and cMRS that can be addressed to their target subcellular compartments, the mitochondria and the nucleus, respectively. These results demonstrate that Arc1p is a cytosolic retention platform for cERS and cMRS, whose amounts are regulated in response to the switch from fermentation to respiration to allow relocation of these cytosolic aaRSs into organelles.

## Discussion

The work described herein reopens the debate on how Q-tRNA<sup>Q</sup> synthesis is achieved in yeast mitochondria and more generally in other eukaryotic species. Recent studies have reported that import of both c<sub>t</sub>RNA<sup>Q</sup> and c<sub>Q</sub>RS was needed for mitochondrial Q-tRNA<sup>Q</sup> synthesis in yeast (Rinehart et al. 2005) and that mammalian mitochondria also import c<sub>t</sub>RNA<sup>Q</sup> (Rubio et al. 2008). This led to a change of paradigm concerning organellar Q-tRNA<sup>Q</sup> synthesis that was, until these reports, assumed to uniformly proceed via tRNA-dependent transamidation (Schön et al. 1988). Our work unambiguously demonstrates that in yeast, mitochondria use the transamidation pathway to generate Q<sub>m</sub>tRNA<sup>Q</sup> (Fig. 6), and that this pathway is essential and sufficient for mitochondrial translation since deletion of any of the AdT subunit genes or suppression of the mitochondrial targeting capacity of the ND-ERS induces a respiratory deficiency. Beyond the discovery of a mitochondrial trimeric AdT in *S. cerevisiae*, we also found orthologs of the *PET112* and *YMR293C* genes in all fungal genomes that are complete and accessible (<http://cbi.labri.fr/Genolevures>). However, recognizable orthologs of *YGR102C* (encoding GatF) could only be found in the *Kluyveromyces lactis* (gi:50307515) and *Candida glabrata* (gi:50288545) genomes. The human genome encodes, in addition to orthologs of the *gatA* [*YMR293C*] and *gatB* [*PET112*] genes, an ortholog of the bacterial *gatC* gene [*gatA*: gi:19923522, *gatB*: gi:4758893, *gatC*: gi:50978623]. Two of these gene products, GatB and GatC, like in yeast, display the sequence of a canonical MTS. We are therefore confident that most, if not all, eukaryotes use the transamidation pathway to generate Q<sub>m</sub>tRNA<sup>Q</sup>. It has been recently confirmed that this is the case in *A. thaliana* mitochondria (Pujol et al. 2008).

In addition, our experiments indicate that the yeast mitochondrial-encoded tRNA<sup>Q</sup> is the only tRNA<sup>Q</sup> used by the mitochondrial translation apparatus, since our mitochondrial tRNA preparations were always deprived of any trace of nuclear-encoded tRNA<sup>Q</sup>. Indeed, in conditions where the cytoplasmic lysine tRNA isoacceptor (TRK1) was well detected in our mitochondrial tRNA preparations, the c<sub>t</sub>RNA<sup>Q</sup> were undetectable. It has been proposed that the mitochondrial import of nuclear-encoded c<sub>t</sub>RNA<sup>Q</sup><sub>CUG</sub> is required for the decoding of CAG glutamine codons in mitochondrial translation

**Figure 6.** Subcellular localization, ligand binding, and activities of the proteins and RNA involved in *S. cerevisiae* Q<sub>m</sub>tRNA<sup>Q</sup> formation. In *S. cerevisiae*, the mitochondrial (m)tRNA<sup>Q</sup> is glutamylated by a fraction of the cytosolic (c) ERS imported into mitochondria. The mitochondrial E-tRNA<sup>Q</sup> is then transaminated into Q-tRNA<sup>Q</sup> by a mitochondrial GatFAB AdT. Formation of the mitochondrial E-tRNA<sup>E</sup> is mediated solely by the mitochondrial ortholog (m)ERS of the cERS. A portion of the cERS is maintained in the cytosol by binding to Arc1p that additionally by capturing the cytosolic MRS hinders its nuclear addressing. Both enzymes are essential to the cytosolic translation since they catalyze formation of the cytosolic E-tRNA<sup>E</sup> and M-tRNA<sup>M</sup>, respectively.



because the uridine modification,  $\text{cmnm}^{\text{s}^2}\text{U}$ , in the wobble position of the anti-codon of  $\text{m}^{\text{tRNA}}^{\text{Q}}$  would restrict the reading to only CAA glutamine codons (Rinehart et al. 2005). However, all other reports published so far point out that  $\text{cmnm}^{\text{s}^2}\text{U}$  is able to pair with both A and G in the codon's third position (Yokoyama and Nishimura 1995; Umeda et al. 2005; Kurata et al. 2008), implying that  $\text{m}^{\text{tRNA}}^{\text{Q}}$  ( $\text{cmnm}^{\text{s}^2}\text{U}$ ) is able to decode both CAA and CAG glutamine codons. In this respect, we may notice that the yeast mitochondrial-coded  $\text{m}^{\text{tRNA}}^{\text{Lys}}$ , which bears the same  $\text{cmnm}^{\text{s}^2}\text{U}$  wobble modification as  $\text{m}^{\text{tRNA}}^{\text{Q}}$ , was shown to be fully functional in mitochondrial protein synthesis (i.e., capable of decoding both AAA and AAG lysine codons), at least at normal temperature (28°C) for growth on respiratory media (Kamenski et al. 2007). At higher growth temperatures (37°C), the mitochondrial import of  $\text{c}^{\text{tRNA}}^{\text{Lys}}_{\text{CUU}}$  (TRK1) becomes essential for the reading of AAG codons because the  $\text{cmnm}^{\text{s}^2}\text{U}$  wobble modification of  $\text{m}^{\text{tRNA}}^{\text{Lys}}$  is impaired at 37°C. However, this defect in  $\text{cmnm}^{\text{s}^2}\text{U}$  modification is specific for  $\text{m}^{\text{tRNA}}^{\text{Lys}}$ , since formation of  $\text{cmnm}^{\text{s}^2}\text{U}$  in  $\text{m}^{\text{tRNA}}^{\text{Q}}$  was not affected in the same conditions (Kamenski et al. 2007). We therefore believe that import of  $\text{c}^{\text{tRNA}}^{\text{Q}}$  for CAG codon translation purposes in mitochondria cannot be regarded as an absolute requirement. Furthermore, assuming that the two  $\text{c}^{\text{tRNAs}}^{\text{Q}}$  would nevertheless be imported into yeast mitochondria, our data show that these species would be imported at a very low level, at least in the strains and growth conditions used in our work, which would question their involvement in mitochondrial translation.

Along the same lines, the report that cQRS is essential for mitochondrial protein synthesis is inconsistent with data obtained by us and others (Nabholz et al. 1997). If we assume that cQRS is responsible for Q<sub>m</sub>tRNA<sup>Q</sup> synthesis, then blocking the mitochondrial import of cERS or deletion of any of the genes encoding GatFAB should not induce a respiratory-deficient phenotype (this work; Mulero et al. 1994; Kim et al. 1997). These considerations raise two possibilities: Either cQRS is not imported into yeast mitochondria, or the fraction of cQRS that is

imported does not participate to Q<sub>m</sub>tRNA<sup>Q</sup> formation. To verify the latter, we engineered a cQRS variant fused to a canonical MTS and tried to complement an AdT-defective strain (Supplemental Table 1; Materials and Methods). Drop tests showed that this cQRS variant is unable to complement the respiratory deficiency of a *pet112* mutant, suggesting that even if cQRS is addressed to mitochondria, it is unable to supply the mitochondrial translation apparatus with Q<sub>m</sub>tRNA<sup>Q</sup> (Supplemental Fig. 3).

One of the most intriguing findings of our work is the fact that yeast cERS is preferentially localized in mitochondria in the absence of Arc1p that acts as a cytosolic retention platform (Fig. 6). Dual localization of cERS is not the first example of a dual, cytosolic- and mitochondrial-localized protein in yeast and more generally in eukaryotes (Karniely and Pines 2005). Among proteins that are distributed between different subcellular compartments, four yeast aaRSs have already been shown to be dual-localized (Turner et al. 2000; Tang et al. 2004). However, in all cases studied so far, dual localization of a protein is almost always the result of translation of two different isoforms either from alternative splice variants or because translation begins at alternative start sites. Thus, both isoforms have different sequences, and since only one has a mitochondrial targeting signal, each isoform is restrained to a single cellular compartment. In the case of cERS, both the cytosolic and the mitochondrial fractions have the same exact amino acid sequence. We could find only a few other examples whereby a single translation product is distributed between membrane-separated subcellular compartments. One is a *S. cerevisiae* adenylate kinase, Aky2, for which a portion of the enzyme is targeted to the intermembrane space of mitochondria while a fraction folds before the MTS accesses the mitochondrial import receptors and is therefore retained in the cytoplasm (Strobel et al. 2002). Another example is *S. cerevisiae* fumarase, for which all molecules are targeted to mitochondria and processed, but only a subset of the mature molecules is further translocated into the mitochondrial matrix while another

fraction goes back to the cytoplasm by a retrograde movement (Stein et al. 1994; Knox et al. 1998). However, the strategy used to control dual, cytosolic and mitochondrial, localization of  $\epsilon$ ERS is unprecedented and distinct from any example reported so far (Karniely and Pines 2005). The mechanism by which the  $\epsilon$ ERS is retained in the cytoplasm is entrapment by binding to a cytosolic anchoring protein. We suspect that retention is very likely not achieved by masking of the  $\epsilon$ ERS MTS. The recent crystal structure of the binary complex made between the N termini of  $\epsilon$ ERS and Arc1p favors our assumption, since it shows that only residues 122–131 and 157–173 of  $\epsilon$ ERS are involved in the interaction with Arc1p (Simader et al. 2006). The entire Arc1p-binding region has been deleted in the  $\Delta$ N190- $\epsilon$ ERS that is still imported and functional in mitochondria, as shown by unaffected growth on glycerol plates of the *cers* $\Delta$ 190 strain (Fig. 4B). What was also unexpected is that although both subcellular fractions of the  $\epsilon$ ERS have the same sequence, they catalyze two different reactions; in the cytosol,  $\epsilon$ ERS produces E- $\epsilon$ tRNA<sup>E</sup>, while the mitochondrial subset forms E- $\epsilon$ tRNA<sup>Q</sup>. We suspect that  $\epsilon$ ERS has an intrinsic capacity to be nondiscriminating for the tRNA, but its association with Arc1p in the cytosol restricts its specificity to only tRNA<sup>E</sup> charging, in agreement with the increased affinity of  $\epsilon$ ERS for tRNA<sup>E</sup> mediated by binding to Arc1p (Graindorge et al. 2005).

This study also shows that the role of Arc1p is not confined to a catalytic enhancer, but that it constitutes a subcellular sorting platform whose expression is regulated in response to which metabolism—fermentation or respiration—is used by yeast. We showed that when yeast uses respiration, there is a decrease in the expression of Arc1p that leads to release of  $\epsilon$ ERS and enhanced import of this aaRS into the mitochondria in order to sustain increased levels of translation in this compartment. However, the molecular signaling pathway that controls the expression of Arc1p in response to the switch from fermentation to respiration has yet to be deciphered. Since Arc1p has also been shown to restrain  $\epsilon$ MRS from going into the nucleus, our work suggests that under respiratory conditions there should also be an increase of nuclear targeting of  $\epsilon$ MRS. The role of  $\epsilon$ MRS inside the nucleus remains yet to be identified. Reports on high-throughput analyses of *S. cerevisiae* protein–protein interactions show that  $\epsilon$ MRS interacts with several nuclear proteins involved in gene transcription regulation and initiation (Gavin et al. 2002; Krogan et al. 2006). One of these interactants is Yll022c (HIF1), which is a component of the HAT-B histone acetyltransferase complex (Poveda et al. 2004), and another is Ygl112c (TAF6), a subunit of TFIID and SAGA complexes involved in transcription initiation by RNA polymerase II and in chromatin modification (Grant et al. 1998). One could easily speculate that  $\epsilon$ MRS could be involved in transcription regulation of certain genes, and since we suspect the nuclear localization of  $\epsilon$ MRS to be increased when there is a higher need for mitochondrial activity, one would speculate that the genes under the dependence of  $\epsilon$ MRS could encode mitochondrial proteins.

Beyond subcellular localization of an aaRS, our data suggest that, in eukaryotes, proteins that have been identified so far to be cytosolic with certainty might nevertheless be capable of being addressed to mitochondria and display an essential function therein, even if a functional organellar ortholog of this cytosolic protein has already been identified. One can wonder whether Arc1p could belong to a broader family of proteins that play the role of cytosolic anchors for proteins that so far have not been considered as being able to reach multiple subcellular destinations. In the light of our work, we suggest a re-examination of the pioneering studies on whole-cell protein–protein interaction networks that led to identification of many unsuspected multienzymatic complexes that are still waiting to be attributed a function. Perhaps gain of function is not the driving force that led to some of these protein–protein interactions, but rather dynamic control of subcellular distribution.

To conclude, our work describes three original aspects of organellar molecular biology. We prove that yeast Q- $\epsilon$ tRNA<sup>Q</sup> synthesis is formed by a bacterial-like AdT, displaying besides two canonical GatA and GatB subunits, a new type of fungi-specific subunit (GatF). We describe a new mechanism of dual—cytoplasmic and mitochondrial—localization of a protein whereby a preferentially mitochondrial protein is also maintained in the cytoplasm by binding to a cytosolic anchoring platform. And finally, we show that the dynamic sorting of this protein between the two compartments is mediated through regulation of the expression of the cytosolic anchoring protein upon the switch from fermentation to respiration.

## Materials and methods

### *Strains and oligonucleotides*

Yeast strains used and engineered for this study are described in Supplemental Table 1. Oligonucleotides and biotinylated oligonucleotides used as primers for PCR amplifications and as bait for tRNA affinity purification, respectively, are described in Supplemental Table 2.

### *Engineering of PET112-TAP strain and TAP purification procedure*

The *pet112*-TAP strain was constructed as described previously (Puig et al. 2001), by homologous replacement of the chromosomal *PET112* C terminus with the PCR product obtained by using oligonucleotides 1 and 2 and the pBS1479 plasmid for the amplification reaction. Twenty grams of cells of the *pet112*-TAP strain, obtained after 8 h of culture in YPD at 30°C, were suspended in 20 mL of disruption buffer (Supplemental Material) and cells were disrupted using a cell disruptor working at 37 psi. The clear lysate obtained after 20 min of centrifugation at 12,000g, was subjected to the TAP procedure as described previously (Puig et al. 2001). The gel bands corresponding to each individual protein present in the final eluate were analyzed by mass spectrometry (MALDI-TOF).

### *Preparation of mitochondria, total mitochondrial tRNA, and mitochondrial protein extracts*

Yeast mitochondria were isolated following the procedure described previously (Entelis et al. 2002; Boldogh and Pon 2007).

Total mitochondrial tRNA was extracted from freshly purified mitochondria using the procedure described by Martin et al. (1977, 1979). Protein extracts of the mitochondrial matrix were prepared as follows: Fresh mitochondria, suspended in lysis buffer [Supplemental Material], were disrupted by sonication (VibraCell BioblockScientific) and centrifuged 20 min at 12,000g to remove broken mitochondria and 90 min more at 105,000g in order to pellet all cytosolic contaminants adsorbed on tiny membrane fragments. For Western blot purposes, the supernatant was directly transferred at  $-80^{\circ}\text{C}$ . For aminoacylation and transamidation purposes, removal of contaminating mitochondrial tRNA from the supernatant was obtained by DEAE-cellulose chromatography (DE52, Whatman) following the manufacturer's instructions. Proteins eluting with 400 mM NaCl were dialyzed against lysis buffer and used directly.

#### Cloning, overexpression, and purification of the yeast *GatFAB* AdT, $m\text{ERS}$ , and $c\text{ERS}$

We designed the yeast *gatFAB* operon as described previously (Bailey et al. 2008) except that the 3'-end of the *gatB* gene was extended in-frame by the sequence encoding the V5 epitope and a 6xHis tag. The *gatFAB* operon was synthesized by Genscript with codon optimization, subcloned into pET20b (Novagen) between the NdeI and XhoI restriction sites, and the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21  $\lambda\text{DE3}$  pLysS. Cytoplasmic *ERS* (*GUS1*) and *mERS* (*MSE1*) genes, deprived of their stop codons, were PCR-amplified from *S. cerevisiae* genomic DNA using oligonucleotide pairs 3, 4 and 5, 6 as primers, respectively. The PCR products were directly ligated into the T/A expression vector pBAD-TOPO (Invitrogen) that allows expression of the corresponding proteins C-terminally fused to the V5 epitope and to a 6xHis tag and were transformed into the *E. coli* Rosetta 2 strain. Expression and purification of soluble *GatFAB* AdT,  $m\text{ERS}$ , and  $c\text{ERS}$  were achieved as described in the Supplemental Material.

#### Engineering of yeast expression plasmids of $c\text{ERS}$ and *GatB* variants

Yeast strains *cersfl*, *cers $\Delta$ 90*, *cers $\Delta$ 190*, and *cers $\Delta$ 199* expressing wild-type  $c\text{ERS}$  and the N-terminally truncated variants  $\Delta\text{N90-}c\text{ERS}$ ,  $\Delta\text{N190-}c\text{ERS}$ , and  $\Delta\text{N199-}c\text{ERS}$ , respectively, were obtained by PCR amplification using *S. cerevisiae* genomic DNA as a template and the following primer pairs, respectively: oligonucleotides 7 and 8, oligonucleotides 9 and 8, and oligonucleotides 10 and 8. The PCR products were digested with HindIII and BamHI and ligated into pRS315 digested with the same restriction enzymes. Genes of the truncated variants were cloned into pRS315 under the control of the *NOP1* promoter. Transformation of the *cersfl* shuffle strain with the recombinant plasmids and plasmid shuffling experiments are described in the Supplemental Material. The gene encoding the first 199 amino acids of  $c\text{ERS}$  fused to GFP [ $N_c\text{ERS-GFP}$ ] was obtained, using *S. cerevisiae* genomic DNA as a template and oligonucleotide pair 11 and 12, by PCR amplification of a fragment of the *cERS* gene (*GUS1*) encompassing the 5' untranslated region (350 base pairs) and the first 603 nucleotides of the ORF flanked by the HindIII/BamHI restriction sites. The PCR product was ligated into pRS315-GFP. The resulting pRS315/ $N_c\text{ERS-GFP}$  plasmid was transformed into yeast BY4741 [ARC1, wild-type] or *arc1 $\Delta$*  strains. The yeast strain *gatB-GFP*, expressing *GatB* C-terminally fused to GFP (*GatB-GFP*), was obtained using the same PCR and cloning strategy and oligonucleotide pair 13 and 14.

#### Fluorescence and microscopy analysis

Yeast strains *gatA-GFP* and *gatF-GFP* expressing the *GatA* and *GatF* subunits C-terminally fused to GFP, respectively, were grown in synthetic medium SCG until  $A_{600\text{nm}} = 0.3$ , while the *gatB-GFP* strain was grown in SCG lacking leucine. A 1-mL aliquot of the cells was stained with 1  $\mu\text{L}$  of MitoTracker (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. After 20 min of incubation, cells were harvested by centrifugation, washed with fresh culture media, mounted on coverslips, and examined with a DIC Zeiss Axiovert 200M phase interference microscope using a 100 $\times$  oil immersion objective (NO 1.4). Images were captured with a CoolSnap HQ<sup>2</sup> camera and processed with Axiovision software. The same procedure was used for the visualization of the yeast *arc1 $\Delta$*  and BY4741 [ARC1] strains transformed with pRS315/ $N\text{ter-}c\text{ERS-GFP}$  except that they were grown in synthetic medium SCG lacking leucine and visualized with a Zeiss LSM510 confocal microscope, using a 63 $\times$  oil immersion objective (NO 1.4). Images were processed with the AIM3.2 software.

#### Immunodetection analysis

RS453 S100 extracts were used as controls to visualize the proportion of the cytosolic fraction of  $c\text{ERS}$ . For all extracts, protein concentration was determined using Bradford, and 10–15  $\mu\text{g}$  of proteins were separated by SDS-PAGE on a 12% gel prior to electroblotting to Hybond-P membrane (Amersham). Detection was carried out using HRP-conjugated goat anti-rabbit antibodies (Bio-Rad) and ECL reagents (Amersham) according to the manufacturer's instructions. We used anti- $c\text{ERS}$  primary antibody (1:5000) to quantify the amount of  $c\text{ERS}$  in each extract. To control the relative quantity and purity of our mitochondrial protein preparations, we used as a mitochondrial matrix protein marker HSP70, which was detected using anti-HSP70 (1:1000), and as a cytosolic marker PGK, which was revealed using anti-PGK (1:1000). For the quantification of *Arc1p* and  $c\text{MRS}$ , we used anti-*Arc1p* (1:5000), anti- $c\text{MRS}$  (1:2000).

#### Northern analyses of tRNA

Detection of the  $m\text{tRNA}^{\text{Q}}$ ,  $m\text{tRNA}^{\text{E}}$ ,  $\text{tRNA}^{\text{K1}}$ , and  $c\text{tRNA}^{\text{Q}}$  was performed following a procedure previously described (Frugier et al. 2005) using 15  $\mu\text{g}$  of unfractionated yeast  $m\text{tRNA}$  prepared as described above or total yeast  $c\text{tRNA}$  commercially available (Boehringer). We used 5 pmol of the specific  $\alpha^{[32\text{P}]}$ -radiolabeled oligonucleotide probes 17, 18, 19, and 20, respectively (see Supplemental Table 2).

#### tRNA purification

Purification of  $m\text{tRNA}^{\text{Q}}$  and  $m\text{tRNA}^{\text{E}}$  from 1 mg of unfractionated mitochondrial tRNA, prepared as described above, was performed using 5'-biotinylated specific oligonucleotides 15 and 16, respectively (see Supplemental Table 2), immobilized on streptavidine-agarose beads (Novagen) following the procedure described by Rinehart et al. (2005).

#### Aminoacylation and transamidation assays

The standard aminoacylation mixture (100  $\mu\text{L}$ ) containing 100 mM Na-Hepes (pH 7.2), 30 mM KCl, 10 mM ATP, 12 mM  $\text{MgCl}_2$ , 30  $\mu\text{M}$  L-[<sup>14</sup>C]glutamate ([<sup>14</sup>C]E) (330 cpm/pmol, Amersham) or 1  $\mu\text{M}$  L-[<sup>3</sup>H]glutamate ([<sup>3</sup>H]E) (3000 cpm/pmol, Amersham), 0.1mg/mL BSA, 0.15  $\mu\text{M}$  pure  $m\text{tRNA}^{\text{Q}}$  or pure  $m\text{tRNA}^{\text{E}}$  or 10  $\mu\text{M}$  total  $m\text{tRNA}$ , and 0.01  $\mu\text{M}$   $m\text{ERS}$  or  $c\text{ERS}$  was

incubated at 30°C. For determination of the aminoacylation plateau, after incubation times ranging from 0 to 20 min, 10- $\mu$ L aliquots were withdrawn and TCA-precipitated, and the radiolabeled Glu-tRNA formed was determined by scintillation liquid counting. For transamidation purposes, the [<sup>14</sup>C]E- or [<sup>3</sup>H]E-tRNA formed when plateaus were reached in a 40- to 50- $\mu$ L aminoacylation mixture was extracted using acid-buffered phenol and chloroform; the radiolabeled E-tRNA was precipitated with ethanol in the aqueous layer recovered by centrifugation, sedimented, and redissolved in water. The standard transamidation mixture (50  $\mu$ L) containing 100 mM Na-Hepes, 30 mM KCl, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ATP, 1 mM L-Gln (except for controls) as amide group donor, 0.03–0.1  $\mu$ M radiolabeled Glu-tRNA, and 100 nM *S. cerevisiae* pure GatCAB AdT was incubated for 15 min at 30°C. The [<sup>14</sup>C]- and [<sup>3</sup>H]aa-tRNA was ethanol-precipitated after phenol-chloroform extraction, dissolved in 50  $\mu$ L of water, and deacylated by 30 min of incubation at 80°C in the presence of 25 mM KOH, followed by neutralization with HCl. The hydrolysate was dried in a Speed-Vac, dissolved in 3  $\mu$ L of water, and fractionated by TLC on cellulose plates (20  $\times$  20 cm, Merck) extended by a 3MM Whatman paper sheet (20  $\times$  5 cm), with a solvent containing 2-propanol/formic acid/water [80/4/20, v/v/v]. The [<sup>14</sup>C]- and [<sup>3</sup>H]-aa were revealed by scanning the 2-h-exposed image plate with a Fuji Bioimager.

### Acknowledgments

We express our gratitude to Drs. I. Tarassov, N. Entelis, S. Friant, and J. Mutterer for technical assistance and sharing of materials and equipment, and to Professor C. Stathopoulos and Dr. M. Blaise for critical reading. This work was supported by the University Louis Pasteur (Strasbourg), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). M.F. was a recipient of a fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie.

### References

- Bailly, M., Blaise, M., Lorber, B., Becker, H.D., and Kern, D. 2007. The transamidosome: A dynamic ribonucleoprotein particle dedicated to prokaryotic tRNA-dependent asparagine biosynthesis. *Mol. Cell* **28**: 228–239.
- Bailly, M., Blaise, M., Roy, H., Deniziak, M., Lorber, B., Birck, C., Becker, H.D., and Kern, D. 2008. tRNA-dependent asparagine formation in prokaryotes: Characterization, isolation and structural and functional analysis of a ribonucleoprotein particle generating Asn-tRNA<sub>(Asn)</sub>. *Methods* **44**: 146–163.
- Becker, H.D. and Kern, D. 1998. *Thermus thermophilus*: A link in the evolution of the tRNA-dependent amino acid amidation pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 12832–12837.
- Boldogh, I.R. and Pon, L.A. 2007. Purification and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Cell Biol.* **80**: 45–64.
- Bordonné, R. 2000. Functional characterization of nuclear localization signals in yeast Sm proteins. *Mol. Cell Biol.* **20**: 7943–7954.
- Curnow, A.W., Hong, K., Yuan, R., Kim, S., Martins, O., Winckler, W., Henkin, T.M., and Söll, D. 1997. Glu-tRNA<sup>Gln</sup> amidotransferase: A novel heterotrimeric enzyme required for correct decoding of glutamine codons during translation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 11819–11826.
- Deinert, K., Fasiolo, F., Hurt, E.C., and Simos, G. 2001. Arc1p organizes the yeast aminoacyl-tRNA synthetase complex and stabilizes its interaction with the cognate tRNAs. *J. Biol. Chem.* **276**: 6000–6008.
- Entelis, N.S., Kieffer, S., Kolesnikova, O.A., Martin, R.P., and Tarassov, I.A. 1998. Structural requirements of tRNA<sub>Lys</sub> for its import into yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 2838–2843.
- Entelis, N., Kolesnikova, O., Kazakova, H., Brandina, I., Kamenski, P., Martin, R.P., and Tarassov, I. 2002. Import of nuclear encoded RNAs into yeast and human mitochondria: Experimental approaches and possible biomedical applications. *Genet. Eng.* **24**: 191–213.
- Federovitch, C.M., Jones, Y.Z., Tong, A.H., Boone, C., Prinz, W.A., and Hampton, R.Y. 2008. Genetic and structural analysis of Hmg2p-induced endoplasmic reticulum remodeling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **19**: 4506–4520.
- Frugier, M., Ryckelynck, M., and Giegé, R. 2005. tRNA-balanced expression of a eukaryal aminoacyl-tRNA synthetase by an mRNA-mediated pathway. *EMBO Rep.* **6**: 860–865.
- Gagnon, Y., Lacoste, L., Champagne, N., and Lapointe, J. 1996. Widespread use of the glu-tRNA<sup>Gln</sup> transamidation pathway among bacteria. A member of the  $\alpha$  purple bacteria lacks glutamyl-tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.* **271**: 14856–14863.
- Galani, K., Grosshans, H., Deinert, K., Hurt, E.C., and Simos, G. 2001. The intracellular location of two aminoacyl-tRNA synthetases depends on complex formation with Arc1p. *EMBO J.* **20**: 6889–6898.
- Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., et al. 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**: 141–147.
- Golinelli-Cohen, M.P. and Mirande, M. 2007. Arc1p is required for cytoplasmic confinement of synthetases and tRNA. *Mol. Cell Biochem.* **300**: 47–59.
- Graindorge, J.S., Senger, B., Tritsch, D., Simos, G., and Fasiolo, F. 2005. Role of Arc1p in the modulation of yeast glutamyl-tRNA synthetase activity. *Biochemistry* **44**: 1344–1352.
- Grant, P.A., Schieltz, D., Pray-Grant, M.G., Steger, D.J., Reese, J.C., Yates III, J.R., and Workman, J.L. 1998. A subset of TAF<sub>(II)</sub>s are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation. *Cell* **94**: 45–53.
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., and O'Shea, E.K. 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**: 686–691.
- Ibba, M. and Söll, D. 2000. Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **69**: 617–650.
- Ibba, M., Becker, H.D., Stathopoulos, C., Tumbula, D.L., and Söll, D. 2000. The adaptor hypothesis revisited. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 311–316.
- Kamenski, P., Kolesnikova, O., Jubenet, V., Entelis, N., Krashe-ninnikov, I.A., Martin, R.P., and Tarassov, I. 2007. Evidence for an adaptation mechanism of mitochondrial translation via tRNA import from the cytosol. *Mol. Cell* **26**: 625–637.
- Karniely, S. and Pines, O. 2005. Single translation–dual destination: Mechanisms of dual protein targeting in eukaryotes. *EMBO Rep.* **6**: 420–425.
- Kim, S.I., Stange-Thomann, N., Martins, O., Hong, K.W., Söll, D., and Fox, T.D. 1997. A nuclear genetic lesion affecting *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial translation is complemented by a homologous *Bacillus* gene. *J. Bacteriol.* **179**: 5625–5627.
- Knox, C., Sass, E., Neupert, W., and Pines, O. 1998. Import into mitochondria, folding and retrograde movement of fumarate in yeast. *J. Biol. Chem.* **273**: 25587–25593.

- Krogan, N.J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A.P., et al. 2006. Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **440**: 637–643.
- Kurata, S., Weixlbaumer, A., Ohtsuki, T., Shimazaki, T., Wada, T., Kirino, Y., Takai, K., Watanabe, K., Ramakrishnan, V. and Suzuki, T. 2008. Modified uridines with C5-methylene substituents at the first position of the tRNA anticodon stabilize U-G wobble pairing during decoding. *J. Biol. Chem.* **283**: 18801–18811.
- Lapointe, J., Duplain, L., and Proulx, M. 1986. A single glutamyl-tRNA synthetase aminoacylates tRNA<sup>Glu</sup> and tRNA<sup>Gln</sup> in *Bacillus subtilis* and efficiently misacylates *Escherichia coli* tRNA<sup>Gln1</sup> in vitro. *J. Bacteriol.* **165**: 88–93.
- Martin, R.P., Schneller, J.M., Stahl, A.J., and Dirheimer, G. 1977. Study of yeast mitochondrial tRNAs by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: Characterization of iso-accepting species and search for imported cytoplasmic tRNAs. *Nucleic Acids Res.* **4**: 3497–3510.
- Martin, R.P., Schneller, J.M., Stahl, A.J., and Dirheimer, G. 1979. Import of nuclear deoxyribonucleic acid coded lysine-accepting transfer ribonucleic acid (anticodon C-U-U) into yeast mitochondria. *Biochemistry* **18**: 4600–4605.
- Mukherjee, S., Shukla, A., and Guptasarma, P. 2003. Single-step purification of a protein-folding catalyst, the SlyD peptidyl prolyl isomerase (PPI), from cytoplasmic extracts of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **37**: 183–186.
- Mulero, J.J., Rosenthal, J.K., and Fox, T.D. 1994. PET112, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene required to maintain rho+ mitochondrial DNA. *Curr. Genet.* **25**: 299–304.
- Nabholz, C.E., Hauser, R., and Schneider, A. 1997. *Leishmania tarentolae* contains distinct cytosolic and mitochondrial glutamyl-tRNA synthetase activities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 7903–7908.
- Navarro, B., Rubino, L., and Russo, M. 2004. Expression of the *cymbidium ringspot virus* 33-kilodalton protein in *Saccharomyces cerevisiae* and molecular dissection of the peroxisomal targeting signal. *J. Virol.* **78**: 4744–4752.
- Poveda, A., Pamblanco, M., Tafrov, S., Tordera, V., Sternglanz, R., and Sendra, R. 2004. Hif1 is a component of yeast histone acetyltransferase B, a complex mainly localized in the nucleus. *J. Biol. Chem.* **279**: 16033–16043.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B. 2001. The tandem affinity purification (TAP) method: A general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**: 218–229.
- Pujol, C., Bailly, M., Kern, D., Maréchal-Drouard, L., Becker, H., and Duchêne, A.M. 2008. Dual-targeted tRNA-dependent amidotransferase ensures both mitochondrial and chloroplastic Gln-tRNA<sup>Gln</sup> synthesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 6481–6485.
- Reinders, J., Zahedi, R.P., Pfanner, N., Meisinger, C., and Sickmann, A. 2006. Toward the complete yeast mitochondrial proteome: Multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *J. Proteome Res.* **5**: 1543–1554.
- Rinehart, J., Horn, E.K., Wei, D., Söll, D., and Schneider, A. 2004. Non-canonical eukaryotic glutamyl- and glutamyl-tRNA synthetases form mitochondrial aminoacyl-tRNA in *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* **279**: 1161–1166.
- Rinehart, J., Krett, B., Rubio, M.A., Alfonzo, J.D., and Söll, D. 2005. *Saccharomyces cerevisiae* imports the cytosolic pathway for Gln-tRNA synthesis into the mitochondrion. *Genes & Dev.* **19**: 583–592.
- Rubio, M.A., Rinehart, J.J., Krett, B., Duvezin-Caubet, S., Reichert, A.S., Söll, D., and Alfonzo, J.D. 2008. Mammalian mitochondria have the innate ability to import tRNAs by a mechanism distinct from protein import. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**: 9186–9191.
- Schön, A., Kannangara, C.G., Gough, S., and Söll, D. 1988. Protein biosynthesis in organelles requires misaminoacylation of tRNA. *Nature* **331**: 187–190.
- Sheppard, K., Yuan, J., Hohn, M.J., Jester, B., Devine, K.M., and Söll, D. 2008. From one amino acid to another: tRNA-dependent amino acid biosynthesis. *Nucleic Acids Res.* **36**: 1813–1825.
- Simader, H., Hothorn, M., Köhler, C., Basquin, J., Simos, G., and Suck, D. 2006. Structural basis of yeast aminoacyl-tRNA synthetase complex formation revealed by crystal structures of two binary sub-complexes. *Nucleic Acids Res.* **34**: 3968–3979.
- Simos, G., Segref, A., Fasiolo, F., Hellmuth, K., Shevchenko, A., Mann, M., and Hurt, E.C. 1996. The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases. *EMBO J.* **15**: 5437–5448.
- Stein, I., Peleg, Y., Even-Ram, S., and Pines, O. 1994. The single translation product of the FUM1 gene (fumarase) is processed in mitochondria before being distributed between the cytosol and mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 4770–4778.
- Strobel, G., Zollner, A., Angermayr, M., and Bandlow, W. 2002. Competition of spontaneous protein folding and mitochondrial import causes dual subcellular location of major adenylate kinase. *Mol. Biol. Cell* **13**: 1439–1448.
- Tang, H.L., Yeh, L.S., Chen, N.K., Ripmaster, T., Schimmel, P., and Wang, C.C. 2004. Translation of a yeast mitochondrial tRNA synthetase initiated at redundant non-AUG codons. *J. Biol. Chem.* **279**: 49656–49663.
- Tumbula, D.L., Becker, H.D., Chang, W.-Z., and Söll, D. 2000. Domain-specific recruitment of amide amino acids for protein synthesis. *Nature* **407**: 106–110.
- Turner, R.J., Lovato, M., and Schimmel, P. 2000. One of two genes encoding glycyl-tRNA synthetase in *Saccharomyces cerevisiae* provides mitochondrial and cytoplasmic functions. *J. Biol. Chem.* **275**: 27681–27688.
- Tzagoloff, A. and Shtanko, A. 1995. Mitochondrial and cytoplasmic isoleucyl-, glutamyl- and arginyl-tRNA synthetases of yeast are encoded by separate genes. *Eur. J. Biochem.* **230**: 582–586.
- Umeda, N., Suzuki, T., Yukawa, M., Ohya, Y., Shindo, H., Watanabe, K., and Suzuki, T. 2005. Mitochondria-specific RNA-modifying enzymes responsible for the biosynthesis of the wobble base in mitochondrial tRNAs. Implications for the molecular pathogenesis of human mitochondrial diseases. *J. Biol. Chem.* **280**: 1613–1624.
- Yokoyama, S. and Nishimura, S. 1995. Modified nucleosides and codon recognition. In *tRNA: Structure, biosynthesis and function* (eds. U. RajBhandary and D.Söll), pp. 207–233. American Society for Microbiology Press, Washington, DC.

## Supplemental Experimental Procedures

**Supplemental Table 1**

Strain	Genotype	Source
RS453	<i>MATa/α, ade2-1/ ade2-1, trp1-1/ trp1-1, can1-100/ can1-100, leu2-3/ leu2-3, his3-1/ his3-1, ura3-52/ ura3-52</i>	Senger et al., 1998
BY4741	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0,</i>	Euroscarf
gatC-TAP	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, YGR102c-TAP:HIS3MX6</i>	Open Biosystems
gatA-TAP	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, YMR293c-TAP:HIS3MX6</i>	Open Biosystems
gatB-TAP	<i>MATa, ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3, his3-1, ura3-52, YBL080c-TAP:TRP1</i>	this work
gatC-GFP	<i>MATa, his3Δ1 leu2Δ0 met15D0 ura3Δ0, YGR102c-GFP :HIS3MX6</i>	In vitrogen
gatA-GFP	<i>Mat a, his3Δ1 leu2Δ0 met15D0 ura3Δ0, YMR293c-GFP :HIS3MX6</i>	In vitrogen
gatB-GFP	<i>MATa, his3Δ1 leu2Δ0 met15D0 ura3Δ0, ybl080c::kanMX4</i> transformed with pRS315-YBL080c-GFP	This work
pet112Δ	<i>MATa, his3Δ1 leu2Δ0 met15D0 ura3Δ0, ybl080c::kanMX4</i>	This work
pet112Δ shuffle	<i>MATa, his3Δ1 leu2Δ0 met15D0 ura3Δ0, ybl080c::kanMX4</i> transformed with pRS316-YBL080c	This work
cersfl	<i>MATa ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3, his3-1, ura3-52, ygl245w::HIS5</i> transformed with pRS316-ERS	Galani et al., 2001
cersΔ90	<i>MATa ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3, his3-1, ura3-52, ygl245w::HIS5</i> transformed with pRS316-ΔN90-cERS	This work
cersΔ190	<i>MATa ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3, his3-1, ura3-52, ygl245w::HIS5</i> transformed with pRS316-ΔN190-cERS	This work
cersΔ199	<i>MATa ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3, his3-1, ura3-52, ygl245w::HIS5</i> transformed with pRS316-ΔN199-cERS	This work
arc1Δ	<i>MATa, ade2-1, trp1-1, can1-100, leu2-3, his3-1, ura3-52</i>	Simos et al., 1996
MDH-cQRS	<i>MATa, his3Δ1 leu2Δ0 met15D0 ura3Δ0, ybl080c::kanMX4</i> transformed with p415MDH-GLN4	This work

**Supplemental Table 2**

Oligo #	Sequence	Biotin
---------	----------	--------

1	5' -GGCAAACGAATTCGAGAAAAAATCAAAGAGATCTTAAATATCAATGGTCCATGGAAAAGAGAAG-3'	
2	5' -GTTATTATTTATGCACGGTTCCTATTACACGCGCGTTTATATTTACGACTCACTATAGGG-3'	
3	5' -ATGCCATCTACCTTG ACTATT-3'	
4	5' -TTTCTTTGCACCATACTTG TTGAC-3'	
5	5' -CCTTCTTTACCTGTTAGAAGTAGG-3'	
6	5' -CTTTTTCTCTCTTTGCAAGAACTG-3'	
7	5' -GGCCATGGTTTGCTAAAATTATCACAATCATTTGG-3'	
8	5' -TTTCTTTGCACCATACTTGTGAC-3'	
9	5' -GGCCATGGGTGAAATTGATTTGCCAGATGCC-3'	
10	5' -GGTGAAGTCGTCACCTCGTTTCC-3'	
11	5' -GGAAGCTTTTCAGCGTC TGGAAAGATAG-3'	
12	5' -GGAGATCTTTCACCCATTTTGGCATCTGG-3'	
13	5' -TTTTGAGCTCTCCTTCGTGCAACACGATATAGAG-3'	
14	5' -TTTTGGATCCCCATTTGAATATTTAAGATCTCTTTG-3'	
15	5' -TATTATCAACATGAAGAGG-3'	yes
16	5' -GAACTCCAACCTCAAATTT-3'	yes
17	5' -GAACTCCAACCTCAAATTT-3'	
18	5' -TATTATCAACATGAAGAGG-3'	
19	5' -GAGAATTAGTATTCCAATC-3'	
20	5' -GAACCGGGTTGTCCGGAT-3'	
21	5' -TAGAGCTCCATGTACCTGGGCAGCAGTCTCGACA-3'	
22	5' -TTGGATCCACCCAAAACAGTCACTTTATAAGGGTTGGC-3'	
23	5' -TTTCTGCAGATGCTTCTGTAGAAGAATTGACTCAGC-3'	
24	5' -TTTCTCGAGTCACTTGGAAAGTTGCGTCCTTCAAGC-3'	

### Buffers:

All buffers were derived from Buffer A: 100 mM Hepes-Na buffer containing 30 mM KCl, 5 mM, 2-mercaptoethanol. **Lysis Buffer:** Buffer A containing 1 mM AEBSF and Benzamidine. **Disruption Buffer:** 20mM Hepes-K, pH7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT, 0.5 mM pMSF, 2 mM Benzamidine, 1μM leupeptine, 2 μM pepstatine A, 4 μM chymostatine, 2.6 μM aprotikine, 2.5 μg/mL Antipain, 2.35 μg/mL Bostatine.

### Expression and purification of *S.cerevisiae* GatCAB, <sub>m</sub>ERS and <sub>c</sub>ERS.

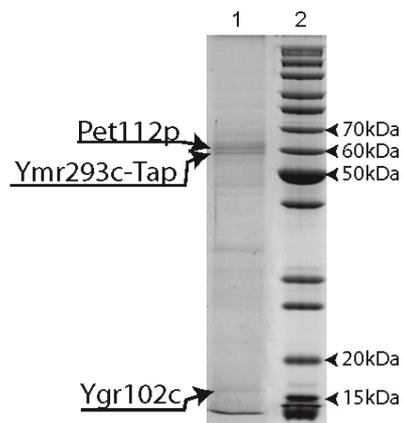
The three E.coli strains transformed by plasmids expressing *S.cerevisiae* GatCAB, <sub>m</sub>ERS and <sub>c</sub>ERS were grown at 30°C and induced when A<sub>600 nm</sub>=0.8, using 0.2 mM IPTG and 10% w/v Glucose for the GatCAB and 0.02% arabinose (w/v) for <sub>m</sub>ERS and <sub>c</sub>ERS. After 4 h of incubation, cells were pelleted by centrifugation, resuspended in lysis buffer and disrupted by sonication (VibraCell, Bioblock Scientific). The Crude extract was centrifuged at 105000g and loaded onto a Cobalt saturated Talon matrix column from Clontech. Column wash and elution were done respectively with Buffer A containing respectively 25 mM and 1M

imidazole. SDS-PAGE analysis revealed a 95% pure GatCAB trimer and <sub>m</sub>ERS and 50% pure <sub>c</sub>ERS. GatCAB and <sub>m</sub>ERS were dialysed against Buffer A containing 50% glycerol and stored at -30°C. <sub>c</sub>ERS was dialysed against buffer A, loaded on HiTrap Heparin Hp cation Exchange column from GE Healthcare and eluted with buffer A supplemented with 600 mM NaCl. SDS-PAGE analysis revealed a 95% pure <sub>c</sub>ERS. The recombinant protein was dialysed and conserved as described above.

### **Construction of MDH-cQRS strain**

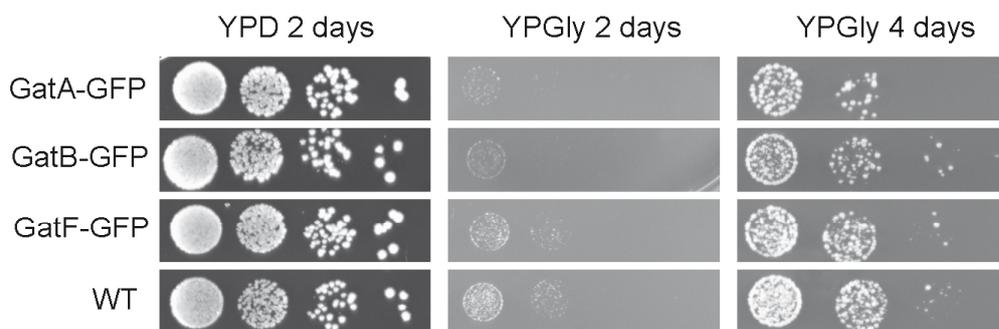
The p415MDH-GLN4 plasmid is derived from p415ADH (LEU2, CEN) (Mumberg, D., Muller, R., and Funk, M. 1994. Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res.* 22: 5767-5768) that was digested by SacI/BamHI and ligated to a PCR fragment flanked by the same sites and encompassing the promoter and mitochondrial targeting sequence (residues 1 to 24) of the yeast mitochondrial malate dehydrogenase (MDH1) by using primers 21 and 22. Subsequently, the GLN4 gene encoding cQRS was amplified by PCR using primers 23 and 24 and cloned into the PstI/XhoI sites of p415MDH to yield the p415MDH-GLN4 plasmid. This plasmid was introduced into the pet112Δshuffle strain (see Supplemental Table 1) and loss of the PET112-expressing plasmid was selected on 5-FOA plates yielding the MDH-cQRS strain.

Frechin\_Supp. Fig. 1

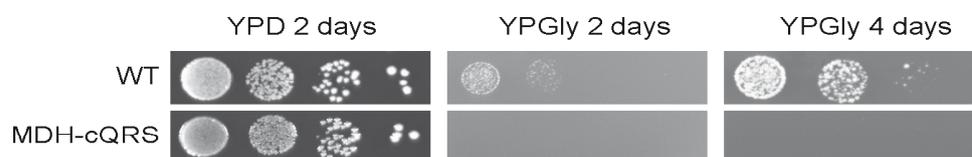


**Supplemental figure 1:** G250 Colloidal Blue-stained SDS-PAGE separation of the Ymr293c-TAP interactants purified by Tandem Affinity Purification (lanes 1). Lane 2: molecular weight standards. The three putative mitochondrial proteins, identified by mass spectrometry, are highlighted.

Frechin\_Supp. Fig. 2



**Supplemental figure 2 :** Dot-spot growth analysis of the strains expressing the C-terminally GFP-tagged subunits of the yeast mitochondrial AdT. Freshly grown cells were diluted and equivalent amounts were spotted onto YPD or YPGly plates and incubated at 30°C.



**Supplemental figure 3** : Dot-spot growth analysis of the strain expressing cQRS addressed to the mitochondria. Freshly grown cells were diluted and equivalent amounts were spotted onto YPD or YPGly plates and incubated at 30°C. Construction of the strain expressing the MDH-cQRS is described in the Supplemental Experimental Procedures.

Si je ne devais retenir que deux messages que ce travail a tenté de faire passer ce seraient les suivants : *i*) même si une protéine a une localisation subcellulaire bien établie (comme c'est le cas pour l'ERS cytoplasmique) et qu'il existe par ailleurs déjà un orthologue dans un autre compartiment subcellulaire (comme c'est le cas de l'ERS mitochondriale) cela ne signifie pas que les deux formes sont uniquement restreintes aux compartiments dans lesquels elles ont été identifiées initialement. Dans notre cas l'ERS cytoplasmique va dans la mitochondrie même si cet organite contient déjà une ERS qui lui est propre. *ii*) Nous avons mis en évidence une nouvelle stratégie de double localisation d'un même peptide dans le cytoplasme et la mitochondrie: la séquestration cytoplasmique par liaison à une protéine jouant le rôle d'ancre. Ceci signifie qu'il n'existe pas dans la levure d'ERS cytoplasmique *per se*, elles sont toutes deux mitochondriales, mais l'une d'entre-elles est retenue dans le cytoplasme. Cette étude a également soulevé un certain nombre de questions que je n'ai pas eu le temps d'étudier et qui feront probablement l'objet d'études ultérieures dans mon équipe d'accueil.

La question de l'import et du rôle de la glutaminyl-ARNt synthétase (QRS) cytoplasmique dans les mitochondries de levure reste toujours irrésolue. Nous décrivons dans la partie des résultats supplémentaires le clonage du gène de cette aminoacyl-ARNt synthétase fusionnée à la séquence d'import mitochondrial de la malate deshydrogénase (MDH) et sous dépendance d'un promoteur fort. Cette construction a ensuite été insérée dans une souche *pet112 shuffle*. Dans cette souche le gène *pet112* n'est pas chromosomique mais sur un plasmide. Elle est équivalente à une souche sauvage et donc possède des mitochondries pleinement fonctionnelles. Nous avons ensuite chassé le plasmide portant *pet112* afin de ne laisser que le plasmide portant notre construction MDH-QRS (cf. material & methods de l'article). Le

phénotype classique induit par la délétion de *pet112* est un phénotype petite, en effet comme le gène est absent, l'amidotransférase ne peut se former et la mitochondrie ne produisant plus de Q-ARNt<sup>Q</sup> (ou peu, la QRS importée du cytoplasme est sensée en fabriquer) la synthèse protéique mitochondriale est bloquée. La cellule perd alors l'activité mitochondriale et ne peut plus croître sur une source de carbone uniquement respirable (glycérol).

Le travail de l'équipe du Pr. Dieter Söll a montré que la QRS cytoplasmique est capable de charger l'ARNt<sup>Q</sup> mitochondrial substrat de l'amidotransférase de levure (Rinehart et al., 2005), nous pensons donc compenser l'absence de la voie indirecte (délétion de *PET112*) en augmentant la quantité de QRS qui est importée, car notre construction s'ajoute au gène sauvage porté par le génome. Comme vous pouvez l'observer, le phénotype petite n'est pas levé par la transformation de la souche avec le plasmide surexprimant la QRS fusionnée à une séquence d'adressage mitochondriale. Cette expérience montre que la QRS ne peut remplacer la voie transamidation (supplemental figure 3). De plus, aucune des tentatives d'identification des ARNt<sup>Q</sup> cytoplasmiques dans la fraction d'ARNt mitochondrial total n'a confirmé les résultats obtenus par Rinehart et ses collègues (dans notre contexte expérimental). En conclusion, il semble que si la QRS est réellement importée du cytoplasme, sa fonction doit obligatoirement avoir dévié de l'aminacylation de l'ARNt<sup>Q</sup> codé par le génome mitochondrial.

La ND-ERS cytoplasmique de levure appartient à une nouvelle famille d'ERS qui s'apparente à celle de l'ERS2 d'*Helicobacter pylori* qui ne charge que l'ARNt<sup>Q</sup> et plus l'ARNt<sup>E</sup>. Néanmoins dans notre cas il existe une différence subtile apportée par la compartimentalisation des ARNt substrats de la ND-ERS cytoplasmique. Dans le cytoplasme elle ne charge que l'ARNt<sup>E</sup> et dans la mitochondrie que l'ARNt<sup>Q</sup>. Cette observation nous a poussé à rechercher quels éléments communs avaient ces ARNts. Nous nous sommes aperçus que l'élément commun majeur était la présence dans l'ARNt<sup>E</sup> cytoplasmique et l'ARNt<sup>Q</sup> mitochondrial de la même première paire de bases U1-A72 dans le bras accepteur ; alors que cette paire de bases est remplacée par une paire G1-C72 dans l'ARNt<sup>Q</sup> cytoplasmiques et ARNt<sup>E</sup> mitochondrial. Or, nous savons d'après un travail mené au laboratoire (Bailly et al., 2006) que l'élément essentiel qui détermine si un aminoacyl-ARNt peut être transamidé par une AdT de type GatCAB est la première paire de bases des ARNt<sup>N ou Q</sup> qui est toujours une paire U1-A72. En d'autres termes, l'ARNt<sup>E</sup> cytoplasmique de levure possède tout les déterminants qui lui permettraient d'être transamidé. Chez un procaryote, cette situation serait

très dangereuse, puisque n'ayant pas de compartimentalisation subcellulaire cet E-ARNt<sup>E</sup> serait en contact de l'AdT et donc transamidé en Q-ARNt<sup>E</sup>, ce qui provoquerait des erreurs de décodage, probablement létales, des codons glutamate. Chez la levure la dangerosité d'une telle ressemblance de l'ARNt<sup>E</sup> et de l'ARNt<sup>Q</sup> est neutralisée par leur compartimentalisation.

Cette inversion des déterminants mitochondriaux et cytoplasmiques des ARNt du système E/Q permet à la cellule de faire naviguer une même synthétase entre les deux compartiments alors qu'elle n'y décode pas le même acide aminé. Du point de vue de l'évolution on peut comprendre qu'il est plus facile de voir apparaître un changement de paire de bases sur l'ARNt plutôt qu'un remaniement des mécanismes de reconnaissance d'une protéine qui nécessiterait probablement la mutation de nombreux résidus de la protéine. En ce sens, nous pouvons considérer les éléments d'identité des ARNts comme un second type de code génétique car ils sont également garants de la correspondance codon/acide aminé.

Nous sommes allé plus loin et avons comparé toutes les séquences mitochondriales et cytoplasmiques d'ARNt<sup>E</sup> et <sup>Q</sup> eucaryotiques disponibles dans les banques de données avec l'aide précieuse d'un doctorant de notre équipe, Frédéric Fischer, qui est très intéressé par ces questions d'évolution. Nous avons observé qu'il y a systématiquement inversion des déterminants cytoplasmiques et mitochondriaux : les ARNt<sup>Q</sup> et <sup>E</sup> cytoplasmiques possèdent tous respectivement un G1-C72 et un U1-A72 et, à l'inverse, les ARNt<sup>Q</sup> et <sup>E</sup> mitochondriaux ont respectivement un A1-U72 et un G1-C72, à l'exception des apicomplexes. Rappelons que ces organismes n'ont plus d'ARNts portés par le génome mitochondrial et qu'ils n'ont pas de GatCAB dans leur génome nucléaire.

En conclusion il semblerait donc que tous les eucaryotes utilisent une voie de formation indirecte du Q-ARNt<sup>Q</sup> mitochondrial mais également une ND-ERS doublement localisée. Leurs présences sont trahies respectivement par *i*) des gènes nucléaires codant pour une potentielle AdT et des gènes d'ARNts dans le génome mitochondrial, ainsi que *ii*) par l'inversion des déterminants dont nous venons de parler. Cette dernière hypothèse est renforcée par le fait que l'on retrouve des gènes codant des protéines homologues d'Arc1p chez tous les eucaryotes. Ces protéines pourraient être parfaitement jouer le rôle d'ancre cytoplasmique pour une ND-ERS doublement localisée.

Alors que nous finissons le projet de levure, j'ai commencé à faire des expériences afin de vérifier si le système que nous avons trouvé chez la levure se retrouvait également chez

l'Homme. Ce projet est aujourd'hui poursuivi par Guillaume Octobre, un chercheur post-doctorant de notre équipe. Chez l'homme l'ERS cytoplasmique se fixe à p38 dans le cytoplasme ( I.C.4.a)(3) ), même si la complexité de l'organisme et de ses composants augmente, on peut penser, comme nous allons le voir, qu'un système équivalent à celui de la levure a été mis en place pour la synthèse du Q-ARNt<sup>Q</sup> mitochondrial humain.

## **C. Composants et mécanismes de contrôle de la voie de formation du glutaminyl-ARNt<sup>glutamine</sup> dans la mitochondrie Humaine**

### **1. Contexte**

Il est facile de trouver les séquences des trois sous unités de l'amidotransférase humaine par recherche bioinformatique. Ainsi, lorsque je travaillais à l'expression de l'amidotransférase de levure, j'ai également entrepris de cloner les trois sous unités GatA, B et C d'une potentielle amidotransférase mitochondriale humaine. Le Dr. Jean-Marie Garnier de l'IGBMC m'a fourni une banque de cDNA de cerveau de fœtus humain qui m'a permis d'amplifier puis de cloner les trois gènes, *gatA*, *gatB* et *gatC* dans le vecteur de sous-clonage pCR-TOPO 2.1. Alors que je finissais ces clonages, nous nous sommes rendu au tRNA Workshop à Uppsala (Suède) et avons pu constater que l'équipe Japonaise du Pr. T.Suzuki de l'université de Tokyo était bien plus avancée que nous dans la caractérisation de la voie de formation du Q-ARNt<sup>Q</sup> mitochondrial humain. Ils avaient mis en évidence l'activité de transamidation ARNt-dépendante de la GatCAB humaine recombinante. Ils n'avaient toutefois pas encore identifié la ND-ERS à l'origine de la formation du E-ARNt<sup>Q</sup> dans la mitochondrie (la mésacylation de leur ARNt<sup>Q</sup> était faite avec un extrait protéique mitochondrial contenant *de facto* la ND-ERS). J'ai donc décidé de mettre ce projet de côté pour me focaliser sur le projet de levure.

Il s'est ensuite écoulé environ un an avant que nous puissions mettre en évidence le système de transamidation de la levure, et ses spécificités quant à l'import mitochondrial de la ND-ERS cytoplasmique. L'équipe du Pr. Suzuki n'ayant toujours pas publié son travail sur la voie de transamidation mitochondriale humaine, nous avons pensé que son équipe butait sur

l'identification de la ND-ERS humaine, car selon toute vraisemblance l'ERS mitochondriale humaine est également discriminante et ne peut donc pas charger l'ARNt<sup>Q</sup> mitochondrial.

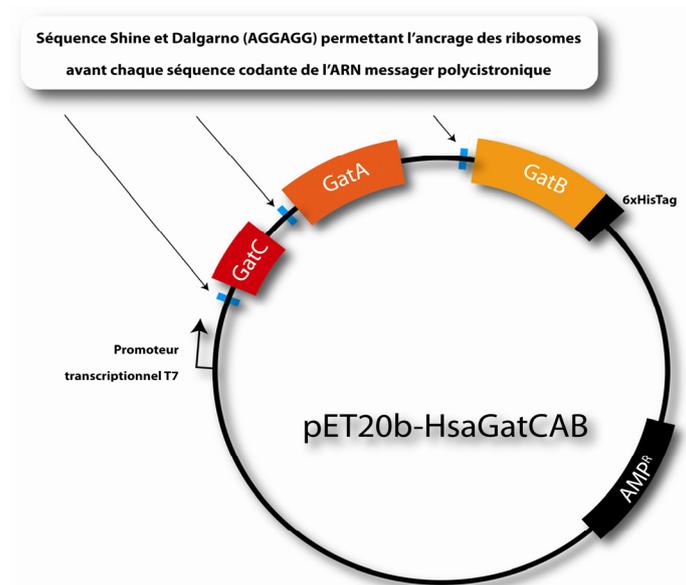
En effet, comme chez la levure, on retrouve une inversion des déterminants des ARNt<sup>E</sup> et <sup>Q</sup> cytoplasmiques et mitochondriaux suggérant que la ND-ERS est l'ERS cytoplasmique et non l'ERS mitochondriale. Des alignements de séquences montrent également que les ERS mitochondriaux humaines et de levure sont proches, tout comme les enzymes cytoplasmiques qui sont également fortement similaires, ce qui renforce l'hypothèse d'une fonction identique. Néanmoins, le système humain semble beaucoup plus complexe, l'ERS cytoplasmique humaine est retrouvée fusionnée à la PRS (prolyl-ARNt synthétase, EPRS) *via* un linker composé de trois domaines WHEP. Chacun de ces domaines est composé de deux hélices  $\alpha$  qui sont capables de se lier à la protéine p38, un homologue fonctionnel d'Arc1p, et qui permet à l'EPRS de faire partie du MSC. (I.C.4.a)(3)

Le Pr. Shiba de l'université de Tokyo, a mis en évidence par analyse bioinformatique que ces domaines WHEP sont issus de l'évolution de séquences d'adressage mitochondrial (Shiba, 2002). Un autre travail montre qu'en plus de se fixer à p38, ces domaines WHEP sont reconnus par la chaperone HSP90 (Kang et al., 2000) qui, chez l'humain, est chargée de transporter les protéines mitochondriales possédant des séquences d'adressage internes vers la machinerie d'import mitochondriale (Young et al., 2003). Ainsi, toute une série d'indices nous confortent dans notre hypothèse selon laquelle l'ERS cytoplasmique humaine pourrait être importée dans la mitochondrie et assurer le rôle de ND-ERS dans la voie de transamidation. L'EPRS pourrait soit être importée dans son intégrité ou bien être clivée lors de sa translocation à travers les complexes d'import mitochondriaux afin de ne faire se relocaliser que la partie ERS de l'EPRS.

## **2. Clonage, purification et tests de l'activité de transamidation de l'amidotransférase GatCAB humaine**

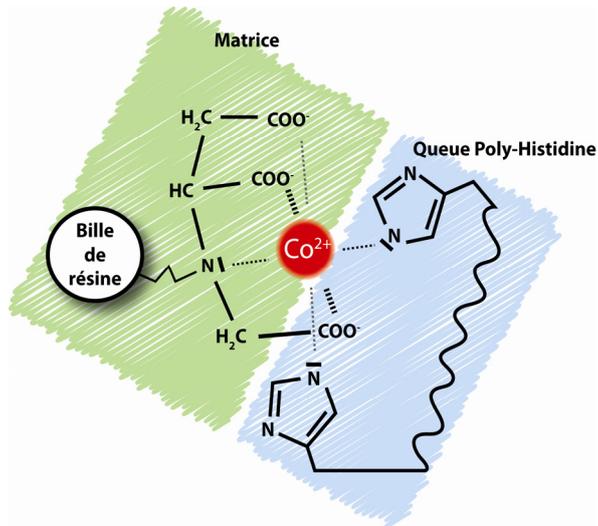
Afin de gagner un temps précieux face à l'équipe japonaise concurrente qui tardait toujours à publier ses résultats, nous avons fait synthétiser l'opéron codant pour la GatCAB humaine en suivant exactement la même stratégie que celle décrite dans l'article précédent. Son organisation est représentée sur la **Figure II-1**.

Le plasmide pET20b-hsaGatCAB a ensuite été inséré dans une souche d'*E.coli* BL21  $\lambda$ DE3. La production du complexe codé sous forme d'opéron artificiel a été induite par addition d'une concentration finale de 0,2 mM d'IPTG dans une culture à 37°C ayant atteint une densité cellulaire correspondant à  $A_{600\text{ nm}} = 0.6$ . L'expression s'est faite à 18°C sur la nuit. Les cellules ont été récupérées puis cassées selon la procédure classique décrite dans la section des Méthodes Supplémentaires de la publication précédente (Frechin et al., 2009). L'AdT GatCAB mitochondriale humaine, contenue dans l'extrait obtenu, a été purifiée sur colonne Talon (CloneTech). Cette matrice est saturée en ion divalent cobalt  $\text{Co}^{2+}$  permettant de retenir l'extension 6×Histidine que nous avons placée à l'extrémité C-terminale de la sous-unité GatB de l'AdT humaine comme le montre la **Figure II-2**.



**Figure II-1**

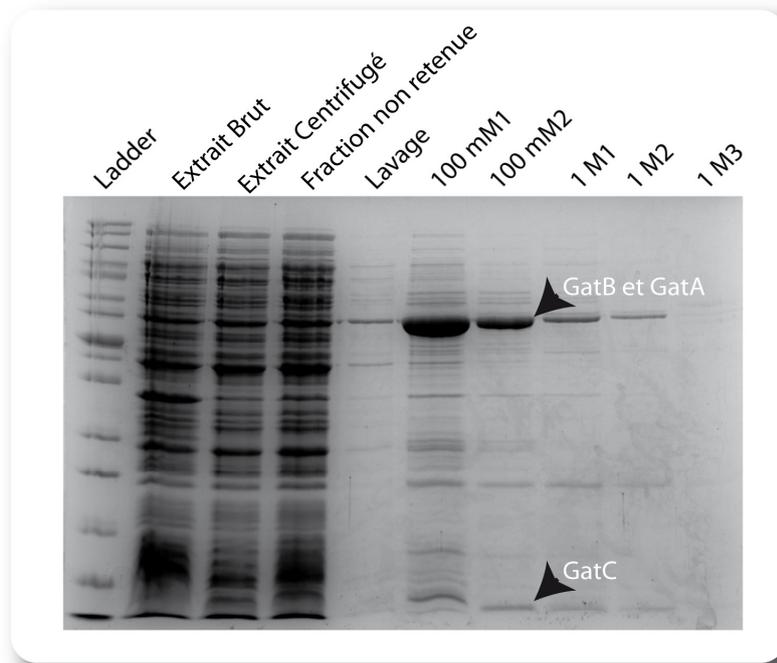
Architecture de l'opéron HsaGatCAB élaboré afin de surexprimer et purifier le complexe de l'AdT GatCAB humaine. Cette stratégie a été largement utilisée pour la surexpression des AdT bactériennes et est très bien décrite dans cette revue (Bailly et al., 2008). Elle permet d'exprimer tout un groupe de gènes sous le contrôle d'un seul promoteur transcriptionnel appelé opérateur (Alpers and Tomkins, 1965). Le terme d'opéron a été proposé pour la première fois par Jacques Monod en 1960 dans un compte rendu de l'académie des sciences Francaise (Jacob et al., 1960). Il reçut d'ailleurs en 1965 un prix Nobel de Physiologie et de Médecine pour cette découverte avec François Jacob et André Michel Lwoff. On peut retrouver quelques ARN messagers polycistroniques chez des eucaryotes comme *C.elegans* ou la drosophile (Broгна and Ashburner, 1997; Spieth et al., 1993).



**Figure II-2**

L'interaction entre une séquence poly-histidine et la matrice Talon se fait grâce à l'établissement de liaisons de coordination autour d'un ion cobalt  $\text{Co}^{2+}$ . Cette coordination implique un groupement nitrilotriacétate fixé à la matrice et les noyaux imidazole des histidines. L'addition d'imidazole libre induit le décrochage de la poly-histidine par compétition.

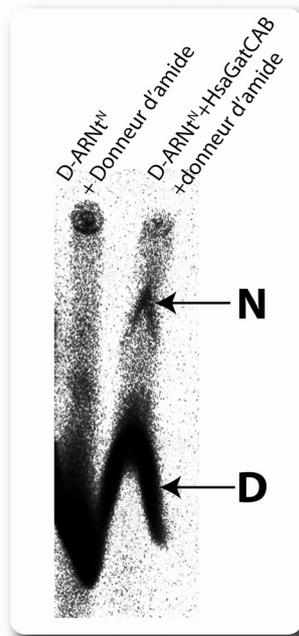
Après charge de l'extrait brut sur la colonne d'affinité, la matrice a été lavée avec un tampon contenant 25 mM d'imidazole identique à celui utilisé pour la purification de la GatFAB de levure, puis l'AdT humaine est éluée par addition du même tampon contenant cette fois-ci 100 mM d'imidazole. La **Figure II-3** montre le gel obtenu lors d'une purification de GatCAB humaine. Les protéines contenues dans les fractions d'élution contenant 100 mM d'imidazole, ont été dialysées contre le tampon sans imidazole et directement utilisées pour un test de transamidation dans des conditions rigoureusement identiques à celles décrites précédemment. (Frechin et al., 2009)



**Figure II-3**

Séparation par électrophorèse sur gel de polyacrilamide 12% en conditions dénaturantes des protéines contenues dans un aliquote de chacune des fractions de la purification de l'AdT GatCAB humaine. Les concentrations indiquées se réfèrent à l'imidazole.

Comme on peut le voir sur la **Figure II-4**, l'AdT GatCAB humaine est capable de transamider un aminoacyl-ARNt hétérologue mésacylé, en l'occurrence du D-ARNt<sup>N</sup> de *Thermus thermophilus*. En effet, comme je l'ai déjà indiqué auparavant, les AdT de type GatCAB sont double spécifiques et donc capables d'activer et de transamider du glutamate (E) en glutamine (Q) ou de l'aspartate (D) en asparagine (N) à condition que ces acides aminés soient fixés sur un ARNt<sup>Q ou N</sup> dont la première base est un U1-A72. Comme c'est la présence généralement la présence ou l'absence d'une asparaginyl-ARNt synthétase (NRS) et/ou d'une QRS qui permet de deviner la spécificité d'une AdT de type GatCAB (E-AdT ou D-AdT), je précise, qu'en l'occurrence, la mitochondrie humaine possède une asparaginyl-ARNt synthétase (NRS) mitochondriale bien identifiée par sa séquence d'adressage, ainsi qu'une DRS mitochondriale présumée discriminante, il est donc peu probable que la GatCAB humaine présente une activité Asp-AdT dans cet organite. Toutefois l'ARNt<sup>N</sup> mitochondrial possédant une paire de bases U1-A72 il est potentiellement transamidable si par hasard il était chargé avec du D.



**Figure II-4**

Test de transamidation du D-ARNt<sup>N</sup> de *T. thermophilus* en N-ARNt<sup>N</sup> catalysé par l'AdT GatCAB humaine. En présence de la GatCAB, de l'asparagine (N) est formée de manière ARNt-dépendante. Les conditions expérimentales sont décrites en détail dans la partie Méthodologique de la publication précédente (Frechin et al., 2009). Le principe de ce test d'activité est le suivant : du [<sup>14</sup>C]D est chargé sur de l'ARNt<sup>N</sup> de *T. thermophilus* grâce à la ND-DRS du même organisme, puis Le [<sup>14</sup>C]D-ARNt<sup>N</sup> est incubé en présence de l'AdT humaine, d'ATP et d'un donneur d'amide (généralement la glutamine). Après un temps variable d'incubation, les aminoacyl-ARNts ainsi que les ARNts non chargés sont précipités afin d'éliminer le [<sup>14</sup>C]D libre n'ayant pas servi lors de la réaction et le [<sup>14</sup>C]N libre qui pourrait avoir été formé par des traces d'asparagine synthétase contaminant notre préparation d'AdT. Les aminoacyl-ARNts sont déacylés en conditions alcalines puis le milieu réactionnel est neutralisé par addition de potasse, séché sous vide (Speed-Vac) repris dans un volume minimal d'eau desionisée et déposé sur une plaque de cellulose qui va servir de support à la chromatographie en couche mince. Un flux de solvant acide va ensuite séparer le [<sup>14</sup>C]D du [<sup>14</sup>C]N contenus dans le milieu réactionnel. Dans ces conditions, le [<sup>14</sup>C]N a un rapport d'affinité matrice/solvant plus élevé que celui du [<sup>14</sup>C]D et migre donc moins vite. L'image est ensuite révélée par exposition sur plaque photosensible (image plate) ou film d'autoradiographie et révélée par scanning dans un Phosporimager ou développement photographique. Sur cette image le sens de migration est du haut vers le bas.

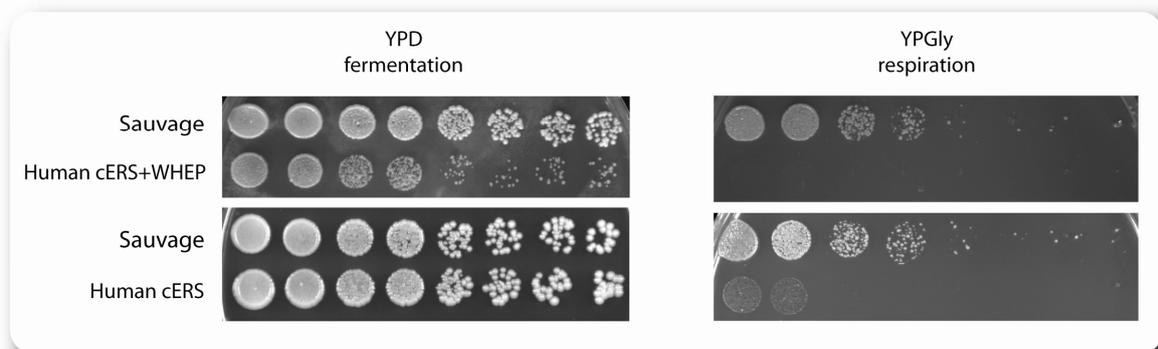
### **3. Remplacement de la ND-ERS de levure par l'ERS cytoplasmique humaine.**

Toujours dans l'optique de vérifier le plus rapidement possible si notre hypothèse selon laquelle l'ERS cytoplasmique humaine pourrait être importée dans la mitochondrie humaine et y jouer le rôle de ND-ERS pour la voie de transamidation, nous avons choisi de vérifier si cette ERS humaine pouvait fonctionnellement remplacer la ND-ERS de levure dans une souche de levure.

En d'autres termes, l'ERS cytoplasmique humaine est-elle importable dans les mitochondries de levure et peut-elle soutenir la croissance d'une levure en respiration utilisant ses mitochondries et requérant donc une voie de transamidation active ?

J'ai donc transformé la souche ND-ERS "shuffle" décrite dans (Frechin et al., 2009) avec deux plasmides différents qui nous ont été fournis par le Dr. Marc Mirande travaillant au LEBS à Gif-sur-Yvette. Ces plasmides de levure portent chacun une version modifiée de l'ERS humaine sans la partie prolyl-ARNt synthétase (l'ERS humaine fait normalement partie de l'enzyme bifonctionnelle EPRS). La première forme possède encore les trois domaines WHEP situés à la suite du C-terminal de l'ERS et qui, dans l'EPRS native, lient la partie ERS et PRS, la seconde forme est déléetée de ces domaines WHEP.

Nous avons obtenu deux souches différentes contenant chacune deux constructions : le plasmide de la ND-ERS endogène et le plasmide de l'ERS humaine avec ou sans domaine WHEP. Ces souches ont été mises en culture sur un milieu contenant du 5-fluoroorotate (5FOA). Le plasmide de la ND-ERS portant un gène de sélection dont le produit est une enzyme capable de transformer le 5FOA en un composé toxique, sur ce milieu seules les souches ayant "chassé" le plasmide de la ND-ERS vont pouvoir croître.



**Figure II-5**

Test de la capacité de croissance en fermentation (YPD) et respiration (YPGly) de souches de levure ayant remplacée la ND-ERS endogène par l'ERS cytoplasmique humaine avec ses trois domaines WHEP (Human cERS+WHEP) ou sans (Human cERS). Un phénotype "petite" typique apparaît dans le premier cas, montrant qu'il y a perte de l'activité mitochondriale, ce qui n'est pas le cas avec l'ERS humaine sans les domaines WHEP qui complémente la perte de la ND-ERS de levure.

La **Figure II-5** montre que les deux souches fonctionnant avec les ERS humaines sont capables de croître en fermentation, montrant que l'enzyme humaine peut assurer le rôle cytoplasmique de la ND-ERS de levure en formant le E-ARNt<sup>E</sup> cytoplasmique. Par contre, seule la souche possédant l'ERS cytoplasmique humaine sans les domaines WHEP est capable de respirer. Les conclusions que nous avons tirées de cette expérience sont que : *i*) l'ERS humaine est importable et importée dans la mitochondrie de levure, et *ii*) est capable d'assurer la première

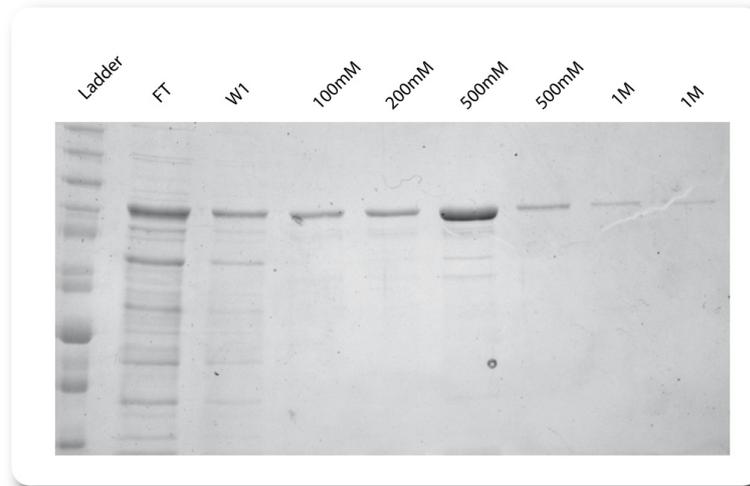
étape de la voie indirecte qui est la formation du E-ARNt<sup>Q</sup> mitochondrial. *iii*) Les domaines WHEP, en revanche, l'empêchent soit d'être importée soit d'aminocycler l'ARNt<sup>Q</sup> dans la mitochondrie.

Cette expérience de complémentation de fonction dans un environnement cellulaire hétérologue ne prouve pas que l'ERS humaine est importée dans la mitochondrie de l'Homme et qu'elle y assure le rôle de ND-ERS. En revanche, elle montre que l'ERS cytoplasmique peut potentiellement assurer le rôle de ND-ERS chez l'homme, elle possède toutes les caractéristiques structurales (séquence d'import) et fonctionnelles (charge d'un ARNt<sup>Q</sup> mitochondrial) nécessaires (Frechin et al., 2009). Néanmoins, il est absolument nécessaire de prouver que cette protéine est mitochondriale et non-discriminante dans le contexte natif humain. Cette vérification nécessite également d'identifier la forme sous laquelle cette ERS est importée, c'est-à-dire sans ou avec un, deux ou trois domaines WHEP, sous forme d'EPRS ou encore en complexe avec une autre protéine etc. Nous avons pu discuter avec le Pr. Paul Fox lors d'un séminaire à l'ibmc où il exposait ses derniers travaux sur le complexe GAIT. Il nous a alors indiqué l'existence d'un variant naturel de l'EPRS qui pourrait être la forme mitochondriale que nous recherchons.

#### **4. Expression et purification de la mini-EPRS humaine.**

Le gène de l'EPRS possède un site de poly-adénylation alternatif. Grâce à ce mécanisme, la cellule est capable de générer une version plus courte nommée mini-EPRS composée uniquement de la partie ERS ainsi que de deux domaines WHEP. Le Pr. Paul Fox nous a donc fait parvenir le plasmide pET28b-miniEPRS qui nous a permis d'obtenir l'enzyme sous forme recombinante fusionnée à une queue poly-histidine à son extrémité N-terminale. La production et la purification de cette enzyme se sont faites exactement dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la GatCAB humaine (expression à 18°C pendant la nuit). Il est intéressant de constater que les deux protéines humaines que j'ai purifiées sont mieux produites à 18°C sans choc thermique préalable. Il semble donc que le ralentissement de la vitesse de traduction, qui a probablement été induit par la baisse de température, permet de se rapprocher des conditions de traduction des eucaryotes supérieurs. En effet, la traduction eucaryotique est caractérisée par une vitesse d'élongation moyenne de 2 à 6 acides aminés

(aa) par seconde alors que cette vitesse est, en moyenne, de 20 à 25 aa/s chez les procaryotes (Forchhammer and Lindahl, 1971; Ross and Orłowski, 1982).



**Figure II-6**

Séparation par électrophorèse sur gel de polyacrilamide 12% en conditions dénaturantes des protéines contenues dans un aliquote de chacune des fractions de la purification de la mini-EPRS humaine. Les concentrations indiquées se réfèrent à la quantité d'imidazole.

## 5. perspectives

A ce stade de l'avancement de ce projet de recherche, l'équipe du Pr. Suzuki publiait, finalement, son travail sur la voie de formation du Q-ARNt<sup>Q</sup> mitochondrial humain au mois de septembre 2009 (Nagao et al., 2009). Le résultat réellement surprenant avancé par ce travail est que l'ERS mitochondriale humaine semblerait être la ND-ERS essentielle à la voie indirecte de formation du Q-ARNt<sup>Q</sup>. Le coeur du travail est de très grande qualité et démontre la présence et l'importance de la voie de transamidation dans la mitochondrie humaine en caractérisant clairement l'amidotransférase GatCAB et en montrant son activité et sa localisation subcellulaire. Cependant, la mise en évidence de l'activité ND-ERS de l'ERS mitochondriale est nettement moins convaincante. Les conditions expérimentales retranscrites dans la partie méthodologique de cet article attestent du fait que l'aminacylation de l'ARNt<sup>Q</sup> mitochondrial a été effectuée, *in vitro*, en présence d'une concentration d'ERS mitochondriale 100 fois supérieure à celle de l'ARNt qui se trouve dans le milieu réactionnel.

Comme nous l'avons indiqué lors du chapitre sur la spécificité des aminoacyl-ARNt synthétases (I.C.2.b)(3)), celles-ci font des erreurs, il est ainsi tout à fait possible de générer une activité de mésacylation *in vitro*, en se mettant dans des conditions qui n'ont aucune chance de se produire *in vivo*. En effet, on estime qu'un rapport "physiologique" entre aminoacyl-ARNt synthétase et ARNt se situe, au contraire, autour de 100 fois moins d'enzyme que d'ARNt à charger. Les conditions utilisées par Nagao et ses collègues sont donc équivalentes à un excès d'enzyme de 10000 fois par rapport aux conditions jugées comme étant proches des conditions physiologiques.

Ce rapport d'une enzyme pour 100 ARNt permet d'être dans des conditions de spécificité optimales et minimise également l'apport, lors de la réaction, de contaminants potentiels dont on ne s'affranchit jamais totalement lors de la purification d'une enzyme recombinante. En utilisant 10000 fois plus d'enzyme que ce qui est requis, Nagao et ses collègues augmentent d'autant la concentration de protéines contaminantes, favorisent une activité non spécifique de la synthétase et donc augmentent la probabilité d'aminoacyler leur ARNt avec le glutamate qui est de toutes façons le seul acide aminé utilisable dans le milieu réactionnel.

Ce constat, ainsi que toutes les expériences que j'ai menées jusqu'ici nous confortent dans l'hypothèse que l'ERS cytoplasmique humaine est importée dans la mitochondrie. Cette ERS, sous forme EPRS ou mini-EPRS, est capable *via* ses domaines WHEP de se fixer à p38 qui assure peut être un rôle similaire à celui d'Arc1p. Il est tentant de penser qu'une fois libre, l'ERS se relocalise dans la mitochondrie et augmente l'activité mitochondriale, pendant que p38 active p53 (nous avons vu cette particularité des protéines p38 et p18 dans le chapitre I.C.4.a)(3) lorsqu'elles ne font pas partie du complexe multi synthétasique) afin d'anticiper un stress oxydatif, *de facto*, plus élevé. Mais ce ne sont que mes hypothèses, qui restent à être testées expérimentalement.

Par manque de temps, je n'ai pas pu aller plus loin dans ce projet qui est maintenant poursuivi par Guillaume Octobre, un chercheur Post-Doctorant de notre équipe. Son projet se compose de deux objectifs principaux. Le premier sera de vérifier si l'ERS cytoplasmique est la ND-ERS mitochondriale. Pour cela, Guillaume a commencé à faire des tests *in vitro* d'import mitochondriaux, afin de vérifier si la mini-EPRS marquée radioactivement est capable d'être importée dans des mitochondries humaines fraîchement purifiées. Il va également falloir développer les outils nécessaires pour vérifier la fonction mitochondriale de l'ERS

cytoplasmique humaine en commençant par purifier l'ARNt<sup>Q</sup> mitochondrial humain ainsi que les ARNt<sup>Q</sup> et <sup>E</sup> cytoplasmiques et ARNt<sup>E</sup> mitochondrial, qui serviront de contrôle aux expériences d'aminacylation et de transamidation *in vitro*. Cette partie me semble vraiment être le facteur limitant du projet, car les quantités de cellules humaines à obtenir afin de produire assez d'ARNt total sont énormes, il ne faut pas moins de 10g de cellules humaines (~10<sup>4</sup> cm<sup>2</sup> de culture de cellules adhérentes) par purification d'après les deux préparations préliminaires d'ARNt total humain que j'ai effectuées à la fin de ma thèse.

Le deuxième axe de ce projet va consister à développer un système de "silencing" partiel de p38 dans les cellules humaines. En effet, nous aimerions voir si le fait d'augmenter le taux d'ERS cytoplasmique non fixée à p38, a un effet sur l'activité mitochondriale *via* l'augmentation de son import dans l'organite. Selon nos hypothèses, la diminution du taux de p38 devrait déplacer l'équilibre de fixation des domaines WHEP vers la protéine HSP90, qui est elle aussi capable de se fixer sur ces motifs (Kang et al., 2000). Cela pourrait induire une augmentation de l'import mitochondrial (Young et al., 2003) de l'ERS cytoplasmique et, pourquoi pas, doper l'activité de l'organite.

Si ces hypothèses semblent encore loin d'être vérifiées, les conclusions tirées de mon dernier projet concernant l'étude du rôle cellulaire du complexe AME (**A**rc1p/**M**RS/**E**RS) de levure semblent les accréditer.

En effet, nous allons voir que l'augmentation de la quantité de ND-ERS importée dans la mitochondrie de levure a un impact très important sur la production globale des sous-unités de la chaîne respiratoire codées dans le génome mitochondrial. Cet effet prend place dans un système plus global permettant à cet organisme de synchroniser son adaptation à la respiration.

## ***D. Les multiples fonctions d’Arc1p***

Nous avons mis en évidence le rôle d’Arc1p en tant qu’ancrage cytoplasmique chargée de moduler l’import mitochondrial de la glutamyl-ARNt synthétase (ND-ERS) cytoplasmique de levure. Ce constat a généré de multiples questionnements quant-à son rôle cellulaire. Au-delà de sa simple fonction de cofacteur de la méthionyl-ARNt synthétase (MRS) et de la ND-ERS, nous allons voir que Arc1p est une de ces protéines pivots qui, même si elles ne sont pas essentielles, sont garantes de la sophistication, de la complexité mais aussi de la flexibilité des mécanismes de la cellule.

Dans la revue qui suit, nous nous proposons de faire le bilan des caractéristiques structurales et fonctionnelles d’Arc1p, ainsi que de ses multiples liens avec d’autres fonctions. En effet, Arc1p est capable de se fixer sur des structures nucléotidiques spécifiques (Johnson et al., 2008), de reconnaître des dommages dans l’ADN (Rieger et al., 2006), Arc1p peut être phosphorylé (Mah et al., 2005), biotinylé (Kim et al., 2004), reconnaître des lipides (Fernandez-Murray and McMaster, 2006), participer au transport des ARN de transfert etc. Bref, Arc1p semble être un point de rencontre de multiples modules fonctionnels au cœur desquels son rôle n’est pas encore élucidé.



## Review

## Arc1p: Anchoring, routing, coordinating

Mathieu Frechin<sup>a</sup>, Daniel Kern<sup>a</sup>, Robert Pierre Martin<sup>b</sup>, Hubert Dominique Becker<sup>a,\*</sup>, Bruno Senger<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>UPR 9002 'Architecture et Réactivité de l'ARN', Université de Strasbourg, CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15 Rue René Descartes, F-67084 Strasbourg Cedex, France

<sup>b</sup>UMR 7156 'Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie', CNRS, Université de Strasbourg, Department of Molecular and Cellular Genetics, 21 Rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 29 September 2009  
Revised 9 November 2009  
Accepted 9 November 2009  
Available online 13 November 2009

Edited by Michael Ibba

## Keywords:

Dual localization  
Aminoacylation  
tRNA  
Mitochondria  
Metabolism  
*Saccharomyces cerevisiae*

## ABSTRACT

**Accurate synthesis of aminoacyl-tRNAs (aa-tRNA) by aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS) is an absolute requirement for errorless decoding of the genetic code and is studied since more than four decades. In all three kingdoms of life aaRSs are capable of assembling into multi-enzymatic complexes that are held together by auxiliary non-enzymatic factors, but the role of such macromolecular assemblies is still poorly understood. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Arc1p holds cytosolic methionyl-tRNA synthetase ( $\epsilon$ MRS) and glutamyl-tRNA synthetase ( $\epsilon$ ERS) together and plays an important role in fine tuning several cellular processes like aminoacylation, translation and carbon source adaptation.**

© 2009 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

In all living cells, protein synthesis represents an essential process that can be considered to be at the heart of life. While in prokaryotes all the steps necessary for translation of the genetic information occur in the same compartment, in eukaryotes, a lipid bi-layer surrounding the genetic material physically separates the site of transcription from that of translation. In eukaryotes there is a higher degree of complexity in cellular organization combined to higher gene content and to existence of compartmentalized genomes. This complexity is further increased by the presence of macromolecular assemblies or nanoparticles that cluster molecules usually functioning as individual catalysts in prokaryotic pathways. The decoding ribosome is in need of a continuous supply of aa-tRNAs that are produced by the attachment of the correct amino acid to the corresponding isoaccepting tRNA by the cognate aaRS. While in bacteria these enzymes are believed to mainly act as standalones, in mammals nine aaRS activities and three auxiliary non-catalytic factors (p43, p38 and p18) are engaged in a multi-aminoacyl-tRNA synthetase (MARS) complex [1] presumably only devoted to aa-tRNA production. Recently, such a MARS complex

has also been found in archaea [2,3]. However, the exact role of the MARS complex remains mysterious and it has been postulated that it is an anchoring platform for aaRSs capable of performing other tasks [4]. Indeed, throughout the years, it has become clear that aaRSs are capable of multitasking depending on several conditions, like their intracellular location or their association with third parties molecules (reviewed in [5]). Thus, aaRSs are multi-functional enzymes whose expanding repertoire of activities goes far beyond aa-tRNA production.

In this review we will focus on the MARS prototype that can be found in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and that is composed of three proteins, two cytosolic aaRSs,  $\epsilon$ MRS and  $\epsilon$ ERS, and one non-enzymatic factor, Arc1p, a homologue of human p43 auxiliary protein of the MARS complex [6]. This complex has been proposed to be dedicated to the production of aa-tRNAs in order to feed the translating ribosome. In the latter process, tRNA is a key player and has therefore been widely studied over the past four decades. From these studies arose very early the concept of tRNA channelling [7,8] supporting the idea that tRNA is handled over from one factor to another from the nucleolus, where tRNA is synthesized, to the cytoplasm, where tRNA is used in translation. Nevertheless, little is known about the tRNA channelling process itself albeit individual steps (transcription, modification, 3' and 5' trimming, splicing) of a tRNA lifecycle become more and more studied. Among these, the nuclear exit of tRNA through the nuclear pore complexes does not occur by simple diffusion although the size

\* Corresponding authors. Fax: +33 (0) 3 88 60 22 18.

E-mail addresses: [h.becker@ibmc.u-strasbg.fr](mailto:h.becker@ibmc.u-strasbg.fr) (H.D. Becker), [b.senger@ibmc.u-strasbg.fr](mailto:b.senger@ibmc.u-strasbg.fr) (B. Senger).

of a tRNA molecule would be compatible with such a process. Overall, the study of tRNA dynamics has led to the discovery of several factors important for tRNA trafficking (reviewed in [9]), among them Arc1p that will be analyzed in more details here.

## 2. Arc1p, a protein linked to the tRNA life cycle

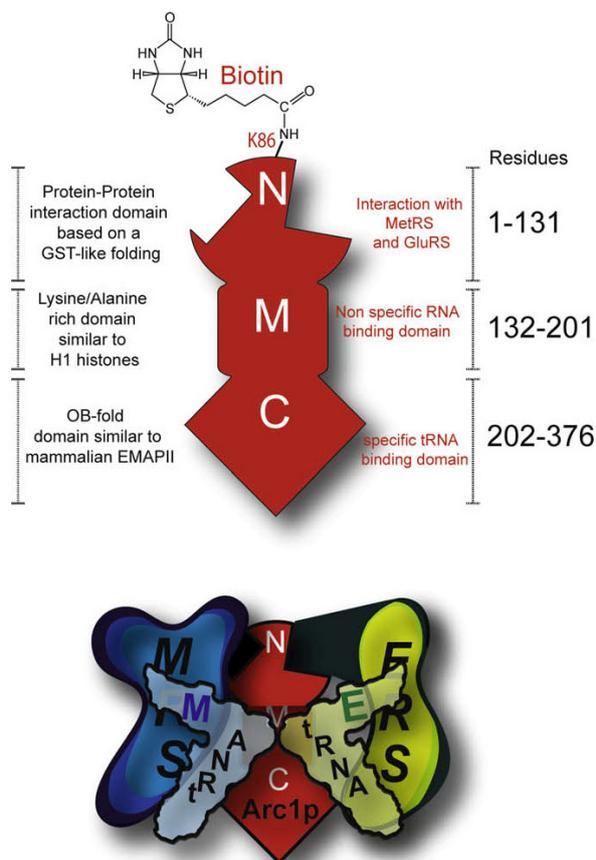
Nucleocytoplasmic exchanges represent crucial events during the eukaryotic life cycle, and a lot of efforts have been made to identify the constituents of nuclear pore complexes (NPC), especially in yeast. Starting from a thermosensitive (*ts*) allele of *NSP1*, an essential component of the NPC [10], it has been shown that combination of this mutation with another one lying in the *LOS1* gene is lethal thus demonstrating the existence of a genetic link, called synthetic lethality, between these two genes [11]. In other words, the functions of *Los1p* and *Nsp1p* are somehow overlapping or dependent on each other. At that time, *LOS1* was believed to be involved in tRNA biogenesis, since *los1-1* mutants are accumulating unspliced tRNAs inside the nucleus [12]. Nearly two decades later, its function as a tRNA transporter belonging to the importin  $\beta$  family of transport factors was definitively established [13]. Thus, it is easy to understand the synthetic relationship between *Los1p* and *Nsp1p* since the first is implicated in tRNA transport and the second is an essential member of the nuclear gate.

Subsequently, a second genetic screen searching for yeast strains that exhibit a synthetic lethality relationship to a *los1 null* mutant was performed [6]. The latter identified a gene that was named *ARC1* (aminoacyl-tRNA synthetase cofactor 1) and encoding an overall basic protein ( $pI = 8.99$ ) of 376 amino acids with a predicted molecular weight of 42 kDa. Arc1p can be divided into three domains (Fig. 1). First, a N-terminal domain (residues 1–131) that was originally described with little or no homology to known proteins. However, recently, the crystal structure of an N-terminal fragment of Arc1p (residues 1–122) revealed that it can adopt a GST-like fold [14]. Second, a central domain (residues 132–200) that is lysine-/alanine-rich and that displays sequence similarity to histones. Finally, the C-terminal domain presents homologies to human EMAPII (endothelial-monocyte-activating polypeptide II). The first half of this domain is also homologous to the C-terminus of prokaryotic MRS and to a lesser extend to the N-terminus of the  $\beta$  chain of phenylalanyl-tRNA synthetase.

In order to gain insight into Arc1p function, affinity purification with protein A tagged-Arc1p brought two closely migrating bands on SDS-PAGE. The analysis of the latter allowed identification of two cytosolic class I aaRSs,  $\epsilon$ MRS and  $\epsilon$ ERS, therefore demonstrating the existence of a small MARS-like complex, in yeast, that probably represents an evolutionary intermediate towards larger aaRS complexes [6]. The association of these enzymes with Arc1p enhances their catalytic activities by several orders of magnitude [6,15,16]. Although no physical interaction between *Los1p* and Arc1p could be detected, their functional link can be easily understood, thereby explaining the synthetic lethality observed between the *los1 null* mutant and an *arc1* mutant. Indeed, a defect in *Los1p* hinders tRNA export and when combined to a mutation in Arc1p that probably affects aa-tRNA production, the overall aa-tRNA production may be too weak to sustain cell growth. Thus, Arc1p not only creates a functional link between tRNA transport and aminoacylation but also modulates the enzymatic activities of both,  $\epsilon$ ERS and  $\epsilon$ MRS.

## 3. Arc1p, a cofactor for $\epsilon$ MRS and $\epsilon$ ERS

The finding that Arc1p can interact simultaneously with two cytoplasmic aaRSs,  $\epsilon$ MRS and  $\epsilon$ ERS, was intriguing since the existence, in yeast, of a complex resembling the mammalian MARS complex had never been described before.  $\epsilon$ MRS and  $\epsilon$ ERS are



**Fig. 1.** Schematic view of Arc1p and its corresponding complex. Upper part: Arc1p is composed of three distinct domains ranging from 1–131 (N-domain), 132–201 (M-domain) and 201–376 (C-domain). The biotinylation site at K86 is represented. Lower part: drawing representing the full Arc1p $\cdot$  $\epsilon$ MRS $\cdot$  $\epsilon$ ERS complex together with the cognate tRNAs.

responsible for the aminoacylation of their cognate tRNAs with the corresponding amino acid and the advantage of such a multi-synthetase organization became an essential question to answer and it was shown that the main purpose of this complex is to enhance the aminoacylation efficiency of both aaRSs for their cognate tRNAs [6,16]. Indeed, in the case of  $\epsilon$ MRS, the overall catalytic efficiency is increased by two orders of magnitude with a major effect on the  $K_m$  [6]. For  $\epsilon$ ERS, the overall efficiency is only stimulated by a factor of 10 with a better tRNA-binding affinity for the Arc1p- $\epsilon$ ERS complex as compared to  $\epsilon$ ERS alone [16]. Thus, Arc1p acts for both enzymes as a tRNA-attracting molecule thereby enhancing tRNA availability for these enzymes.

This tRNA-attracting capacity is explained by the specific structural organization of Arc1p. This protein is composed of three main domains called N (1–131), M (132–200) and C (201–376) dedicated respectively to protein-protein interaction (N) [17], non-specific RNA binding (M) and specific tRNA-binding domain (C) [6,17]; M- and C-domains forming together the TRBD (tRNA-binding domain) of Arc1p. The N-terminal part of Arc1p (1–131) is responsible for Arc1p $\cdot$  $\epsilon$ MRS $\cdot$  $\epsilon$ ERS complex formation. This N domain contains a Glutathion-S transferase (GST)-like fold shared by the N-terminus of Arc1p and the two aaRSs [14]. These GST-like folds mediate strong interactions between the N-terminal part of both aaRSs and Arc1p. The structure of Arc1p N-terminal domain

reveals that  $\epsilon$ ERS and  $\epsilon$ MRS binding domains on Arc1p are spatially distant but overlapping in the primary sequence [14,18,19]. The Arc1p•MetRS interaction resembles a classical GST homodimer [14] and shows a dissociation constant ( $K_d$ ) of 193 nM determined by surface plasmon resonance [19]. Specific point mutations, based on the crystallographic structure, show that Ala26 and Ser33 of Arc1p are essential for the complex formation [19].

In contrast,  $\epsilon$ ERS and Arc1p show a new type of interaction between two GST-like folds. These interactions are larger and may be mediated by at least three important residues on Arc1p namely Thr55, Arg100 and Tyr104 [19]. The related  $K_d$  is 53 nM indicating a more stable interaction between  $\epsilon$ ERS and Arc1p in accordance with the broader interaction surface as compared to the MetRS•Arc1p interface [14]. Moreover, it is interesting to notice that the N-terminus of each aaRS interacts more efficiently with Arc1p than the whole enzyme, indicating that the catalytic core of  $\epsilon$ MRS and  $\epsilon$ ERS induces certain instability in the protein–protein interaction.

The TRBD was defined on the basis of Arc1p deletions and tRNA-binding studies [17]. It is homologous to the mammalian protein EMAPII and is dedicated to RNA binding when Arc1p is free. In fact, early pull down and gel shift assays, coupled with gel filtration studies [6,17] showed that Arc1p alone is able to bind different types of RNAs like 5S RNA (weak binding), and to a subset of tRNA species [15]. However, when Arc1p is aaRS-bound, tRNA-binding specificity of the complex becomes restricted to tRNA<sup>Glu</sup> and tRNA<sup>Met</sup> [6]. This tRNA-binding capacity is ensured by the TRBD of Arc1p which is located both on the M (132–201) and C (201–376) domains of Arc1p [6], each of them showing a distinct function in the RNA binding capacity of the TRBD domain. The M part is a lysine/alanine-rich region similar in sequence to H1 histones. This part of the TRBD is a general and non-specific RNA binding domain [17] in which a high concentration of positive charges interacts with the phosphate backbone of RNAs. The C part is a tRNA-specific binding domain [17] displaying an OB fold architecture [18] that can be found in many tRNA-binding domains like the mammalian EMAPII or the bacterial trbp111 protein [20].

As mentioned above, when Arc1p is engaged in a complex with  $\epsilon$ MRS and/or  $\epsilon$ ERS, its specificity is restricted to tRNA<sup>Glu</sup> and tRNA<sup>Met</sup> binding. It seems that the TRBD of Arc1p works in tandem with the anticodon binding domain of the two aaRSs which, usually in aaRSs, is crucial for recognition and discrimination of the cognate tRNA [21]. Arc1p TRBD not only reinforces the specificity of aaRS•tRNA recognition but more importantly restricts binding of each aaRS to its cognate tRNA [15]. Resolution of the 3D-structure of the entire nanoparticle bound to the cognate tRNAs should give us some insights into how Arc1p operates this specificity and efficiency enhancement for both aaRSs. The model proposed by Simos and coworkers suggests that Arc1p stabilizes and delivers tRNAs to the aaRSs, by acting like a molecular bridge [17]. By doing so, Arc1p contributes to expose the two tRNAs in a conformation competent for efficient recognition by their cognate synthetase. This model explains the tRNA affinity enhancement for the two aaRSs but requires that the tRNA is primarily captured by Arc1p prior transfer onto  $\epsilon$ MRS and  $\epsilon$ ERS. Thus, Arc1p may not lose its general RNA binding capacity when complexed to  $\epsilon$ MRS and  $\epsilon$ ERS [15].

One possibility would be that upon binding to Arc1p,  $\epsilon$ ERS and  $\epsilon$ MRS could mask only the non-specific RNA binding part of the TRBD domain and, after initial RNA selection performed by  $\epsilon$ MRS and  $\epsilon$ ERS, Arc1p might stabilize the tRNA-aaRS interaction. It was observed that during formation of the Arc1p•MetRS complex the TRBD and  $\epsilon$ MRS are brought close to each other. This can be reproduced artificially by fusing the Arc1p TRBD to the catalytic core of  $\epsilon$ MRS (i.e. a N-terminally truncated  $\epsilon$ MRS). This chimeric protein was shown to fulfil all the functions of a native Arc1p• $\epsilon$ MRS complex [22], showing that the TRBD can readily be considered as a functional module to enhance tRNA aminoacylation.

This line of experiments raises a more general question: if the TRBD is, like in bacteria, fully efficient when fused to aaRSs, why evolution has led to the transfer of this TRBD domain from aaRSs to a trans-acting protein like Arc1p in higher organisms? One of the possibilities is that Arc1p plays other roles that require binding to RNA and alternatively, for yet unforeseen reasons, both  $\epsilon$ MRS and  $\epsilon$ ERS individual tRNA-binding capacities have to be weakened.

#### 4. Arc1p, a cytosolic anchoring platform for aaRSs

The functional relationship between *ARC1* and *LOS1* points at Arc1p being a cytosolic receptor for tRNAs before their delivery to  $\epsilon$ MRS and  $\epsilon$ ERS. Indeed, free Arc1p can bind a large variety of tRNAs but binding becomes restricted to tRNA<sup>Met</sup> and tRNA<sup>Glu</sup> upon recruitment of  $\epsilon$ MRS and  $\epsilon$ ERS into the heterotrimeric particle [15]. Thus, Arc1p might very likely be a key molecule of the “tRNA channel” that is certainly more complex than initially thought. Indeed, recent advances in the field of tRNA trafficking, has revealed a lot of surprises ranging from intra-nuclear tRNA aminoacylation to tRNA re-import inside the nucleus (reviewed in [9]). Overall, these studies show that the nucleocytoplasmic trajectory of tRNA is not unidirectional but can rather be bidirectional and that tRNA uses multiple tracks for these exchanges. The direction and pathway used for tRNA trafficking turns out to probably be influenced by multiple environmental conditions (nutrient availability, stress, etc.).

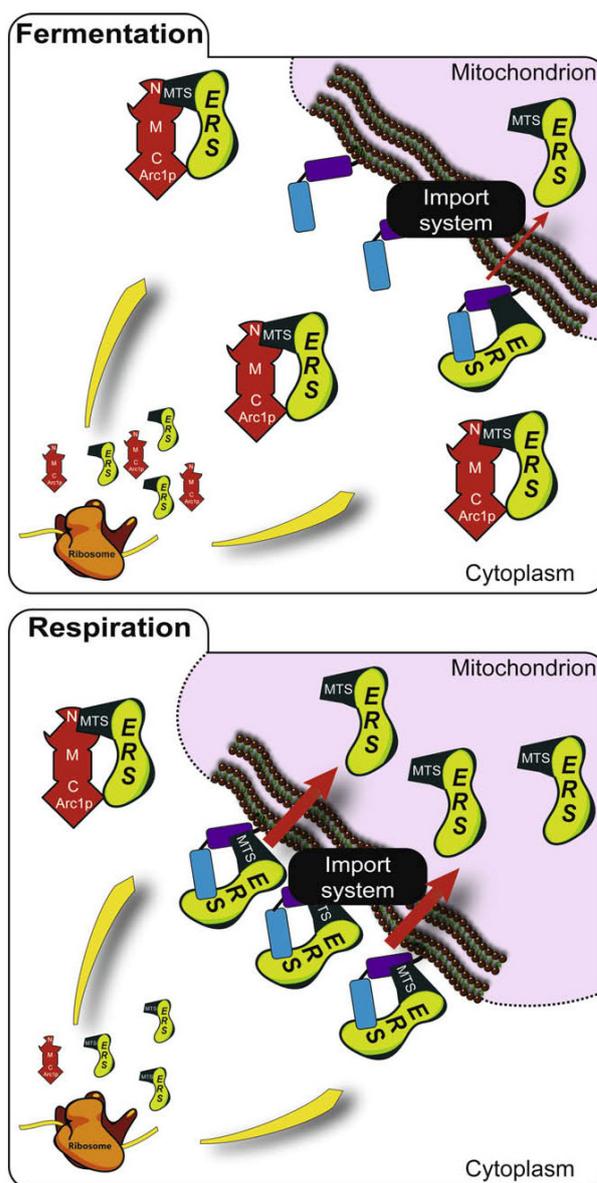
In addition to Arc1p, a protein named Cex1p, a possible functional homologue of Arc1p, has been shown to be involved in tRNA channelling from the NPC to the translational machinery [23]. On the nuclear side, another factor involved in tRNA trafficking named Utp8p is in charge of transferring tRNAs to the export receptors [24]. Thus, proteins like Arc1p, Cex1p and Utp8p that are distributed along the tRNA route and control the tRNA traffic could constitute cellular key switches for regulating the whole translational machinery. Indeed, although Arc1p is not an essential protein *per se*, it plays a crucial role in adaptation of yeast to the change of nutritional carbon source (see below).

Considering MARS complexes or the simplified yeast homologue, the exact function of these aaRSs assemblies remains mysterious and their exact composition might still be matter of debate. Indeed, one cannot exclude that *in vivo* they might contain more aaRSs and that some are lost during the purification procedure. With regard to their function, a recent work has shown that arginyl-tRNA<sup>Arg</sup> (R-tRNA<sup>R</sup>) produced by an arginyl-tRNA synthetase (RRS) sequestered in the MARS complex is a better substrate for protein synthesis than the same R-tRNA<sup>R</sup> synthesized by free RRS [25]. Nevertheless, this gives no extra clue concerning the role of the MARS complex. An interesting possibility comes from the growing number of atypical functions displayed by mammalian aaRSs (reviewed in [26]). Indeed, when they are member of the MARS complex, aaRSs are devoted to aa-tRNA production and, upon release from MARS, some have been shown to exert alternate roles suggesting that the MARS complex might be a retention platform for regulatory multi-functional proteins ([4,27]). Such non-conventional role has recently been unravelled for the bifunctional glutamyl-prolyl-tRNA synthetase (EPRS) that is implicated in the inflammatory response upon  $\gamma$ -interferon treatment [28].

Although the multi-synthetase complex is smaller in yeast than in higher eukaryotes, we have been able to show that, in this organism, the particle composed of  $\epsilon$ ERS,  $\epsilon$ MRS and Arc1p is also able to be dissociated in order to allow the release of individual components to fulfil other cellular tasks [29]. In yeast like in any other eukaryote the gene encoding mitochondrial glutamyl-tRNA synthetase ( $\epsilon$ mQRS) is always missing suggesting that, like in plants [30,31] mitochondrial glutamyl-tRNA<sup>Gln</sup> (Q-mtRNA<sup>Q</sup>) synthesis is

achieved via the transamidation pathway. Further evidences for the use of this pathway to form  $Q\text{-}_m\text{tRNA}^Q$  came from the identification of a yeast mitochondrial tRNA-dependent amidotransferase (AdT) able to convert misacylated mitochondrial glutamyl-tRNA<sup>Gln</sup> ( $E\text{-}_m\text{tRNA}^Q$ ) into  $Q\text{-}_m\text{tRNA}^Q$ . To our surprise while it had been shown by us and others that mitochondrial ERS ( $_m\text{ERS}$ ) is unable to produce the misacylated  $E\text{-}_m\text{tRNA}^Q$  substrate for the AdT [29,32], we could show that cytosolic ERS ( $_c\text{ERS}$ ) is the mitochondrial non-discriminating ERS that supplies the AdT with its mis-charged substrate. Under normal growth conditions, meaning when yeast uses fermentation to produce energy, only basal levels of mitochondrial activity are required and, therefore, most of the  $_c\text{ERS}$  is sequestered by the  $\text{Arc1p}\cdot\text{MRS}\cdot\text{ERS}$  particle. However, when yeast switches to the respiratory metabolism, we showed that expression of Arc1p is drastically reduced leading to release of both  $_c\text{MRS}$  and  $_c\text{ERS}$  that are redirected respectively to the nucleus and mitochondria (Fig. 2; [29]). In the case of  $_c\text{ERS}$ , its mitochondrial relocation can be easily understood since intense respiration by yeast cells requires high levels of mitochondrial activity and *de facto* translation. Thus, Arc1p, beside its function as an aaRS catalytic enhancer, acts as a cytosolic anchoring platform for  $_c\text{ERS}$  and probably, for  $_c\text{MRS}$  since the disruption of its interaction with Arc1p triggers its nuclear entry [19]. In fact, our work suggests that yeast  $_c\text{ERS}$  should rather be considered as a *bona fide* mitochondrial enzyme that requires binding to Arc1p to be kept in the cytoplasm. From these findings it is now clear that Arc1p is a multi-functional factor and that its primary function, in yeast, is to coordinate mitochondrial and cytosolic translation levels in response to the switch in nutritional carbon source (for a recent review on yeast metabolism adaptation see [33]).

The roles of the various domains of Arc1p have been elucidated using an array of deletion mutants. Using this strategy it was shown that the C-terminal domain of Arc1p or a partial N-terminally truncated mutant of Arc1p, both unable to bind  $_c\text{MRS}$  and  $_c\text{ERS}$ , relocate in the nucleus [18]. This means that Arc1p itself might have the potential to enter into the nucleus. However, the exact natural physiological conditions for which this nuclear relocation might happen have not yet been deciphered. One could imagine that, upon dissociation of the  $\text{Arc1p}\cdot\text{MRS}\cdot\text{ERS}$  particle, triggered by a yet unidentified signal, each individual component can reach the nucleus and could even reassemble inside the nucleus, although the existence of the  $\text{Arc1p}\cdot\text{MRS}\cdot\text{ERS}$  particle inside the nucleus has never been shown. If, nonetheless, this would be the case, the trimeric particle could serve, like any other aaRS that has been shown to be localized inside the nucleus, to proofread the integrity of matured tRNAs by aminoacylating them prior to their nuclear export. Because of its genetic relationship with Los1p, Arc1p is supposed to participate to the overall tRNA export process by capturing tRNAs that come out from the NPC. Its involvement in the nucleocytoplasmic export pathway of tRNA might even be more intricate since it has been shown that Arc1p is capable of actively shuttling between the nuclear and cytoplasmic compartments [34]. In fact, when fused to a strong nuclear localization signal (NLS), Arc1p remains in the cytosol but when turning off the Xpo1p export pathway (*xpo1-1* mutant) Arc1p-GFP-NLS is sequestered inside the nucleus. This finding could as well suggest that the entire  $\text{Arc1p}\cdot\text{MRS}\cdot\text{ERS}$  complex might be capable of shuttling between the nucleus and the cytoplasm although this hypothesis has not been envisaged by Simos and his colleagues, who alternatively showed that all individual components can do so. As mentioned above, it is still unknown what could trigger (totally or partially) dissociation of the cytosolic  $\text{Arc1p}\cdot\text{MRS}\cdot\text{ERS}$  particle to allow nuclear relocation of the three proteins. It has been shown that Arc1p can be biotinylated *in vivo* [35]. This post-translational modification could enable Arc1p shuttling and facilitate free tRNA export. Indeed, a *msn5Δ los1Δ* strain is still able



**Fig. 2.** Models for the role of Arc1p during fermentation or respiration. Fermentation panel (upper): When grown under fermentative conditions (e.g. on glucose media); Arc1p is abundant and  $_c\text{ERS}$  is sequestered in the cytosol. Basal amounts are maintained inside the mitochondria to ensure minimal organellar activity. Respiration panel (lower): when grown under respiratory conditions, yeast cells are in demand of high mitochondrial activity. Arc1p's expression is repressed and allows import of large amounts of  $_c\text{ERS}$  into the mitochondria to sustain the augmented need of organellar translation. For clarity,  $_c\text{MRS}$  is not represented here, but upon Arc1p repression, free  $_c\text{MRS}$  is believed to reach the nucleus.

to grow showing that at least a third route for tRNA export exists. However, one must also keep in mind that dissociation of the particle will release  $_c\text{MRS}$  and  $_c\text{ERS}$  in the cytoplasm and these enzymes will probably relocate to the nucleus and mitochondria respectively. The remaining question is then: "why and to what extent" will these enzymes relocate and what will be their new function in the alternative subcellular compartment? Indeed, the  $_c\text{ERS}$  level is drastically increased in the mitochondria of respiring yeast cells while that of Arc1p goes the opposite way in the cytoplasm [29]. Upon nuclear relocation of  $_c\text{MRS}$ , we speculate that this

enzyme fulfils alternative roles in the nucleus. Although the role of the mitochondrial relocation of  $\epsilon$ ERS seems to be clearly understood, that of its weak nuclear localization observed earlier [18] remains unanswered. Overall, Arc1p is more than an aaRS cofactor and it seems to occupy a strategic position at crossroads of several biological pathways like aminoacylation, translation and carbon source adaptation.

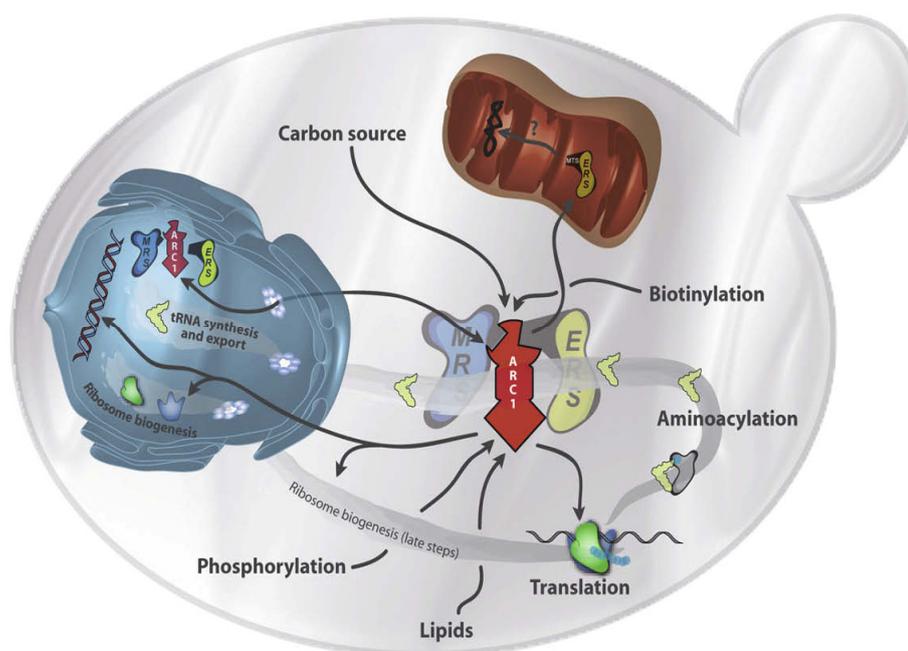
### 5. Arc1p a protein found in multiple cellular pathways

Although Arc1p is not encoded by an essential gene, it interacts with essential ones and might influence or regulate their activity, thus readily acting as a molecular coordinator of various machineries (e.g. cytosolic vs. mitochondrial translation). We have already seen that Arc1p plays an important role in aminoacylation and most probably in tRNA export from the nucleus but also in the adaptation of the cell during the switch from fermentative to respiratory metabolism (Fig. 3). Identification of Arc1p as being a target of the biotin ligase Bpl1p, biotinylating Arc1p at position Lys 86 is of particular interest [35]. Indeed, affinity purification of biotinylated Arc1p from yeast reveals a single band on SDS-PAGE thereby indicating that upon modification Arc1p can no longer bind to  $\epsilon$ MRS and  $\epsilon$ ERS. Nevertheless, biotinylated or not, no gain or loss of function was observed so far for Arc1p, leaving the role of biotin attachment mysterious [35]. This is in complete accordance with our model of functioning for Arc1p, with respect to yeast metabolic adaptation, and we speculate that biotinylation of Arc1p could be used to trigger the release of  $\epsilon$ ERS (and/or  $\epsilon$ MRS) when yeast cells switch from fermentation to respiration in order to provide a quick response for the need to enhance mitochondrial translation. Indeed,  $\epsilon$ ERS that is sequestered in the cytosol via its interaction with Arc1p may be a limiting component of the mitochondrial translation apparatus. Thus, biotinylation of Arc1p may be followed by repression of Arc1p pro-

duction that could constitute a response for long-term adaptation. More recently, it has been proposed that Arc1p may be involved in a biotin sensing mechanism [36]. Overall, the finding that a protein like Arc1p can be biotinylated (Fig. 3) is somewhat surprising since the main targets of this modification are biotin-dependent enzymes used mainly for carboxylation and decarboxylation reactions (reviewed in [37]).

Arc1p is a factor with protein and nucleic acid binding capacities that has also been identified for its ability to associate with G-quadruplexes (G4) [38]. Although Arc1p was found in association with  $\epsilon$ ERS in these experiments, all biochemical proofs for G4 binding were performed with free recombinant Arc1p suggesting the idea that this property is due to Arc1p alone. G-quadruplexes are likely to be formed in regions that are G-rich and are thought to be implicated in telomere maintenance, transcriptional regulation and ribosome biogenesis (reviewed in [39]). These observations further imply that Arc1p is able to reach the nucleus in order to bind such structures which are in agreement with the findings described above and that show that Arc1p is able to enter the nucleus. What would be the function or the consequence of Arc1p binding to G-quadruplexes? Although these questions have been raised [38], they remain, so far, unanswered.

Another possible nucleic acid interacting with either Arc1p or  $\epsilon$ ERS, is genomic DNA, since Arc1p and  $\epsilon$ ERS have been found to associate with apurinic/apyrimidic sites of damaged DNA [40]. It is not clear if this interaction occurs when both proteins form a complex or if each of them has this capacity. The authors of this work have shown it for  $\epsilon$ ERS and we can only speculate about such a binding for Arc1p. Nevertheless, it is plausible for Arc1p too, considering that it possesses a general nucleic acid binding domain. Altogether, these data again reinforce the possibility that both Arc1p and  $\epsilon$ ERS can enter the nucleus to exert a function that is unrelated to protein synthesis, thereby increasing their functional repertoire. It is tempting to speculate that  $\epsilon$ ERS would also



**Fig. 3.** Arc1p is at crossroads of many pathways. Arc1p can be subjected to phosphorylation or biotinylation. This may trigger its dissociation from  $\epsilon$ ERS and  $\epsilon$ MRS and allow some or all individual components to reach the nucleus. Once there, it may bind to genomic DNA lesions (as could  $\epsilon$ ERS upon import inside the mitochondria) in addition to a role in tRNA export. Arc1p may influence the synthesis of ribosomes by having a potential role as a chaperone. The carbon source – regulated expression of Arc1p also allows the relocation of  $\epsilon$ ERS and  $\epsilon$ MRS. Finally, the lipid binding capacity of Arc1p is represented.

be capable of such a function in the highly mutagenic context of mitochondria.

Among the molecules able to bind Arc1p are phospholipids [41] that are constituents of the membranes delimiting cellular compartments or entire cells. Moreover, phospholipids are also known to act as signalling molecules or to modulate the activity of membrane-bound proteins. Therefore, alteration in lipid composition of membranes may influence numerous cellular processes. How is Arc1p connected to phospholipids and how could it influence other cellular pathways is largely unknown.

Such observations also denote the complexity of the interconnections that exist between different cellular pathways. Indeed, sterol biosynthesis and isopentenylolation of adenines within tRNAs use a common intermediate, dimethylallyl pyrophosphate, therefore linking a key player of translation to sterol metabolism. It has been shown that disrupting the balance in the enzymes that use dimethylallyl pyrophosphate by altering the intracellular distribution of Mod5p, the enzyme that catalyzes the synthesis of i<sup>6</sup>A in tRNAs, affects translation by influencing non-sense suppression activity of tRNAs. In a search for suppressors of such a phenotype, Arc1p was selected as a candidate [42]. However, no clear answer could be found with regard to a potential role of Arc1p.

Finally, Arc1p has also been identified in a screen looking for suppressors of subunits of the Cct chaperonin complex that is involved in folding various proteins including ribosomal proteins [43]. Although Arc1p does not seem to have any chaperone activity, it interacts with several components of the translational machinery leaving it conceivable that it could palliate a slight defect of some of them. Another, yet unclear, implication of Arc1p would be in the mitotic exit network since Arc1p has been found as a potential target of the Dbf2-Mob1 kinase complex [44]. Could this mean that Arc1p might be involved in tuning translational activity when cells divide?

## 6. Concluding remarks

Since its initial discovery 14 years ago as a G-quadruplex-binding protein, the proposed functional repertoire of Arc1p has significantly expanded mainly during the past five years (Fig. 3). Nevertheless, its ability to bind simultaneously  $\rho$ MRS and  $\rho$ ERS to form a mini-MARS complex is a major finding for the elucidation of some of its functions. Moreover, the genetic interaction with *LOS1* combined to its general tRNA-binding capacity creates a direct link between tRNA export and aminoacylation. When, at the beginning of this millennium, it became clear that aminoacylation can take place inside the nucleus, the intracellular location of the individual components has been more carefully investigated showing that they are more dynamic than initially thought, although most of the alternate locations observed are poorly understood at the functional level. However, it became clear that Arc1p constitutes a cytosolic retention platform for  $\rho$ MRS and  $\rho$ ERS that is itself regulated as a function of the carbohydrate used by the yeast cell to produce energy. This creates an unexpected but very important link between metabolism and protein synthesis since it allows to coordinate both the cytoplasmic and organellar translational machineries.

Arc1p can be subjected to post-translational modifications like biotinylation and/or phosphorylation therefore placing it at crossroads of various cellular paths. Having its dynamic localization in mind, it is plausible that various partners of Arc1p may be selected upon a given type of post-translational modification and that intracellular relocation of Arc1p then participates in the expression of some of its alternate functions. Thus, our knowledge concerning Arc1p may only represent the tip of the iceberg and underlines the fact nowadays integrated biological approaches are absolutely

required to get a clear and complete picture of a protein's function(s). This may lead to a better understanding of how several molecular circuits are interconnected and will allow the emergence of a complete view, at the molecular level, of the networks governing a cell's life cycle.

## Acknowledgements

This work was supported by the University of Strasbourg, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-09-BLAN-0091-02) and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). M. Frechin holds a fellowship from the Association Française contre les Myopathies (AFM).

## References

- [1] Kaminska, M., Havrylenko, S., Decottignies, P., Gillet, S., Le Marechal, P., Negrutskii, B. and Mirande, M. (2009) Dissection of the structural organization of the aminoacyl-tRNA synthetase complex. *J. Biol. Chem.* 284, 6053–6060.
- [2] Praetorius-Ibba, M., Rogers, T.E., Samson, R., Kelman, Z. and Ibba, M. (2005) Association between archaeal prolyl- and leucyl-tRNA synthetases enhances tRNA(Pro) aminoacylation. *J. Biol. Chem.* 280, 26099–26104.
- [3] Praetorius-Ibba, M., Hausmann, C.D., Paras, M., Rogers, T.E. and Ibba, M. (2007) Functional association between three archaeal aminoacyl-tRNA synthetases. *J. Biol. Chem.* 282, 3680–3687.
- [4] Ray, P.S., Arif, A. and Fox, P.L. (2007) Macromolecular complexes as depots for releasable regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.* 32, 158–164.
- [5] Hausmann, C.D. and Ibba, M. (2008) Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: Molecular multitasking revealed. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 705–721.
- [6] Simos, G., Segref, A., Fasiolo, F., Hellmuth, K., Shevchenko, A., Mann, M. and Hurt, E.C. (1996) The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases. *EMBO J.* 15, 5437–5448.
- [7] Deutscher, M.P. (1974) Aminoacyl-tRNA synthetase complex from rat liver. *Methods Enzymol.* 29, 577–583.
- [8] Negrutskii, B.S., Stapulionis, R. and Deutscher, M.P. (1994) Supramolecular organization of the mammalian translation system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 964–968.
- [9] Hopper, A.K. and Shaheen, H.H. (2008) A decade of surprises for tRNA nuclear-cytoplasmic dynamics. *Trends Cell Biol.* 18, 98–104.
- [10] Hurt, E.C. (1988) A novel nucleoskeletal-like protein located at the nuclear periphery is required for the life cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 7, 4323–4334.
- [11] Simos, G., Tekotte, H., Grosjean, H., Segref, A., Sharma, K., Tollervey, D. and Hurt, E.C. (1996) Nuclear pore proteins are involved in the biogenesis of functional tRNA. *EMBO J.* 15, 2270–2284.
- [12] Hopper, A.K., Schultz, L.D. and Shapiro, R.A. (1980) Processing of intervening sequences: A new yeast mutant which fails to excise intervening sequences from precursor tRNAs. *Cell* 19, 741–751.
- [13] Hellmuth, K., Lau, D.M., Bischoff, F.R., Kunzler, M., Hurt, E. and Simos, G. (1998) Yeast *Los1p* has properties of an exportin-like nucleocytoplasmic transport factor for tRNA. *Mol. Cell Biol.* 18, 6374–6386.
- [14] Simader, H., Hothorn, M., Kohler, C., Basquin, J., Simos, G. and Suck, D. (2006) Structural basis of yeast aminoacyl-tRNA synthetase complex formation revealed by crystal structures of two binary sub-complexes. *Nucleic Acids Res.* 34, 3968–3979.
- [15] Deinert, K., Fasiolo, F., Hurt, E.C. and Simos, G. (2001) Arc1p organizes the yeast aminoacyl-tRNA synthetase complex and stabilizes its interaction with the cognate tRNAs. *J. Biol. Chem.* 276, 6000–6008.
- [16] Graindorge, J.S., Senger, B., Tritch, D., Simos, G. and Fasiolo, F. (2005) Role of Arc1p in the modulation of yeast glutamyl-tRNA synthetase activity. *Biochemistry* 44, 1344–1352.
- [17] Simos, G., Sauer, A., Fasiolo, F. and Hurt, E.C. (1998) A conserved domain within Arc1p delivers tRNA to aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol. Cell* 1, 235–242.
- [18] Galani, K., Grosshans, H., Deinert, K., Hurt, E.C. and Simos, G. (2001) The intracellular location of two aminoacyl-tRNA synthetases depends on complex formation with Arc1p. *EMBO J.* 20, 6889–6898.
- [19] Karanasios, E., Simader, H., Panayotou, G., Suck, D. and Simos, G. (2007) Molecular determinants of the yeast Arc1p-aminoacyl-tRNA synthetase complex assembly. *J. Mol. Biol.* 374, 1077–1090.
- [20] Swairjo, M.A., Morales, A.J., Wang, C.C., Ortiz, A.R. and Schimmel, P. (2000) Crystal structure of trbp111: A structure-specific tRNA-binding protein. *EMBO J.* 19, 6287–6298.
- [21] Ibba, M. and Soll, D. (2000) Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 617–650.
- [22] Karanasios, E., Boletti, H. and Simos, G. (2008) Incorporation of the Arc1p tRNA-binding domain to the catalytic core of MetRS can functionally replace the yeast Arc1p-MetRS complex. *J. Mol. Biol.* 381, 763–771.

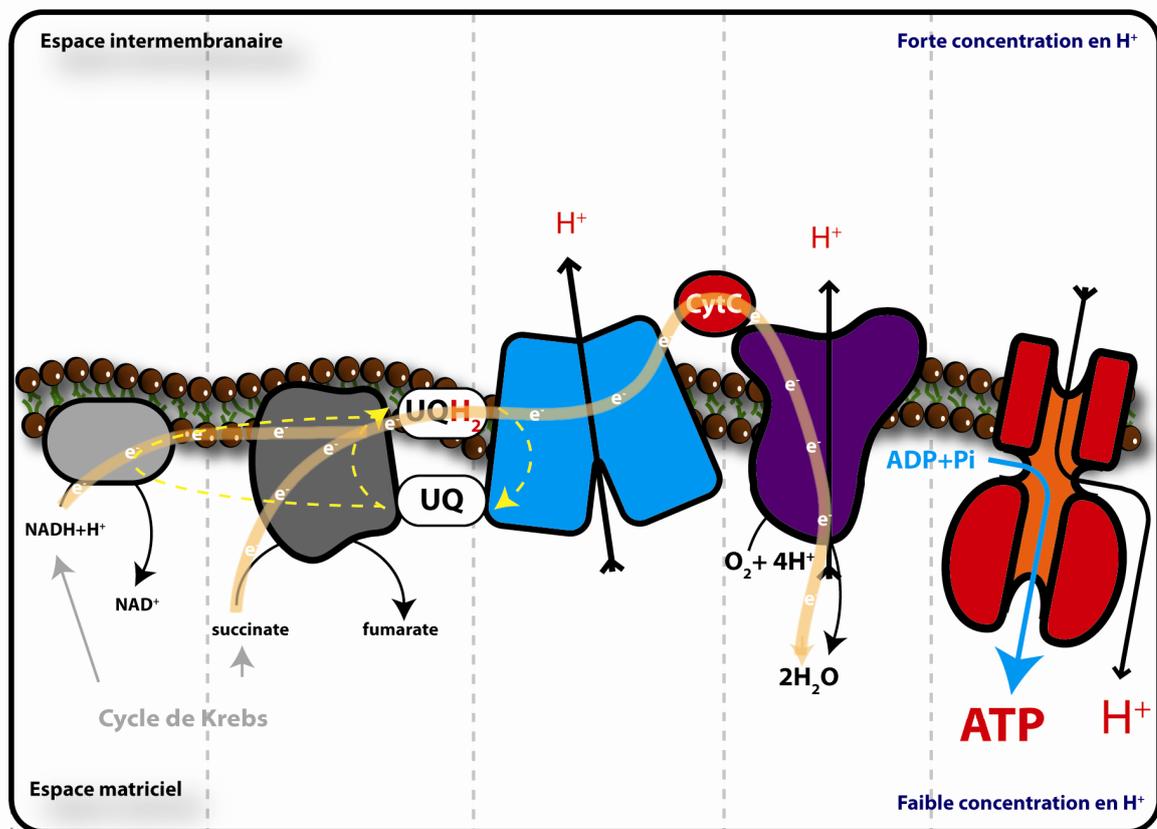
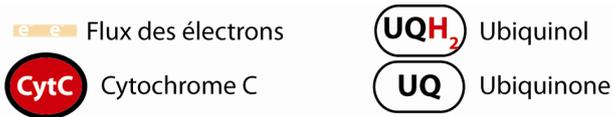
- [23] McGuire, A.T. and Mangroo, D. (2007) Cex1p is a novel cytoplasmic component of the *Saccharomyces cerevisiae* nuclear tRNA export machinery. *EMBO J.* 26, 288–300.
- [24] Strub, B.R., Eswara, M.B., Pierce, J.B. and Mangroo, D. (2007) Utp8p is a nucleolar tRNA-binding protein that forms a complex with components of the nuclear tRNA export machinery in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 18, 3845–3859.
- [25] Kyriacou, S.V. and Deutscher, M.P. (2008) An important role for the multi-enzyme aminoacyl-tRNA synthetase complex in mammalian translation and cell growth. *Mol. Cell* 29, 419–427.
- [26] Park, S.G., Schimmel, P. and Kim, S. (2008) Aminoacyl tRNA synthetases and their connections to disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 11043–11049.
- [27] Park, S.G., Ewalt, K.L. and Kim, S. (2005) Functional expansion of aminoacyl-tRNA synthetases and their interacting factors: new perspectives on housekeepers. *Trends Biochem. Sci.* 30, 569–574.
- [28] Arif, A., Jia, J., Mukhopadhyay, R., Willard, B., Kinter, M. and Fox, P.L. (2009) Two site phosphorylation of EPRS coordinates multimodal regulation of noncanonical translational control activity. *Mol. Cell* 35, 164–180.
- [29] Frechin, M., Senger, B., Bray, M., Kern, D., Martin, R.P. and Becker, H.D. (2009) Yeast mitochondrial Gln-tRNA(Gln) is generated by a GatFAB-mediated transamidation pathway involving Arc1p-controlled subcellular sorting of cytosolic GluRS. *Genes Dev.* 23, 1119–1130.
- [30] Schon, A., Kannangara, C.G., Gough, S. and Soll, D. (1988) Protein biosynthesis in organelles requires misaminoacylation of tRNA. *Nature* 331, 187–190.
- [31] Pujol, C., Bailly, M., Kern, D., Marechal-Drouard, L., Becker, H. and Duchene, A.M. (2008) Dual-targeted tRNA-dependent amidotransferase ensures both mitochondrial and chloroplastic Gln-tRNA(Gln) synthesis in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 6481–6485.
- [32] Rinehart, J., Krett, B., Rubio, M.A., Alfonzo, J.D. and Soll, D. (2005) *Saccharomyces cerevisiae* imports the cytosolic pathway for Gln-tRNA synthesis into the mitochondrion. *Genes Dev.* 19, 583–592.
- [33] Zaman, S., Lippman, S.I., Zhao, X. and Broach, J.R. (2008) How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu. Rev. Genet.* 42, 27–81.
- [34] Galani, K., Hurt, E. and Simos, G. (2005) The tRNA aminoacylation co-factor Arc1p is excluded from the nucleus by an Xpo1p-dependent mechanism. *FEBS Lett.* 579, 969–975.
- [35] Kim, H.S., Hoja, U., Stolz, J., Sauer, G. and Schweizer, E. (2004) Identification of the tRNA-binding protein Arc1p as a novel target of in vivo biotinylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279, 42445–42452.
- [36] Pirner, H.M. and Stolz, J. (2006) Biotin sensing in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by a conserved DNA element and requires the activity of biotin-protein ligase. *J. Biol. Chem.* 281, 12381–12389.
- [37] Beckett, D. (2007) Biotin sensing: universal influence of biotin status on transcription. *Annu. Rev. Genet.* 41, 443–464.
- [38] Frantz, J.D. and Gilbert, W. (1995) A novel yeast gene product, G4p1, with a specific affinity for quadruplex nucleic acids. *J. Biol. Chem.* 270, 20692–20697.
- [39] Johnson, J.E., Smith, J.S., Kozak, M.L. and Johnson, F.B. (2008) In vivo veritas: using yeast to probe the biological functions of G-quadruplexes. *Biochimie* 90, 1250–1263.
- [40] Rieger, R.A., Zaika, E.I., Xie, W., Johnson, F., Grollman, A.P., Iden, C.R. and Zharkov, D.O. (2006) Proteomic approach to identification of proteins reactive for abasic sites in DNA. *Mol. Cell Proteomics* 5, 858–867.
- [41] Fernandez-Murray, J.P. and McMaster, C.R. (2006) Identification of novel phospholipid binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 580, 82–86.
- [42] Benko, A.L., Vaduva, G., Martin, N.C. and Hopper, A.K. (2000) Competition between a sterol biosynthetic enzyme and tRNA modification in addition to changes in the protein synthesis machinery causes altered nonsense suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 61–66.
- [43] Kabir, M.A. and Sherman, F. (2008) Overexpressed ribosomal proteins suppress defective chaperonins in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 8, 1236–1244.
- [44] Mah, A.S., Elia, A.E., Devgan, G., Ptacek, J., Schutkowski, M., Snyder, M., Yaffe, M.B. and Deshaies, R.J. (2005) Substrate specificity analysis of protein kinase complex Dbf2-Mob1 by peptide library and proteome array screening. *BMC Biochem.* 6, 22.

## ***E. Le role de Arc1p dans l'adaptation de la levure à la respiration***

Un des points les plus intéressants soulevés par l'étude de la voie de formation du glutaminyl-ARNt<sup>glutamine</sup> (Q-ARNt<sup>Q</sup>) dans la mitochondrie de levure, est le lien entre l'import de la glutamyl-ARNt synthétase cytoplasmique non-discriminante (ND-ERS) et l'adaptation à la respiration. En effet, nous avons montré qu'Arc1p diminue lorsque la levure s'adapte à la respiration et, que cette diminution provoque une relocalisation plus importante de ND-ERS cytoplasmique dans la mitochondrie. Pourquoi la levure a-t-elle mis en place un mécanisme de ce type (et vraisemblablement tous les eucaryotes) ? Quel est l'intérêt de contrôler l'aminocacylation et donc la traduction dans la mitochondrie ? Et surtout, dans quelles conditions et par quels moyens la cellule contrôle-t-elle la quantité d'Arc1p synthétisée ? Ce sont ces questions auxquelles nous avons essayé de répondre. Le travail qui va suivre est le résumé des 18 derniers mois de ma thèse ainsi que le témoin de ma volonté à essayer d'intégrer l'aminocacylation dans le contexte plus large de l'adaptation métabolique et des voies de signalisation. Il me semble devoir ici remercier toutes les personnes qui ont travaillé avec moi sur ce projet, tout particulièrement Hubert et Robert, sans oublier Bruno, qui ont su me cadrer, m'épauler et trouver de l'intérêt dans cette réorientation. En effet, ce projet intègre de nouveaux thèmes comme les voies de signalisation reliées au métabolisme et la biogénèse de la chaîne respiratoire. Cela a donc demandé à tout le monde de s'éloigner de sa zone de confort!

La grande majorité des protéines présentes dans la mitochondrie sont synthétisées dans le cytoplasme puis importées. Les fonctions que ces protéines assurent ne sont donc pas touchées par une modification de la traduction mitochondriale, qui ne concernera que les gènes transcrits puis traduits *in organello*.

Ces gènes sont ceux portés par le génome mitochondrial, qui sont tous dédiés à la mise en place et au maintien de la chaîne respiratoire (Figure II-7). Chez la levure par exemple, les 18 protéines mitochondriales participent au maintien du génome, au contrôle de la transcription, et de la traduction des composants essentiels de la chaîne respiratoire (Figure II-8). Ainsi, directement ou indirectement, toute l'information contenue et exprimée dans la mitochondrie va servir finalement à assurer le fonctionnement du mécanisme de la respiration.



	<b>NADH oxydase</b>	<b>Fumarate réductase</b>	<b>Cytochrome bc1 (ubiquinol-cytochrome-c reductase)</b>	<b>Cytochrome c oxydase</b>	<b>ATP synthase</b>	
Sous-unités codées dans la mitochondrie	aucune	aucune	COB	COX1 COX2 COX3	ATP6 ATP8 OLI1	7
Sous-unités codées dans le noyau	NDI1	EMI5 SDH1 SDH2 SDH3 SDH4	RIP1 COR1 QCR2 QCR6 QCR7 QCR8 QCR9 QCR10	COX4 COX5A COX5B COX6 COX7 COX8 COX9 COX12 COX13	ATP1 ATP2 ATP3 ATP4 ATP5 ATP7 ATP14 ATP15 ATP16	ATP17 ATP18 ATP19 ATP20 ATP21 38
				← CYT1 →		

Figure II-7

## Légende de la Figure II-7

Schéma du fonctionnement et de la composition de la chaîne respiratoire de levure, la NADH oxydase ainsi que la fumarate réductase transfèrent les électrons en provenance de leurs substrats respectifs sur l'ubiquinone (chez la levure la NADH oxydase n'est pas une pompe à protons).

La forme réduite ubiquinol transite alors vers le cytochrome bc1 où ses électrons sont transférés sur le cytochrome C. Celui-ci est ensuite oxydé au niveau du complexe cytochrome c oxydase et qui transfère les électrons sur de l'oxygène pour former de l'eau. Ce flux d'électrons permet un pompage de proton  $H^+$  de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire, ce qui crée un potentiel de membrane utilisé par l'ATP synthase pour former de l'ATP. En effet le retour des protons à travers le canal de ce complexe transmembranaire induit des changements conformationnels permettant d'établir une liaison phosphate riche en énergie entre l'ADP et un phosphate inorganique (Pi).

On dit ainsi, que l'oxydation des composés provenant du cycle de Krebs (NADH, fumarate et FADH<sub>2</sub>) sont "couplés" à la phosphorylation de l'ADP en ATP grâce au flux d'électrons et au gradient de protons qui en résulte. L'étape critique de ce mécanisme se situe au niveau du cytochrome bc1 (Zara et al., 2009) au niveau duquel une quantité non négligeable d'électrons peuvent "s'échapper" et créer des radicaux libres (Muller et al., 2004). Cette fuite a lieu lors du transfert des électrons de l'ubiquinol vers le cytochrome c vraisemblablement au niveau de la sous-unité COB ou cytochrome b. Il est donc essentiel que la stoechiométrie existant entre cette protéine et les autres partenaires du complexe cytochrome bc1 soit respectée et maintenue (Yin et al., 2010).

Protéine	Fonction	références
COB	Cytochrome b1 Sous-unité catalytique du complexe cytochrome bc1 ou complexe III Permet le transfert des électrons de l'ubiquinol sur le cytochrome C	Hunte et al. (2003) Zara et al. (2009)
COX1	Cytochrome c oxydase 1 Première sous-unité mito. de la cytochrome c oxydase ou complexe IV. Son hème CuB permet un couplage entre la réduction de l'oxygène en eau et le transfert d'électron	Saraste et al. (1994) Tsukihara et al. (1996)
COX2	Cytochrome c oxydase 2 Deuxième sous-unité mito. de la cytochrome c oxydase Permet le transfert des électrons du cytochrome c vers l'oxygène	
COX3	Cytochrome c oxydase 3 Troisième sous-unité mito. de la cytochrome c oxydase Protéine transmembranaire, rôle identique à celui de COX2	
ATP6 ATP8 OLI1	Les trois sous unités mitochondriales de l'ATP synthase impliquées dans la formation de la partie transmembranaire du canal à proton	Boyer et al. (1997) Rak et al. (2009)
A11 A12	Réverses transcriptases essentielles pour l'épissage de COX1. Codées dans les introns de groupe 2 du gène de COX1.	Kennell et al. 1993
A13 A14 A15a A15b	Toutes trois sont des Endonucléase. Codées dans les introns de groupe 1 du gène de COX1.  Codé dans un intron de groupe 1 du gène de COX1. Fonction inconnue	Guo et al. (1995) Wernette et al. (1990) Seraphin et al. (1992)
B12 B13 B14	Toutes trois sont des maturases de l'ARNm de COB, codées aux interfaces exon-intron de ce même ARNm	Lazowska et al. (1989) Rho and Martinis (2000) Szczepanek et al. (2000)
SCE1	Endonuclease à ADN codée dans un intron de l'ARNr 21S.	Jacquier and Dujon (1985)
VAR1	Protéine de la petite sous-unité du ribosome mitochondrial	Hudspeth et al. (1982)

**Figure II-8**

Résumé de la fonction des protéines codées dans le génome mitochondrial.

On peut donc considérer qu'un mécanisme dont le rôle est vraisemblablement de contrôler la traduction mitochondriale, doit prendre place au sein des mécanismes plus généraux de l'adaptation à la respiration.

Nous avons tout d'abord voulu trouver laquelle des voies connues pour être impliquées dans l'adaptation à la respiration : la voie TOR, PKA, Snf1/4 pouvait être à l'origine de la diminution d'Arc1p, ainsi que le moment exact où la diminution avait lieu. Il nous a fallu ensuite caractériser le rôle cellulaire des partenaires du complexe AME (**A**rc1p/**M**RS/**E**RS), puis définir les mécanismes moléculaires sous la dépendance de son contrôle.

Dans cette étude, nous avons tout d'abord cherché à mettre en évidence les mécanismes de contrôle de la quantité d'Arc1p. La technique de la PCR quantitative m'a permis de montrer que la voie Snf1/4 contrôle la transcription d'Arc1p *via* le facteur de transcription Mig1 complexé à Hxk2. Pour cela, j'ai tout d'abord montré que la synthèse de l'ARNm de Arc1p est diminuée 10 à 20 fois lors du shift diauxic, puis que certaines souches délétées de gènes clés (mais non essentiels) des voies TOR, PKA et Snf1/4, perdent cette capacité de régulation.

L'étape suivante fût de montrer, par Western blot et microscopie confocale, que la MRS du complexe AME subit également la diminution de Arc1p comme un événement régulant la quantité de sa forme libre, forme qui sera ensuite importée non pas dans la mitochondrie mais dans le noyau. Cette piste nous a paru évidente au vu des rapports précédents quant-à son import nucléaire et quant-au rôle de la MRS cytoplasmique humaine détachée du MSC qui se localise dans les nucléoles afin de promouvoir la transcription de gènes. De fait, lorsqu'Arc1p diminue, il y a libération synchronisée de MRS et de ND-ERS, qui peuvent, respectivement, rejoindre le noyau et la mitochondrie. Ludovic Enkler, alors en stage de Master II, m'a épaulé plus qu'efficacement dans cette étude de la relocalisation de la MRS et du rôle de la forme libre de la MRS.

Nous avons alors cassé ce mécanisme de synchronisation afin d'étudier l'effet d'une telle perturbation chez la levure. J'ai généré une souche de levure nommée ARC où Arc1p est fortement surexprimé sous dépendance d'un promoteur constitutif. De cette manière, nous

retirons à la cellule la capacité de contrôler la quantité d'Arc1p. J'ai ensuite créé deux autres souches nommées nM et nE, basées sur la souche ARC. Dans chacune d'elles, en plus de la surexpression d'Arc1p, soit la partie N-terminale de la MRS soit la partie N-terminale de la ND-ERS est surexprimée. Ces parties N-terminales sont les sous-domaines impliqués dans l'interaction Arc1p/aaRS. Ainsi, dans la souche nM, la surexpression du domaine N-terminal de la MRS induit le relargage de cette dernière par un phénomène de compétition au niveau de son site de fixation sur Arc1p, *idem* pour la souche nE et la ND-ERS.

Dans la souche ARC, les deux enzymes ND-ERS et MRS sont toujours fixées à Arc1p, et ceci quelque soit le métabolisme que la levure veut utiliser. Dans la souche nE, il y a plus de ND-ERS libre importable dans la mitochondrie que de MRS libre importable dans le noyau. À l'inverse dans la souche nM, il y a plus de MRS libre que de ND-ERS libre.

Des tests en gouttes, des mesures de consommation d'oxygène ainsi que la quantification de la production de radicaux libres, pour chacune des souches, nous ont permis de mettre en évidence l'importance du complexe AME lors de l'adaptation à la respiration. Ce complexe prend toute son importance dans sa dimension de synchronisateur, en effet les phénotypes les plus forts surgissent lorsque le relargage synchrone des deux enzymes est perturbé.

Ces phénotypes s'expliquent en raison de la nature particulière de la chaîne respiratoire. La spécificité de ce complexe concerne sa nature bi-partite ; c'est, en effet, le seul complexe macromoléculaire connu à ce jour pour être codé par deux génomes séparés dans des compartiments différents de la cellule (**Figure II-7**), les gènes de ses sous-unités sont portés à la fois par le génome nucléaire (la majeure partie) et mitochondrial. Ainsi, la synchronisation de la production de ces sous-unités est essentielle, la chaîne respiratoire, et en particulier le complexe III ou cytochrome bc1, est le principal site de production de radicaux libres dans la cellule. La production nucléaire et mitochondriale de tous les partenaires de la chaîne respiratoire doit donc être très finement synchronisée afin de respecter une stoechiométrie idéale qui permet d'éviter une production massive de radicaux libres en provenance de complexes dont la composition est déséquilibrée.

Nous avons comparé nos différentes souches par PCR quantitative. Notre étude ciblait les gènes de la chaîne respiratoire codés dans le génome nucléaire. Cela nous a permis de montrer que la MRS de levure a principalement un rôle dans le contrôle de la transcription des gènes

des sous-unités du complexe III ou cytochrome bc1 codés par le noyau. Des expériences de quantification de la traduction mitochondriale ont également permis de montrer qu'un import accru de ND-ERS dans la mitochondrie (souche nE) génère une augmentation globale de l'activité de traduction mitochondriale.

Notre modèle propose ainsi que le complexe AME synchronise la production des sous-unités nucléaires et mitochondriales de la chaîne respiratoire en permettant la relocalisation synchrone de la MRS dans le noyau et de la ND-ERS dans la mitochondrie. Le relargage est permis par la diminution d'Arc1p lors du shift diauxic, diminution qui est déclenchée par la voie Snf1/4 en réponse à la diminution de glucose.

Ce travail est présenté dans la version de l'article que nous aimerions soumettre à la fin du mois de septembre 2010. Il est possible qu'il soit encore modifié après la rédaction de ce manuscrit de thèse.

**Synchronize or suffocate: two aminoacyl-tRNA synthetases escaping a cytosolic multisynthetase complex coordinate nuclear transcription and mitochondrial translation of the respiratory chain genes**

Mathieu Frechin<sup>1</sup>, Bruno Senger<sup>1</sup>, Ludovic Enkler<sup>1</sup>, Robert Martin<sup>2</sup>, and Hubert Dominique Becker<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>UPR ‘Architecture et Réactivité de l’ARN’, Université de Strasbourg, CNRS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15, Rue René Descartes, F-67084 Strasbourg Cédex, France.

<sup>2</sup>UMR 7156, CNRS, Université de Strasbourg, Department of Molecular and Cellular Genetics, 21 rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France.

\* Correspondence to:

Pr. Hubert Becker

Tel: 33 (0)3 88 41 70 41

Fax: 33 (0)3 88 60 22 18

Email: [h.becker@ibmc.u-strasbg.fr](mailto:h.becker@ibmc.u-strasbg.fr)

**Running title:** mitochondria-nucleus cross-talk

**Key words:** mitochondria- nucleus cross-talk, synchronization, respiratory chain complexes, aminoacyl-tRNA synthetase, Arc1p, *Saccharomyces cerevisiae*.

## Summary

Eukaryotic cytosolic aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS) assemble into so-called multisynthetase complexes (MSCs) ranging from nine aaRSs and three non-catalytic auxiliary proteins in mammals to two aaRSs, glutamyl- and methionyl-tRNA synthetases (E- and MRS) and the protein Arc1p (AME complex), in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The current view about these MSCs is that they constitute reservoirs for releasable multifunctional aaRS that, upon leaving, can exert their secondary roles. Yet, the majority of the MSC's aaRSs are still waiting to be attributed their secondary functions. Likewise, the function of the small yeast AME complex, is still unknown. We show herein that during the transition from fermentation to respiration, the Snf1/4 glucose-sensing pathway inhibits transcription of the *ARC1* gene thereby decreasing the level of Arc1p, and triggering concomitant release of  $\rho$ MRS and  $\rho$ ERS from the AME complex. Both aaRSs relocalize respectively into the nucleus and the mitochondria to synchronize nuclear transcription and mitochondrial translation of genes of the mitochondrial respiratory chain. By artificially desynchronizing  $\rho$ MRS and  $\rho$ ERS release and therefore uncoupling their secondary regulatory functions we bring evidences that the AME MSC complex functions as a pivotal synchronizer for the synthesis of respiratory chain subunits.

## Introduction

Aminoacyl-tRNA synthetases (aaRSs) belong to a family of ubiquitous enzymes originally identified for their primary function which is to generate the complete set of perfectly paired aminoacyl-tRNAs (aa-tRNAs) that will be used by ribosomes to translate messenger RNA (mRNA) codons into their corresponding amino acids (aa) (Söll and

Schimmel, 1974). While the primary and original role of aaRSs is to decode genetic codes, they additionally also bare a myriad of alternative functions. It is believed that their ancient and ubiquitous nature combined to their capacity to annex various new modules through evolution led to the selection of this family of enzyme for featuring this array of additional secondary functions (Ibba and Söll, 2000; Schimmel and Ribas De Pouplana, 2000; Brown et al., 2010). They range from cellular processes outside protein synthesis that do exploit their primary function of synthesizing aa-tRNA, like aa or cell-wall synthesis (Roy et al., 2003; Stewart et al., 1971) to others that do not depend on aminoacylation like RNA splicing, translational silencing or even cell-signaling (Rho et al., 2002; Sampath et al., 2004; Wakasugi et al., 1999). The latter non-canonical functions of aaRSs have quasi-exclusively been characterized in metazoans in which the functional diversification of these enzymes is directly linked to another distinctive feature of the higher-eukaryotes' aaRSs, which is their propensity to assemble into large so-called multisynthetase complexes (MSC) (Negrutskii et al., 1994; Kaminska et al., 2009). The concept that has emerged during the last decade is that MSCs are reservoirs for releasable multifunctional and wandering aaRSs (Ray et al., 2007; Park et al., 2008; Hausmann and Ibba, 2008). The idea is that sequestration inside MSCs restricts aaRSs' activities to their primary function of tRNA charging while upon release they can carry out their alternate regulatory role. Probably one of the best examples that illustrate this concept is the human glutamyl-prolyl-tRNA synthetase (EPRS) which participates to the mammalian MARS complex but is also released upon interferon- $\gamma$  induction and assembles into the so-called GAIT complex that performs translational silencing of certain genes (Sampath et al., 2004). Among the nine aaRSs and the three auxiliary proteins proteins, p18, p38 and p43, that constitute the MARS complex several have been shown to be able to leave the MSC and to exert alternative functions, including especially the auxiliary proteins (Park et al., 2008). However, most of the aaRSs are still pending to be attributed a secondary function,

and, in several cases the stimulus leading to release from the complex and the mechanism by which the aaRSs or auxiliary proteins leave the complex are still unknown.

The presence of MSC, while being seemingly a generic feature of higher eukaryotes, is not restricted to these particular species. Such a MSC was also found in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in which two aaRSs, cytosolic glutamyl-tRNA synthetase ( $\text{cERS}$ ) and cytosolic methionyl-tRNA synthetase ( $\text{cMRS}$ ) are bound to Arc1p, initially identified as a cofactor of tRNA export (Simos et al., 1996). Until recently, no secondary alternative functions could be attributed to the two aaRSs that participate to the Arc1p• $\text{cMRS}$ • $\text{cERS}$  (AME) complex. Besides the fact that binding to Arc1p enhances their aminoacylation efficiencies and prevents a small fraction of the two aaRS to relocalize in the nucleus (reviewed in Frechin et al., 2010), no real grounds for the existence of the yeast AME complex could be found. In a recent study, we showed that  $\text{cERS}$  can dissociate from the AME complex, and upon leaving, is imported into yeast mitochondria in which it specifically produces the mischarged mitochondrial glutamyl-tRNA<sup>Gln</sup> ( $\text{E-mtRN}^{\text{Q}}$ ) that will subsequently be converted into the cognate glutaminyl-tRNA<sup>Gln</sup> ( $\text{Q-mtRN}^{\text{Q}}$ ) by the mitochondrial GatFAB tRNA-dependent amidotransferase (AdT) (Frechin et al., 2009). Most importantly, we showed that Arc1p behaves as a cytosolic anchoring platform for a preferentially mitochondrial  $\text{cERS}$  and that expression of Arc1p is down-regulated when yeast cells are switched from fermentation to respiration, thus allowing increased import of  $\text{cERS}$  to satisfy a higher demand of  $\text{Q-mtRN}^{\text{Q}}$  for mitochondrial protein synthesis (Frechin et al., 2009). This discovery raised many issues among which what pathway and mechanism controls expression of Arc1p and what happens with  $\text{cMRS}$  when released from the AME complex upon alleviation of Arc1p ?

We show herein that during the diauxic shift, meaning the transition from fermentation to respiration, the Snf1/Snf4 glucose-sensing pathway inhibits transcription of the *ARC1* gene thereby decreasing the level of Arc1p. This triggers concomitant release of  $\text{cMRS}$  and  $\text{cERS}$

from the AME complex that relocalize respectively into the nucleus and the mitochondria to synchronize nuclear transcription and mitochondrial translation of genes of the mitochondrial respiratory chain (RC). By artificially desynchronizing  $\rho$ MRS and  $\rho$ ERS release and therefore uncoupling their secondary regulatory functions we bring evidences that the AME MSC complex functions as a pivotal synchronizer for the synthesis of respiratory chain subunits.

## Results

### *ARC1 gene is transcriptionally repressed by the Snf1/4 glucose-sensing pathway during the diauxic shift.*

We studied the evolution of *ARC1* transcript during classical growth conditions in SCGlu with 2% glucose. In this medium, *Saccharomyces cerevisiae* growth curve follows a characteristic two-step pattern in which two exponential growth phases are separated by an intermediate plateau. In the first exponential phase (figure 1A, 0 to app. 8h), yeast ferments glucose into ethanol (Otterstedt et al., 2004). Then, when the decreasing concentration of glucose reach a certain threshold, yeast stops dividing and starts a huge molecular and cellular remodelling called the diauxic shift. This step is essential for yeast to be able to acquire the capacity to use non-fermentable carbon sources like ethanol or glycerol that will be used during the second exponential phase *via* the respiratory metabolism (Figure 1A, app. 13h to the end) (Brauer et al., 2005; Zaman et al., 2008). Time-resolved quantification of *ARC1* mRNA was performed by q-PCR on aliquots taken during classical growth in order to observe *ARC1* transcription levels when adaptation to respiration occurs (Figure 1B). This experiment shows that *ARC1* transcription starts to be strongly downregulated during the diauxic shift, whereas transcription of *MES1* and *GUS1*, the genes encoding the two aaRRs binding to Arc1p, remains stable all along the culture (figure 1B), a result in agreement with data

reported previously (Frechin et al., 2009). Thus, Arc1p is the only partner of the AME complex impacted by the global adaptation to respiration. Quantification, by FACS, of the fluorescent signal generated by a yeast strain encoding a chromosomally-fused Arc1p-GFP under the control of its own promoter, allows us to confirm that Arc1p starts to decrease at the end of the fermentative growth phase (first exponential phase, Figure 1C, -S1B and -S1C). This result confirms our previously published Western blot observations (Frechin et al., 2009), and unambiguously proves that during the diauxic shift Arc1p is reduced, but not  $\rho$ MRS and  $\rho$ ERS which remain stably expressed. This regulation will therefore generate an augmented pool of the released forms of these two aaRSs during the respiration phase. Taking into account the rapid regulation of *ARCI*, these results suggest that Arc1p, by its ability to modify the proportion of free  $\rho$ MRS and  $\rho$ ERS, might play a more crucial role than initially foreseen in the adaptation to respiration. To decipher the rank of Arc1p in a putatively new molecular pathway controlling adaptation to respiration, we determined which major nutrient-sensing pathway controls transcription of *ARCI*. We chose to use relative q-PCR quantification to monitor the capacity of different yeast knock-out strains, compared to the wild type strain, to down-regulate *ARCI* transcription upon shifting from fermentation to respiration. Each of the selected strain was deleted of one gene encoding a key partner of the Snf1/4-, Tor- or PKA pathway (see Table S1), the three main pathways involved in adaptation to nutrient changes (Zaman et al., 2008). We observed that only deletion of key genes in the Snf1/4 pathway abolish the capacity of the cell to inhibit *ARCI* transcription (characterized by histogram of same height for fermentation and respiration, Figure 1D, Table S2) confirming that this pathway modulates *ARCI* transcriptional levels upon switch of nutritional carbon sources. Our results show that four of the main Snf1/4 partners intervene in *ARCI* transcriptional control, *i*) the Snf1 kinase that can form a complex with *ii*) the nuclear-import factor Gal83 (Yang et al., 1994) and the target of Snf1, *iii*) the transcription factor Mig1 in

complex with *iv*) Hxk2 (Ahuatzi et al., 2004) (figure 1D). By implementing the well-described schematic network of Snf1/4 pathway (Figure 1E) (Zaman et al., 2008) with our data, one can come to the conclusion that the transcription activator/repressor complex Mig1/Hxk2 (Santangelo, 2006; Schuller, 2003) activates directly *ARC1* transcription during fermentation or *via* a yet unknown cascade of possible additional transcription factors. Indeed, Cat8 and Sip4, the two known transcription activators controlled by Mig1/Hxk2 (Rahner et al., 1996; Vincent and Carlson, 1999), are not essential for *ARC1* regulation (Figure 1D). We therefore propose that, triggered by glucose alleviation, the complex Snf1/4 is phosphorylated either by the Tos3, Elm1 or Sak1 kinases and enters the nucleus to phosphorylate the Mig1/Hxk2 complex, provoking export of Mig1 from the nucleus (Santangelo, 2006) and therefore turning off *ARC1* transcriptional activation. One can note that deletion of Snf4 does not abolish transcriptional regulation of *ARC1* mRNA upon switch to respiration. One reason for this is that upon binding to Snf1, Snf4 blocks the auto-inhibition activity of Snf1 (Jiang and Carlson, 1996; McCartney and Schmidt, 2001), however, it does not impair the capacity of Snf1 to be phosphorylated and thus to be active in the nucleus.

***ϵMRS relocates to the nucleus of *Saccharomyces cerevisiae* during respiration.***

Arc1p has already been shown for more than a decade to form the ternary AME complex with two cytosolic aaRSs, ϵERS and ϵMRS, but until recently the functional role for this AME complex remained elusive. We showed in our previous study that ϵERS is in fact a mitochondrial protein which is only retained in the cytosol by binding to Arc1p (Frechin et al., 2009). Cytosolic anchoring or release of the ϵERS is therefore strictly depending on the cellular concentration of Arc1p which is adjusted according to the metabolism, fermentation or respiration, used by yeast to process nutritional carbon sources. One would logically guess that decrease of Arc1p in the cytosol will also triggers release of ϵMRS that could relocate in

another subcellular compartment like  $\epsilon$ ERS does. One possible place where the released  $\epsilon$ MRS could relocate is in the nucleus since earlier studies reported presence of this aaRS in the nucleus of strains deprived of Arc1p (reviewed in Frechin et al., 2010; Galani et al., 2001; Golinelli-Cohen and Mirande, 2007). However, both the physiological event leading to nuclear relocalization of  $\epsilon$ MRS as well as the role this aaRS could play in the nucleus remains still unknown. Our hypothesis is that nuclear relocalization of  $\epsilon$ MRS takes place when yeast switches from fermentation to respiration because the decrease of Arc1p creates a large pool of free  $\epsilon$ MRS. To verify this hypothesis, we observed a yeast strain expressing a chromosomal-encoded  $\epsilon$ MRS-GFP controlled by its own promoters (Figure 2A, Table S1) using confocal microscopy. Growth of this strain was controlled in order to reach either the fermentation or a respiration state. We compared, for these two growth conditions, the localization of the  $\epsilon$ MRS-GFP signal and that of nuclei stained with Hoechst. Figure 2A shows that  $\epsilon$ MRS is localized in quasi all nuclei of the yeast cells when grown under respiratory conditions, in opposition to cells grown under fermentation which all display a clear nuclear exclusion of  $\epsilon$ MRS-GFP. We confirmed this result using a different approach based on the purification of nuclei from a wild type strain grown either under fermentation or respiratory conditions. Nuclear extracts from these two pools of nuclei were obtained following a fast purification protocol that limits passive diffusion of proteins out of the nuclear pores (supp experimental procedures). Western blot analysis using specific anti- $\epsilon$ MRS antibodies shows that there are already traces of  $\epsilon$ MRS that can be detected in nuclei from yeast cells that fermentate but that the nuclear pool of  $\epsilon$ MRS is increased by more than one order of magnitude when yeast respire (Figure 2B). Signal generated by antibodies directed against the phosphorylated histone H2A and the nucleolar protein Nop1 demonstrate that the quantity of protein extract we analysed are comparable, and anti-PGK signal confirms that cytoplasmic contamination of the two nuclear extracts is negligible. These lines of

experimental evidences lead us to conclude that upon shift and adaptation to respiration, the decrease of Arc1p concentration induces release of cMRS from which a large proportion is imported in the nucleus.

***Design of a molecular tool desynchronizing the release of cMRS and cERS from Arc1p.***

In a previous study we already showed that while Arc1p cellular concentration is drastically reduced upon switch to respiration both cMRS and cERS overall concentration stays constant (Frechin et al., 2009). Along the same line, qRT-PCR data show that while *ARCI* transcription is inhibited during the diauxic shift, those of *GUSI* (cERS gene) and *MESI* (cMRS gene) remain unaltered (Figure 1B), suggesting that augmented pool of nuclear cMRS and mitochondrial cERS, observed during respiration, comes from the increased levels of released cMRS and cERS and not from an increased expression of both genes. One logical way to verify this hypothesis is to deprive the cell of its capacity to adjust the synthesis of Arc1p and to artificially modulate the release and import of the two free aaRS. To do so, we developed three specific strains called ARC, nE and nM (Summarized in Figure 3A). The ARC strain is based on a  $\Delta arc1$  strain transformed with the plasmid p425GPD-*arc1* (Mumberg et al., 1995) which overexpresses Arc1p in a constitutive manner regardless of the metabolism that yeast has to use. Figure 3B shows indeed that unlike the wild type strain, the ARC strain has lost the ability to inhibit transcription of *ARCI* upon switch to respiration, suggesting that the level of Arc1p in this strain will be such as both cERS and cMRS will remain bound to this cytosolic anchor even under respiratory conditions. The nE and nM strains are based on the ARC strain respectively cotransformed with the p424GPD-*nE* or p424GPD-*nM* plasmid overexpressing the 190 first amino acids of the cERS or the 160 first amino acids of the cMRS. These N-terminal domains of cERS and cMRS have been shown to

be solely responsible for binding to Arc1p (Simader et al., 2006); and in the case of p424GPD-*nE*, the 190 first aa do not contain the putative mitochondrial targeting sequence located directly downstream in the native N-terminus of  $\epsilon$ ERS (Frechin et al., 2009). By constitutively overexpressing Arc1p we aim at constantly anchoring both aaRS in the cytosol even in respiration condition in which they are normally released. By additionally overexpressing the Arc1p binding-domain of  $\epsilon$ ERS (nE strain) or  $\epsilon$ MRS (nM strain) we aim at triggering the release of respectively only  $\epsilon$ ERS or  $\epsilon$ MRS from Arc1p by exchanging on the AME complex the native and full-length form by its N-terminal domain (Schematized in Figure 3A). Therefore, in the nE strain the competing N-terminal peptide should induce release of  $\epsilon$ ERS while  $\epsilon$ MRS would stay anchored on Arc1p. Conversely, in the nM strain the  $\epsilon$ MRS should be released from Arc1p while the  $\epsilon$ ERS should stay blocked. We first verified that both nE and nM strains have kept their inability to inhibit transcription of *ARC1* in respiratory conditions (Figure 3B). Then, to validate our approach, we measured the release efficiency from Arc1p for  $\epsilon$ MRS and  $\epsilon$ ERS in all three strains grown during 12 h, by checking whether  $\epsilon$ MRS and  $\epsilon$ ERS are free or included in higher molecular weight (MW) complexes using size-exclusion chromatography (Figure 3C). Indeed, both free  $\epsilon$ MRS and  $\epsilon$ ERS display a MW of approximately 85 kDa, whereas when in complex with Arc1p each duplex reaches a MW of 130 kDa and of 215 kDa when the trimeric AME MSC is formed. The distribution of  $\epsilon$ ERS and  $\epsilon$ MRS, in the crude extracts of all three strains submitted to size-exclusion chromatography was revealed by measuring the relative specific activities of  $\epsilon$ MRS and  $\epsilon$ ERS in all fractions along the entire elution profile (Figure 3C). We can observe that, as expected, in the extract of the ARC strain the two synthetase activities cluster in the high MW fractions thereby confirming that, by overexpressing Arc1p,  $\epsilon$ MRS and  $\epsilon$ ERS are kept in complex with this anchor. In the extract of the nE strain the  $\epsilon$ ERS activity is equally distributed between high MW fractions corresponding to the Arc1p-bound state and the lower MW fractions

corresponding to the cERS released from Arc1p (Figure 3C). As expected, in the extract of the nE strain, the cMRS has not been released from Arc1p as shown by the restriction of the cMRS activity to only high MW fractions (Figure 3C, nE strain). On the opposite, the extract of the nM strain displays an equally split distribution of cMRS activity between high (Arc1p-bound state) and low (released state) MW fractions whereas cERS is uniformly in the Arc1p-bound state. Note that even if Arc1p is constitutively expressed we could find traces of free cMRS and cERS in the extracts of all three strains in agreement the presence of a small quantity of cMRS in the nucleus (Figure 2B) and of cERS in the mitochondria of a wild type strain grown under fermentation conditions (Frechin et al., 2009). We would also like to emphasize that the efficiency of the desynchronized release of either cERS or cMRS in the nE and nM strains, evaluated by specific activity measurements, might be underestimated because the aminoacylation efficiency of both aaRSs bound to Arc1p is higher than those of the free forms. Therefore, while our data show that in the nE and nM strains approximately half of respectively cERS and cMRS have been released from Arc1p, the proportion of the released form is very likely higher. This line of experiments validates our approach to desynchronize the release of cERS and cMRS from Arc1p by alternatively overexpressing the Arc1p binding-domain of one of the two aaRSs. The three strains we engineered constitute, therefore, a perfect tool to study the cellular role of the AME MSC from which cERS and cMRS can be selectively released (Figure 3A).

***Synchronicity in the release of cMRS and cERS from Arc1p is essential for efficient respiration.***

Our previously published and present data point at Arc1p being a pivotal factor in adaptation of yeast to respiration. The first piece of evidence supporting this assumption is that transcription of the *ARC1* gene is under the control of the Snf1/4 pathway which is the

major glucose-sensing check-point in yeast. However, Arc1p is not an effector *per se*. We believe the two aaRSs that are restrained by Arc1p to relocate inside the mitochondria and the nucleus to be the direct effectors in the adaptation to respiration. We already know that  $\rho$ ERS is essential for mitochondrial translation (Frechin et al. 2009) and we know that upon release,  $\rho$ MRS is imported in the nucleus, but its participation to processes related to the capacity of yeast to respire has yet to be shown. However, one can easily foresee that since upon decrease of Arc1p triggered by the diauxic shift both aaRSs are concomitantly released,  $\rho$ MRS is certainly involved in the adaptation to respiration. More intriguing is the reason why there is a synchronized release and relocation of both synthetases during the adaptation step and whether this synchronicity is important. In order to tackle these issues and to define the role that each of the three partners could play in this adaptation process, we first investigated the capacity of the ARC, nE and nM strains to produce energy, resume cell cycling and divide using drop tests on media that force cells to use either fermentation or respiration. Compared to the wild type strain, we can see that none of the three strains display any apparent growth defect after three days of growth on glucose plates, a carbon source that yeast has to fermentate (Figure 4A). This shows that overexpressing Arc1p or the N-termini of  $\rho$ ERS or  $\rho$ MRS does not interfere with the primary activities of both aaRSs which are to produce the cognate cytosolic aa-tRNAs (see also Figure S2), neither with any another essential cellular function. Thus, any alteration of phenotype or any effect that will be observed with the ARC, nE or nM strains cannot originate from a defect in E- $\rho$ tRNA<sup>E</sup> or M- $\rho$ tRNA<sup>M</sup> formation. When switched to plates containing glycerol, a carbon source that forces yeast to respire, one can observe that all three strains display defects in their growth phenotype (Figure 4A). The ARC strain grow slower than the wild type strain on glycerol plates confirming that overexpression of Arc1p induces an effect when yeast uses respiration, in agreement with previously published data from a high throughput study based on the systematic overexpression of almost

all yeast ORFs (Niu et al., 2008). In this study, authors observe that overexpression of Arc1p increases the length of the G1 cell-cycle phase, when cells are grown on galactose, a carbon source on which yeast will preferentially respire. The nE strain shares the same phenotype than the ARC strain suggesting that solely enriching mitochondria with  $\rho$ ERS does not counterbalance the slow growth phenotype generated by overexpressing Arc1p. Strikingly, the nM strain does not grow at all on glycerol plate suggesting that the nuclear targeting of  $\rho$ MRS while  $\rho$ ERS is sequestered on Arc1p kills yeast cells that are forced to respire (Figure 4A). This suggests that, more than the simple release of the two synthetases, the synchronization of this event is vital for growth in respiratory conditions. However, the respiratory phenotypes revealed by the drop tests experiments constitute only a partial readout of the efficiency of the respiration metabolism of the three strains we engineered. To prove that the respiratory defect is due to a global reduction of the activity of the mitochondrial respiratory chain (RC) we checked the capacity of the ARC, nE and nM strains, to consume oxygen ( $O_2$ ) by oximetry (Averet et al., 1998). The wild type, ARC, nE and nM strains were grown in SCGalactose -Trp -Leu medium until  $2 A_{600\text{ nm}}$ . We used galactose since on this carbon source yeast almost exclusively uses respiration. However, this respiratory carbon source is not as strong as glycerol, thereby allowing the nM strain, which dies quickly when is forced to respire, to survive. We measured, in a hermetic chamber, the decrease of dissolved  $O_2$  concentration mediated by a normalized quantity of cells from each strain. Figure 4B shows that, when compared to the wild type  $O_2$  consumption velocity, the ARC, nE and nM strain display a 11%, 31% and 76% decrease there of the  $O_2$  consumption capacity. Surprisingly, the RC of the nM strain is still able to function and the reduced capacity of this strain to use the oxidative phosphorylation mechanism cannot explain by itself the incapacity of this strain to grow on a carbon source like glycerol on which the strain can only use respiration (Figure 4A). We, thus, compared the production of reactive oxygen species (ROS)

in the ARC, nE and nM strains to that of the wild type. ROS are by-products of the RC (Chen et al., 2003; Muller et al., 2004) and thus provide a fairly good readout of the RC integrity. The four strains were grown in the same conditions used for oximetry experiments and stained with 2', 7' dichlorofluorescein diacetate which penetrates the cell and is processed by esterases before its ROS-mediated activation into a green fluorescent compound. We took confocal microscopy images of the four strains 20 minutes after the treatment (figure 4C) keeping the same microscope settings and quantifying the fluorescence signal with the Image J software. Figures 4 C and D shows that the level of ROS production of the ARC strain is normal whereas that of the nE strain is lowered by approximately 30% and that of the nM strain is more than doubled, which constitute a severe intensification of ROS production. These results show that the perturbation induced by the sole nuclear targeting of  $\epsilon$ MRS impact the equilibrium of the RC which in turns produces a massive quantity of ROS. While production of reasonable quantities of ROS is necessary for cell signalling, an excess of ROS can activate apoptosis (Eisenberg et al., 2007) which explains why the nM strain is unable to grow in respiration conditions. One would have *a priori* thought that enriching mitochondria with  $\epsilon$ ERS, which is what happens in the nE strain, would have ameliorate the respiration capacity impaired by overexpression of Arc1p. However, it is obvious that targeting the  $\epsilon$ ERS to the mitochondria while keeping  $\epsilon$ MRS sequestered in the cytosol is worse than locking both of them in the cytosol, since the respiration efficiency of the nE strain, in comparison with the ARC strain, is decreased by 20%. Enriching nuclei with  $\epsilon$ MRS but blocking the augmented mitochondrial import of  $\epsilon$ ERS is even more deleterious to the cells because they lose two-thirds of their respiration efficiency when compared to the ARC strain and produce twice as much ROS. One of the possible reasons that could explain these results is that the secondary and alternative function of  $\epsilon$ ERS and  $\epsilon$ MRS is to regulate the expression of the genes encoding some of subunits of the RC and that binding to Arc1p is the strategy that was adopted by yeast

to synchronize the secondary function of these two aaRSs. That  $\epsilon$ ERS is essential to mitochondrial translation and therefore to the synthesis of mitochondria-encoded subunits of the RC is not a surprise, however, if our hypothesis is true it would mean that  $\epsilon$ MRS modulates transcription of genome-encoded subunits of the RC.

### ***Nuclear $\epsilon$ MRS binds to RNA polymerase II***

It has already been shown that  $\epsilon$ MRS can interact with proteins localized in the nucleus or involved in the nuclear import of proteins. For example,  $\epsilon$ MRS is able to interact with Ssa1 (Gong et al., 2009) a chaperone involved in recognition and import of nuclear proteins, and also with Ssb1, a chaperone important also for adaptation to respiration (von Plehwe et al., 2009). In addition,  $\epsilon$ MRS seems to interact also with Hat1, a member of the HAT transcription complex as well as with Taf6, a subunit of TFIID and SAGA transcription initiation complexes. However, these interactions were mainly described in high throughput studies (Gavin et al., 2002; Krogan et al., 2006) and no biological functions were, so far, attributed to these  $\epsilon$ MRS-containing nuclear complexes. Nevertheless, if  $\epsilon$ MRS is involved in the transcriptional control of genes of the RC, one would expect  $\epsilon$ MRS to bind to factors that modulate transcription of genes. In order to confirm these interactions and to get insights into the role played by  $\epsilon$ MRS in the nucleus, we specifically searched for  $\epsilon$ MRS nuclear partners using tandem affinity purification (TAP) approach (Puig et al., 2001). In our case, the major limit of this procedure is that  $\epsilon$ MRS is already almost exclusively found in complex with Arc1p and  $\epsilon$ ERS and these major interactants might mask partners present in lesser amounts like transcription factors. In order to decrease the quantity of Arc1p bound to  $\epsilon$ MRS, and since Arc1p was shown to be excluded from the nucleus (Karanasios et al., 2007), we generated a nuclear-enriched protein extract from the  $\epsilon$ MRS-TAP strain grown under respiratory conditions prior to proceeding with the purification (Figure 5A). Figure 5B shows that the

ϵMRS-TAP fusion protein and associated components were recovered from nuclear-enriched protein extracts by Tandem Affinity Purification. Analysis of the final pulldown fraction by SDS-PAGE showed several proteins associated to the ϵMRS bait (Figure 5B). LC-MS/MS analysis of the bands recovered from the gel identified the ϵMRS bait, Arc1p and Rpb7, the alternative subunit of RNA polymerase II (Choder, 2004) which modulates selection of the genes that will be transcribed. Although we didn't retrieve Taf6 and Hat1 in our analysis, this new pulldown assay undoubtedly shows that ϵMRS binds to RNA polymerase II and is therefore very likely involved in transcription regulation. Since complexes that modulates transcription are highly dynamic and thus difficult to identify by fishing approaches, we performed a second TAP but stopped after the first IgG step (Figure 5A), in order to be able to identify much weaker interactants of ϵMRS. Using this strategy, we found Ssa1 Ssb1 in complex with ϵMRS-TAP (Figure S3), suggesting that the Ssa1 chaperone is probably the cargo for ϵMRS import in the nucleus, and that ϵMRS is involved in adaptation to respiration. Once again, we did not identify any other transcription factors, which are possibly hidden, during LC-MS/MS analysis, by the higher amount of the contaminants (subtracted after control experiment) that are retained kept when removing the second affinity purification step. Having shown that ϵMRS features the major attributes of a transcription factor (nuclear localization and binding to RNA polymerase) and that disconnecting its nuclear translocation from ϵERS mitochondrial relocation has such a drastic respiratory phenotype (nM strain), we decided to check whether ϵMRS regulates transcription of one of the most important gene cluster for respiration, those of the RC encoded in the nucleus.

***ϵMRS and ϵERS activate and coordinate nuclear transcription and mitochondrial translation of genes of the subunits of the RC.***

Every eukaryote that uses respiration possesses a RC embedded in the inner membrane of mitochondria and composed of an assembly of macromolecular edifices (Schagger and Pfeiffer, 2000). The number of proteins subunits forming the five macromolecular particles of this chain is species-specific. However, one rule is universally respected: genes coding for subunits of the RC are spatially partitioned between the nuclear and mitochondrial genomes. This peculiarity raises the issue of how the cell synchronizes the production of nuclear- and mitochondrial-encoded protein subunits in order to assemble the RC complexes with the needed perfect stoichiometry (Ryan and Hoogenraad, 2007). This question is of particular importance since assembly of RC complexes with an inaccurate stoichiometry is at the origin of multiple mitochondrial diseases in Human (Coenen et al., 2001). One can easily guess that there has to be a mitochondria-nucleus cross-talk in order to coordinate the timing and production of subunits encoded by separated genomes. The nature and mechanisms underlying this cross-talk is a long standing question (Forsburg and Guarente, 1989) that is just starting to be addressed (Liu and Butow, 2006; Ryan and Hoogenraad, 2007). Since upon dissociation from the AME complex the two aaRSs relocate rightly in the compartments hosting the separated genes of the RC subunits, we hypothesized that both  $\epsilon$ MRS and  $\epsilon$ ERS might be essential factors for coordinating their production. The first piece of evidence sustaining this hypothesis comes from the nature of  $\epsilon$ MRS nuclear interactants that make us really suspect that this enzyme participates to the transcription of nuclear genes. To test our hypothesis we compared transcription of all nuclear-encoded components of the RC produced during the respiratory phase, in the wild type, ARC and nE strains (figure 3A, -6A, -6B, Table S3, -S4). The two latter strains being the ones in which  $\epsilon$ MRS is sequestered in the cytosol, it will inform us whether genes of the RC subunits are controlled by  $\epsilon$ MRS. Since the nM strain is unable to switch to respiration this strain was not used for our comparative study because it might have very likely cause aberrant and non interpretable results. Figure 6A and 6B show

that in the ARC and nE strains, in which  $\rho$ MRS cannot relocate in the nucleus, transcription of the core components of the cytochrome bc1 complex (green squares) are downregulated compared to the wild type strain. The same transcription inhibition is observed for Cbp3, Cbp4 and to some extent for Mba1 which are genes that encode three proteins which assemble the cytochrome bc1 complex in the mitochondrial inner membrane (Kronekova and Rodel, 2005; Rep and Grivell, 1996) (figure 6A, -6B, yellow squares). These results show that the main role of the  $\rho$ MRS in the nucleus is to promote transcription of the genes of the cytochrome bc1 subunits. Note that Cor1, the last nucleus-encoded component of the cytochrome bc1 complex was not studied for technical reasons. To further validate our hypothesis that both aaRS are involved in coordinating the synthesis of the RC complexes, we verified whether augmentation of  $\rho$ ERS import into mitochondria, driven by Arc1p decrease, has a direct impact on the mitochondrial translation. To do so, we monitored the overall mitochondrial protein synthesis rate of the wild type, ARC and nE strains, using radioactive labelling of newly synthesized proteins. After addition of cycloheximide which stops cytosolic translation, cells were mixed with [ $^{35}$ S]-L-methionine during 10 and 20 minutes. Protein extracts obtained for each condition were separated by PAGE, radiolabeled peptides were revealed by phosphorimaging and quantified using the ImageQuant software. Figures 6C and 6D show that the mitochondrial protein synthesis of the ARC strain is approximately reduced by 20% as compared to that of the wild type strain. When releasing  $\rho$ ERS, which is the case in the nE strain, the rate of mitochondrial protein is increased by 60% as compared to that of wild type strain. This shows that the rate of overall mitochondrial translation is directly depending on the quantity of  $\rho$ ERS that can be addressed to mitochondria. It also suggests that E-mtRNA<sup>Q</sup>, the aa-tRNA specifically generated by the mitochondrial pool of  $\rho$ ERS, is probably the limiting aa-tRNA species for mitochondrial protein synthesis in respiring yeast. Such global augmentation of the mitochondrial translation mediated by an augmented import

of an aaRS was also observed by artificially increasing import of mitochondrial leucyl-tRNA synthetase in human mitochondria (Li and Guan, 2010). To summarize, upon switch to respiration  $\epsilon$ MRS will relocate into the nucleus and activate transcription of the nuclear-encoded genes of the cytochrome bc1 complex while cERS is imported into mitochondria and activates translation of all mitochondrial-encoded genes of the RC.

All these physiological, cellular and molecular observations using a comparative study of the strains in which we desynchronized the release of  $\epsilon$ ERS and  $\epsilon$ MRS (summarized in the [Figure 6E](#)) allows us to propose the following model: glucose depletion activates the Snf1/4 pathway that inhibits transcription of *ARC1* followed by Arc1p alleviation allowing the release of  $\epsilon$ MRS and  $\epsilon$ ERS that relocate into the nucleus and mitochondria to synchronize nuclear transcription and mitochondrial translation of RC genes ([Figure 7](#)).

## **Discussion**

Little is known about the mitochondria-nucleus cross-talk that enables coordinated expression of nuclear- and mitochondrial-encoded subunits of the respiratory chain complexes ([Figure S7A](#)). This long-standing issue (Forsburg and Guarente, 1989) is just starting to be addressed (Liu and Butow, 2006; Ryan and Hoogenraad, 2007) while being of prime importance, since assembly of respiratory chain complexes with an inaccurate stoichiometry is at the origin of multiple mitochondrial diseases in Human (Coenen et al., 2001). This is particularly true for the cytochrome bc1 which is the major source of mitochondrial ROS (Chen et al., 2003; Muller et al., 2004). Our study not only brings new pieces of evidence for the criticalness of maintaining the right stoichiometry in assembling the cytochrome bc1 edifice but most importantly shows that the right stoichiometry is obtained by synchronizing expression of the subunits that build up this complex. As seen with the desynchronized nM and nE strains, any

failure to do so leads to respiratory phenotypes or even lethality. Knowing that cytochrome bc1 is the major source of ROS production, we can now propose scenarios that explain the severe ROS generation and lethality of the nM strain on non-fermentable carbon source and the mild decrease of the respiration capacity and ROS production of the nE strain (Figure 4A, 4B, 4C, 4D). In the nM strain, *cyto*MRS is artificially released from Arc1p, relocates into the nucleus and induces transcription of the nine nuclear-encoded genes of the cytochrome bc1 subunits, as well as of key enzymes involved in formation of cytochrome c oxidase (Mss51) and ATP synthase (ATP17) (Figure 6A and B). Meanwhile, sequestration of *cyto*ERS in the cytosol impedes overall mitochondrial protein synthesis and thus that of cytochrome b (*cob*), the only mitochondrial-encoded subunit of this complex. As a consequence, cytochrome bc1 complex is very likely assembled with an inaccurate stoichiometry (Figure 6D), since there is an excess of nuclear-encoded subunits. Such an unbalanced cytochrome bc1 complex has already been shown to produce a massive quantity of superoxide species (Crofts, 2004; Yin et al., 2010). One possible explanation for the increased ROS production by the cytochrome bc1 complex of the nM strain could be that the depletion of cytochrome b, which transfers electrons from ubiquinol to cytochrome c, could generate a breach that allows electrons to escape the respiratory chain and convert oxygen species into ROS (ref). This model is in accordance with the mild beneficial effect on ROS production observed in the nE strain (Figure 4C, 4D) in which the assembly of cytochrome bc1 complexes presenting an excess of the mitochondrial-encoded cytochrome b (Figure 6B, 6C) would block the electron leakage during transfer from ubiquinol to cytochrome c. However, the positive effect of having respiratory chain complexes presenting an excess of the mitochondrial-encoded subunits (Figure 6B, 6C), on ROS production, is counterbalanced by a decrease in the respiration efficiency (Figure 4B). Considering that the limit of our desynchronizing approach is that overexpression of Arc1p is not sufficient to completely sequester both aaRSs in the cytosol,

the phenotypes and molecular effects we observe with the ARC, nM and nE strains are very likely attenuated by the leaky release of both aaRS (see also Figure 3C). It is therefore probable that nuclear  $_{\text{cyto}}$ MRS might impact transcription of more genes than just the ones we identified (Figure S6). The same limitation applies to the effects of  $_{\text{cyto}}$ ERS on overall mitochondrial translation. However, one has to keep in mind that the system is by itself naturally leaky, since in the wild type strain both  $_{\text{cyto}}$ MRS and  $_{\text{cyto}}$ ERS have been found in the nucleus and the mitochondria of yeast cells that are fermenting, when Arc1p expression is at its maximum. This natural and uncontrolled release of small quantities of both aaRSs is probably mandatory for keeping a basal level of nucleus-mitochondria cross-talk necessary for not attempting to the maintenance of mitochondria during fermentation.

In yeast and Human (Finley and Haigis, 2009; Liu and Butow, 2006) we are just starting to understand the major role played by the different nutrient-sensing pathways such as TOR, AMPK (equivalent to yeast Snf1/4 pathway) or sirtuins, and by the mitochondrial metabolites like  $\text{Ca}^{2+}$ , ROS or glutamate involved in feedback controls. However, the molecular effectors activated by nutrient-sensing pathways to synchronize expression of the nuclear and mitochondrial genes of the subunits of the respiratory chain complexes have yet to be discovered. To our knowledge the Arc1p/ $_{\text{cyto}}$ MRS/ $_{\text{cyto}}$ ERS particle, that has been deviated by the cell from its primary function to relay sensing of the glucose level and concomitant expression of genes of the respiratory chain complexes, constitutes the first reported example of such kind of expression synchronizer. When looking at the mechanism by which this synchronizer adjusts the spatiotemporal expression of subunits composing complexes encoded by genomes separated in two different compartments, it appears to be irresistibly simple. To synchronize the expression of compartmentalized genes, two cytosolic proteins that are primarily producing aa-tRNAs alternatively appear to be a nuclear transcription modulator and a mitochondrial translation regulator that are both sequestered on

a cytosolic anchor. The simple decrease in expression of the anchor will ensure the synchronized relocation of both aaRSs and thus concomitant expression of nuclear and mitochondrial genes. As a consequence, one additional issue raised by our study is to define what we consider as the primary location and function of these proteins, as  $_{\text{cyto}}\text{ERS}$  and  $_{\text{cyto}}\text{MRS}$  are undoubtedly essential cytosolic proteins producing aa-tRNAs. It also raises the more fundamental question of how to unravel alternative functions carried by essential multifunctional proteins. Progressive disruption of a complex such as multi-aminoacyl-tRNA synthetase complexes (MSC) in order to study the synchronization of the subcellular alternative relocation and functions of aaRSs is one of probably many artificial approaches that can be used. It is also a natural strategy that has been shown to be used in other signalling pathways, leading to the emerging new concept that MSC, and more generally macromolecular complexes, can be considered as reservoirs blocking multifunctional proteins with multiple subcellular locations (Hausmann and Ibba, 2008; Lee et al., 2004; Ray et al., 2007). As an example, it has already been shown that human  $_{\text{cyto}}\text{MRS}$ , that belongs to the human MSC can relocalize into the nucleolus of dividing cells and control transcription of rRNA (Ko et al., 2000). Likewise, the Glutamyl-Prolyl-tRNA synthetase or EPRS can be released from the human MSC upon phosphorylation of two serines (Arif et al., 2009) of the non catalytic WHEP domain linking the two synthetase cores. Once released, EPRS forms an heterotetrameric complex that inhibits, *via* the binding to a specific GAIT element (Sampath et al., 2004), translation of specific mRNAs involved in the inflammatory response. It is probably more than just a coincidence that, in two different species, the same aaRS escape a MSC and are used by cell signaling pathways to modulate expression of genes. Considering that in *S. cerevisiae* more than 500 macromolecular edifices assembling transiently, or more stably, on average 5 proteins have been identified, one may wonder how many of these might as well serve to transduce signals or to relocate multifunctional proteins.

## **Experimental Procedures**

### **Growth conditions and monitoring of the diauxic shift in glucose medium**

Classical conditions: a yeast culture composed of SCGlu medium seeded at 0.5  $A_{600\text{ nm}}$  with a saturated BY4741 starter is grown during 16 hours at 30°C in a Unitron incubator (Infors). The growth curve is obtained by following  $A_{600\text{ nm}}$  of the growing culture. The specific two-steps pattern of the diauxic shift is seen only in optimal oxygenation conditions by filling a 1 L or 5 L Erlen with 50 mL or 250 mL of medium in order to obtain optimal surface for liquid-gas exchange. SCGlu is composed of 6,75 g.L<sup>-1</sup> of Yeast Nitrogen Base, 2 g.L<sup>-1</sup> of Drop-Out mix minus Ade, His, Leu, Trp and Ura (US Biological), 20 mg.L<sup>-1</sup> of Ade, His, Ura, 50 mg.L<sup>-1</sup> of Trp, 250 mg.L<sup>-1</sup> of Leu and 20 g.L<sup>-1</sup> of glucose. Sterilisation is always made by filtration on 0.22 µm cartridges (Millipore).

### **Relative q-PCR experiments:**

All total mRNA samples are prepared with trizol® (Invitrogen), all cDNAs are prepared using AMV reverse transcriptase (MP biomedical) with 6 µg of total mRNA and a 16-mer polydT oligoDNA following recommendations of manufacturers. All q-PCR reaction mixtures are performed with 5 × HOT Pol® EvaGreen® qPCR Mix Plus Rox (Euromedex) and quantifications were performed in a MX3005P (Stratagene). Data were analyzed with the REST software (Pfaffl et al., 2002). Each value of the evolution of *ARCI*, *GUS1* and *MES1* mRNA amounts is made by measurement of the quantity of the three transcripts contained in total mRNA preparation from 10 mL aliquots of a BY4741 culture made in classical conditions. *ACT1*, *NUP57* and *NOPI* were used as internal references. Analysis of the

capacity to regulate *ARC1* transcription was obtained by comparing *ARC1* mRNA amount in total mRNA preparations from 10 mL of Knock-Out yeast strains grown in fermentation and respiration respectively 4 h or 12-16h in classical conditions. Preparation of total mRNA samples for quantification of the transcription of nuclear-encoded partners of the MRC in the ARC and nE strains (with WildType as reference) is made using 10 mL of a culture of each strain grown during 16h in SCGlu -Leu -Trp with 2% glucose in order to adapt to respiration. For the two latter, q-PCR experiments, *ACT1*, *NUP57*, *GUS1* and *MES1* were used as internal references.

### **Confocal live microscopy**

One mL of the *cyto*MRS-GFP strain grown in SCGlu -His up to 2-3  $A_{600\text{ nm}}$  (fermentation) or 7-8  $A_{600\text{ nm}}$  (respiration) was coloured with 3  $\mu\text{L}$  of Hoechst (5 mg/mL) during 10 min, then pelleted and washed with fresh medium. A 10  $\mu\text{L}$ -aliquot was resuspended, mounted on coverslips and observed with a Zeiss LSM510 confocal microscope, using a 63 $\times$  water immersion objective (NO 1.4). Images were processed with the AIM3.2 software. For ROS measurements, the WT, ARC, nE and nM strains were grown in SCGal -Leu-Trp up to 3  $A_{600\text{ nm}}$ , prior addition, during 20 min, of 10  $\mu\text{M}$  of 2', 7' dichlorofluorescein diacetate (DCF) in 1 mL of each of the three cultures (SCGal is equivalent to SCGlu except glucose is replaced by galactose). Cells were pelleted, washed with fresh medium and mounted on coverslips. Signals generated by ROS in each of the three strains were observed in the same conditions using the same confocal microscope than for colocalisation observations. Quantification of the signal intensity in all acquired images was made with Image J software.

### **Fast purification of nuclei and obtention of nuclear protein extracts.**

Yeast cells were pelleted at 1500g for 10 min, resuspended in 1 volume of Sorbitol buffer and broken in 50 mL Falcon previously filled with glass beads using a FastPrep® (MP Biomedicals) with a program of 6 pulses of 25 seconds each at 6 m.s<sup>-1</sup>. Broken cells were then centrifuged twice at 290g for 10 min and then twice at 430 g for 10 min. One additional centrifugation at 1200g for 5 min was done in order to progressively eliminate cell fragments and keep nuclei in the supernatant. Nuclei were then pelleted at 2900g for 15 min, resuspended in one volume of fresh sorbitol buffer and subjected to two additional differential centrifugation cycles composed of the two successive steps at 1200g and 2900g in order to purify nuclei from remaining cell fragments and other subcellular structures. For immunodetection purposes nuclear protein extracts were prepared as follows: fresh nuclei, suspended in lysis buffer, were disrupted by sonication (VibraCell BioblockScientific) and centrifuged 90 min at 105000g in order to pellet all cytosolic contaminants adsorbed on membrane fragments.

### **Acknowledgements**

We express our gratitude to Drs. I. Tarassov, N. Entelis, S. Friant, Mikhail Vysokykh and J. Mutterer for technical assistance and sharing of materials and equipment as well as to Philippe Hammann and Laurianne Kuhn for strong support during mass spectrometry investigations. This work was supported by a JST-CNRS Strategic Japanese-French Cooperative Program on “Structure and Function of Biomolecules: Response Mechanism to Environments”, the University of Strasbourg, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-09-BLAN-0091-02) and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC). M. Frechin holds a fellowship from the Association Française contre les Myopathies (AFM).

## Legends to figures

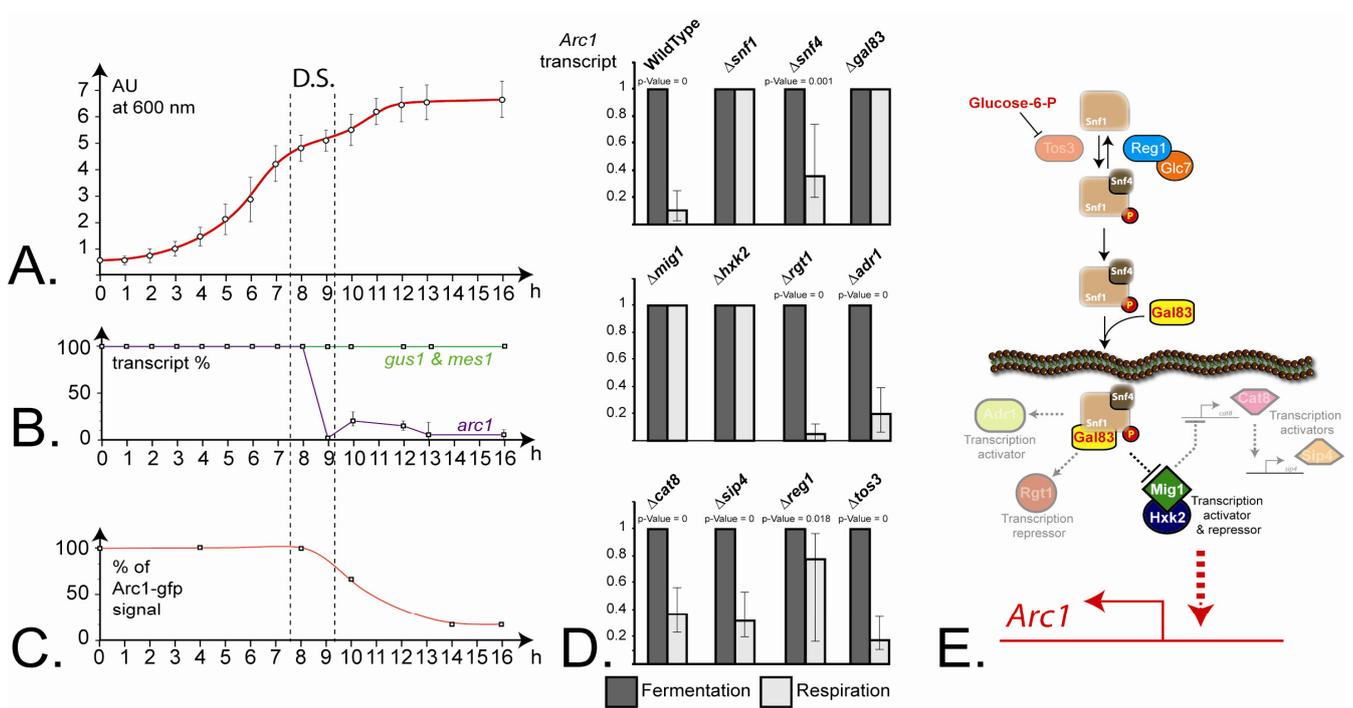
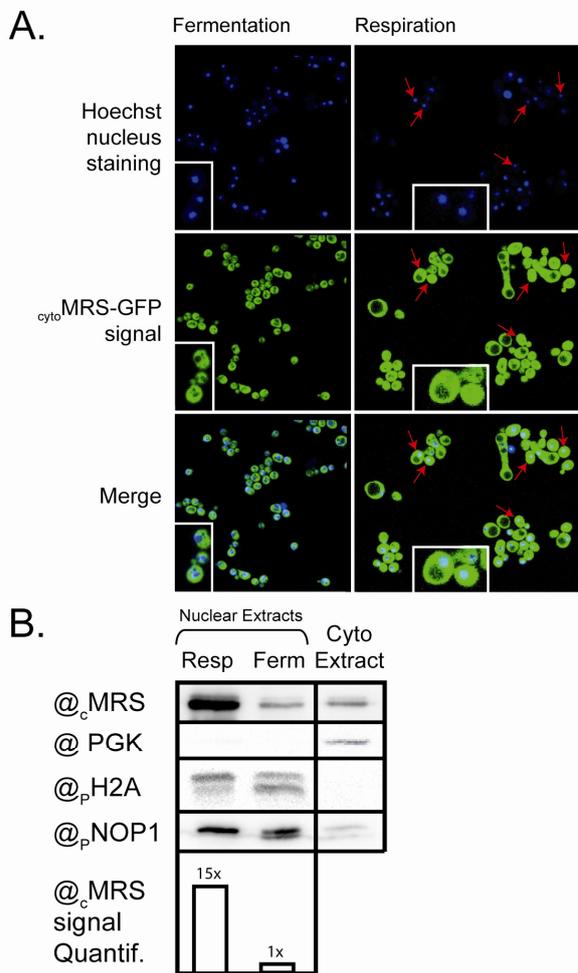


Figure 1, Frechin et al.

**Figure 1: *ARC1* transcription is repressed during the diauxic shift by the Snf1/Snf4 glucose-sensing pathway while *GUS1* and *MES1* transcription remains unaltered. (A) Conventional two-steps growth curve of a wild type *Saccharomyces cerevisiae* strain grown in SCGlu medium. During the first exponential phase (~0 to 8 h; 0-5  $A_{600\text{ nm}}$ ) the wild type BY4741 yeast strain ferments glucose into ethanol before reaching an intermediate plateau called diauxic shift (D.S). During this ~2h long step, yeast carries out its respiration adaptation that allows to start a second exponential growth phase (~starting at 10h, 5-7  $A_{600\text{ nm}}$ ) during which non-fermentable carbon sources like ethanol or glycerol are used with a notable augmentation of oxygen consumption (see Figure S1A). The curve is the result of four independent growth experiments. (B) Quantification of *GUS1*, *MES1* and *ARC1***

**transcription during classical growth conditions** shows that *ARCI* transcription is almost completely inhibited during the D.S. *ACT1*, *NUP57* and *NOPI* genes were used as internal reporters. Each curve is the result of three independent experiments. Plots without error bars are issued from a REST “not different” result (p-Value close to 1). **(C) Monitoring the cellular level of Arc1p using a strain expressing a GFP-fused Arc1p.** The chromosomal *arc1-gfp* gene is under the control of *ARCI*'s own promoter. The amount of Arc1p-GFP is measured by FACS (Becton Dickinson FacsCalibur). The decrease starts during the D.S, however, since GFP fusion proteins are usually more stable, native Arc1p real decrease must be faster. See also Figure S1. **(D) Quantification of *ARCI* mRNA in strains deleted from core genes of the Snf1/4 pathway.** Total mRNA extracts of the various strains were prepared from strains grown in SCGlu in classical conditions to reach fermentation (~4 h ) or respiration (12-16 h). After cDNA synthesis, the *ARCI* mRNA relative quantity in respiration versus fermentation was measured by q-PCR, using *ACT1*, *NUP57*, *MES1* and *GUS1* as internal references. Each measurement was done three times and experiments were repeated at least four times. Bars represent standard error. For controls in the other nutrient sensing pathways see Table S2. **(E) Schematic representation of the Snf1/4 pathway with its main components.** The network responsible for the specific regulation of *ARCI* is highlighted.



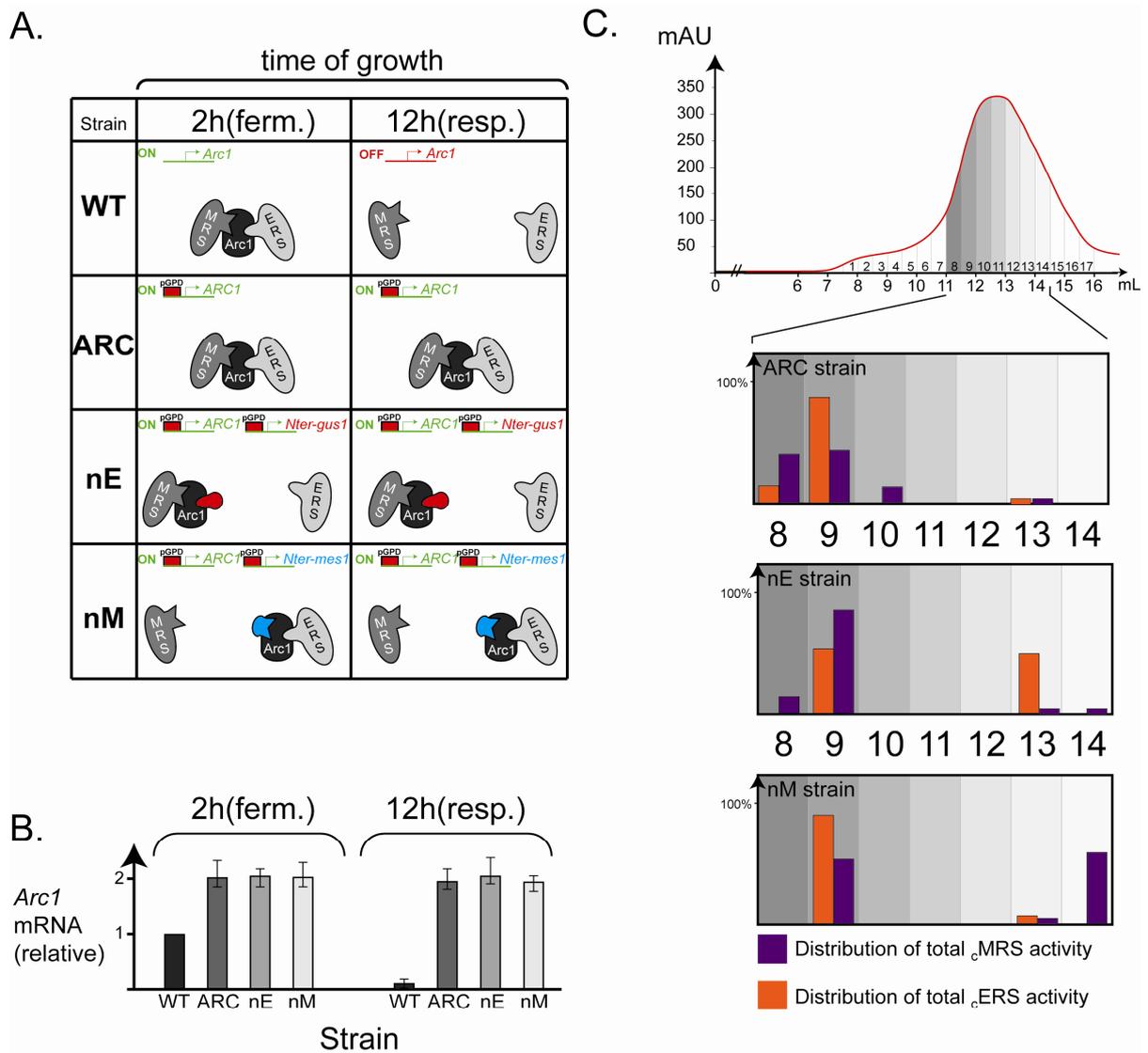
**Figure 2: Subcellular localization of  $_{\text{c}}$ MRS in fermenting and respiring yeast. (A) Subcellular localization of  $_{\text{c}}$ MRS-GFP fusion protein monitored by confocal microscopy.**

Focal planes of 0.6  $\mu\text{m}$  thickness were observed by live confocal microscopy.

The GFP fluorescent signal of a fermenting ( $\sim 3 A_{600 \text{ nm}}$ ) and respiring ( $\sim 7 A_{600 \text{ nm}}$ ) yeast strain encoding a chromosomal  $_{\text{cyto}}$ MRS-GFP gene controlled by its natural promoter is

**Figure 2, Frechin et al.** observed. Nuclei were stained with Hoechst. **(B) Quantification of the**

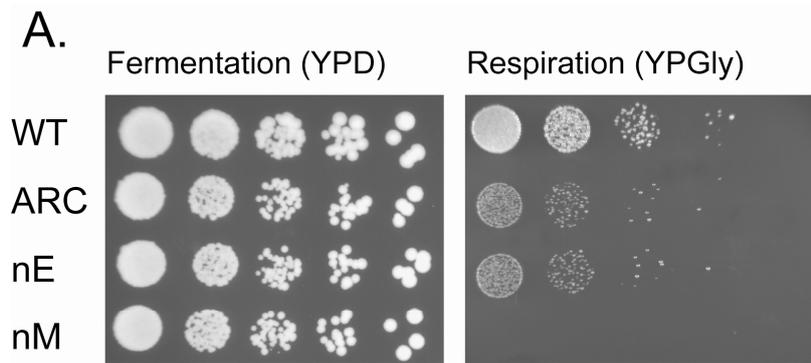
**relative enrichment in nuclear  $_{\text{c}}$ MRS when yeast switches to respiration.** Comparison of the quantity of  $_{\text{c}}$ MRS present in nuclear or cytosolic (cyto) protein extracts from yeast grown under respiratory (resp) or fermentation (ferm) conditions using anti- $_{\text{c}}$ MRS antibodies (@ $_{\text{c}}$ MRS). Nuclei were prepared as described in the Experimental procedures, using a fast purification protocol to limit passive diffusion of the nuclear proteins. Contamination of nuclear extracts by cytosolic proteins was checked using anti-PGK (@PGK) antibodies. Quantities of total nuclear proteins used for PAGE prior to blotting were normalized anti- $_{\text{p}}$ H2A (@ $_{\text{p}}$ H2A) and anti- $_{\text{p}}$ NOP1 (@ $_{\text{p}}$ NOP1) signals. Histograms represent the quantity of  $_{\text{c}}$ MRS in nuclei of respiring wild type yeast nuclei relative to nuclei of fermenting wild type yeast.



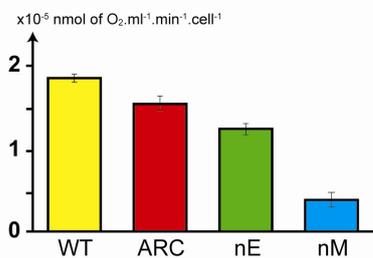
**Figure 3, Frechin et al.**

**Figure 3: Artificially desynchronizing release of  $\epsilon$ MRS and  $\epsilon$ ERS from Arc1p by competition with their N-terminal Arc1p binding domain. (A) Schematic description of the three strains engineered to desynchronize release of  $\epsilon$ MRS and  $\epsilon$ ERS. Arc1p, full-length or N-terminus (in blue) of  $\epsilon$ MRS and full-length or N-terminus (in red) of  $\epsilon$ ERS are schematized as well as their expected binding state, in complex or free in the wild type (WT), ARC, nE and nM strains grown under fermentation (ferm. 2 h) or respiratory (resp. 12 h) conditions. The ARC strain is obtained by transforming an *arc1Δ* strain with a p425GPD plasmid carrying the *ARC1* gene (in gree) under the control of the strong and constitutive**

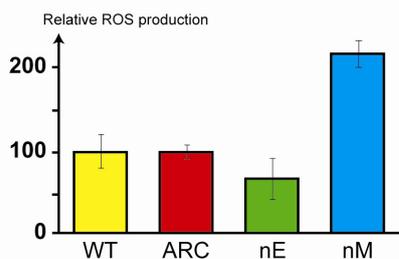
promoter GPD ( $p_{\text{GPD}}$ ) and with the empty p424 plasmid. The nE strain is obtained by transforming the ARC strain with a second p424GPD plasmid carrying the gene encoding for the first 190 aa (Nter-gus1, in red) of the  $\epsilon$ ERS. The nM strain is obtained by transforming the ARC strain with a p424GPD plasmid overexpressing the first 160 aa (Nter-mes1, in blue) of the  $\text{cytoMRS}$ . Control wild type strain (WT) was transformed with the empty p425 and p424 plasmids. **(B) Comparison of the relative quantity of ARC1 mRNA in the WT, ARC, nE and nM strains after 2h or 12h of culture.** The quantities of *ARC1* mRNA, determined by qRT-PCR, present in the WT, ARC, nE and nM strains grown in fermentation (2h) or in respiratory (12 h) conditions were compared to that of the WT strain grown in fermentation. **(C) Analysis by size-exclusion chromatography of the release of  $\epsilon$ MRS and  $\epsilon$ ERS from the AME complex in the ARC, nE and nM strains.** Size-exclusion chromatographies were performed on total extract of the ARC, nE and nM strains. The three elution profiles (mAU as a function of retention in mL) were identical to that of the ARC strain which is displayed. The same quantity of proteins in each fraction (500  $\mu\text{L}$ ) was tested for its capacity to form [ $^{14}\text{C}$ ]Glu-tRNA ( $\epsilon$ ERS specific activity, orange histograms) or [ $^{35}\text{S}$ ]Met-tRNA ( $\epsilon$ MRS specific activity, violet histograms).



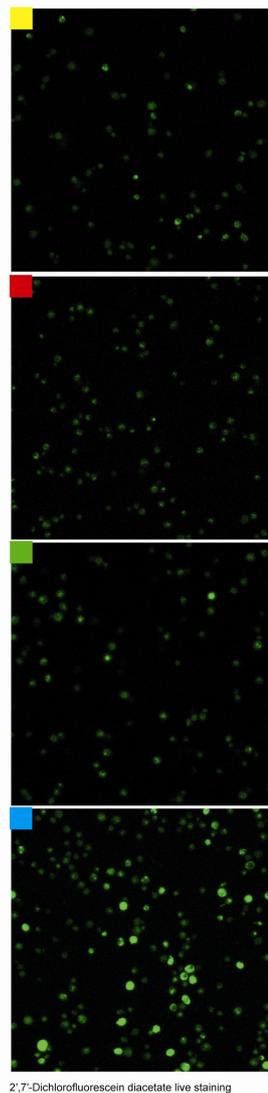
**B.**



**D.**



**C.**



**Figure 4: Synchronized release of both  $\epsilon$ MRS and  $\epsilon$ ERS by Arc1p is essential for adaptation of yeast to respiration. (A) Analysis of the capacity of the wild type (WT), ARC, nE and nM strains to ferment or respire by drop tests on glucose and glycerol media.**

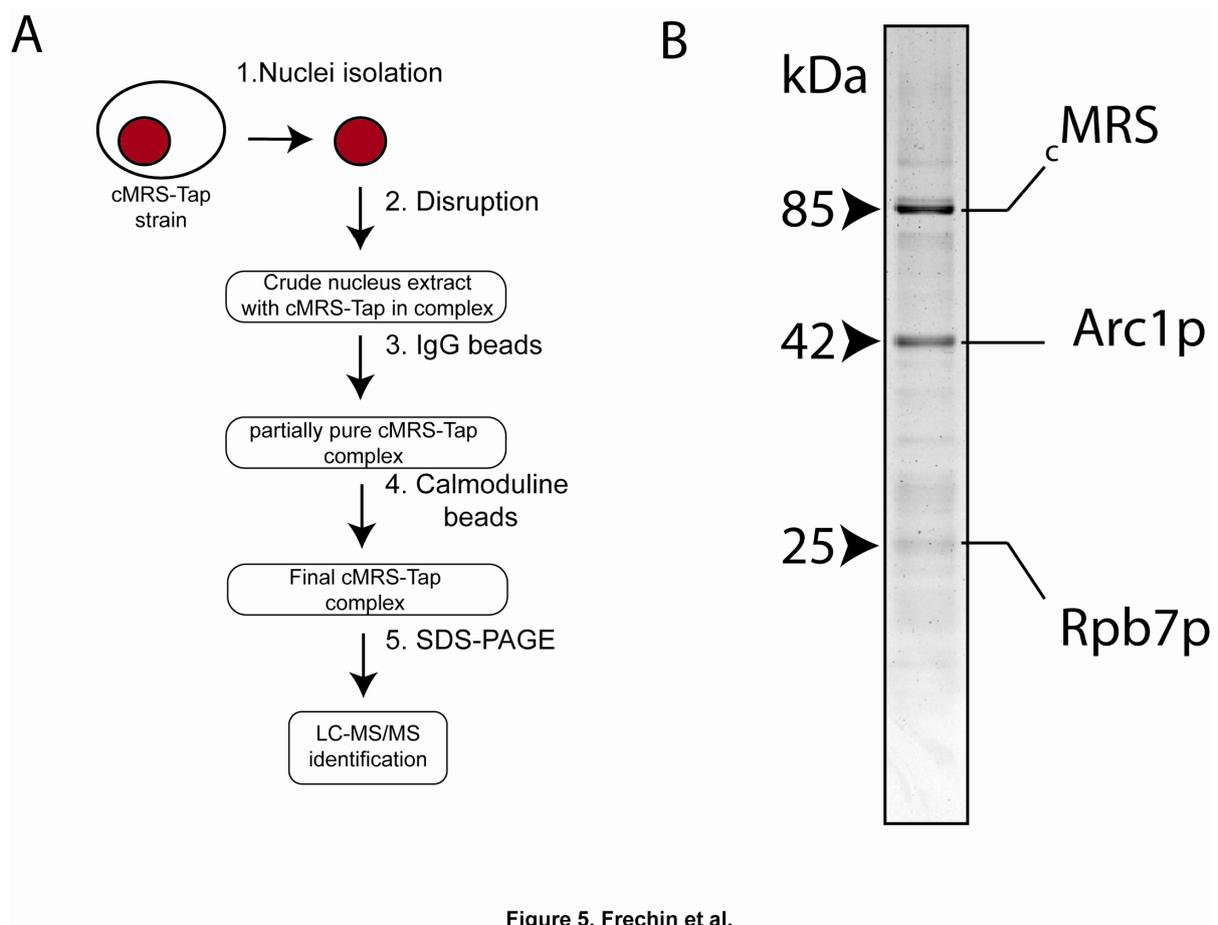
The four strains were grown in SC -Leu-Trp with 2% glucose up to 2 A 600<sub>nm</sub>, plated on glucose- (YPD) or glycerol- (YPGly) media and grown at 30°C for three days. Each dot represents a ten-fold dilution and of the previous one. **(B)**

**Comparative analysis of the oxygen consumption**

Figure 4, Frechin et al.

**capacity of the WT, ARC, nE and nM strains.** The four strains were grown in SCGalactose -Leu-Trp up to 2 A 600<sub>nm</sub>. Histograms represent the uncoupled maximal O<sub>2</sub> consumption speed measured in an oxymeter (Hansatech oxygraph) using the same quantity of cells of the WT (yellow), ARC (red), nE (green) and nM (blue) strain dissolved in fresh SC medium.

Background oxygen consumption obtained after cyanide treatment is subtracted from the initial measured value. **(C) Evaluation of the ROS produced by the WT, ARC, nE and nM strains by confocal microscopy on 2', 7' dichlorofluorescein diacetate (DCF) -treated cells.** Each strain was grown like in **(B)**, treated with 4  $\mu\text{M}$  of DCF for 20 minutes and images were acquired using a Zeiss LSM 510 confocal microscope with the same settings. The colour code, indicated by squares in the top left corner of the images, refers to the strains as follows: yellow: WT, red: ARC, green: nE and blue: nM. **(D) Relative quantification of the ROS production in the four strains.** Measurements were done using image J, on four different images of cells from each strain treated and observed as in **(C)**.



**Figure 5: Identification of the nuclear interactants of  $\epsilon$ MRS by Tandem Affinity purification coupled to LC:MS/MS. (A) Schematized TAP strategy used for the identification of  $\epsilon$ MRS nuclear interactants.** Nuclei are purified using the fast purification procedure described in the Experimental Procedures. **(B) G250 Colloidal Blue-stained SDS-PAGE separation of the  $\epsilon$ MRS-TAP nuclear interactants purified by Tandem Affinity Purification.** The Tap purification procedure that was used included each time repeated washing steps. The contamination of Arc1p bound to the nuclear pool of  $\epsilon$ MRS-TAP is due to the use of the fast purification procedure of nuclei. When regular purification of nuclei was used, no contamination by Arc1p was observed (see Figure S3). Proteins mentioned on the figure were identified by LC:MS/MS, for other additional interactants see Table S5.

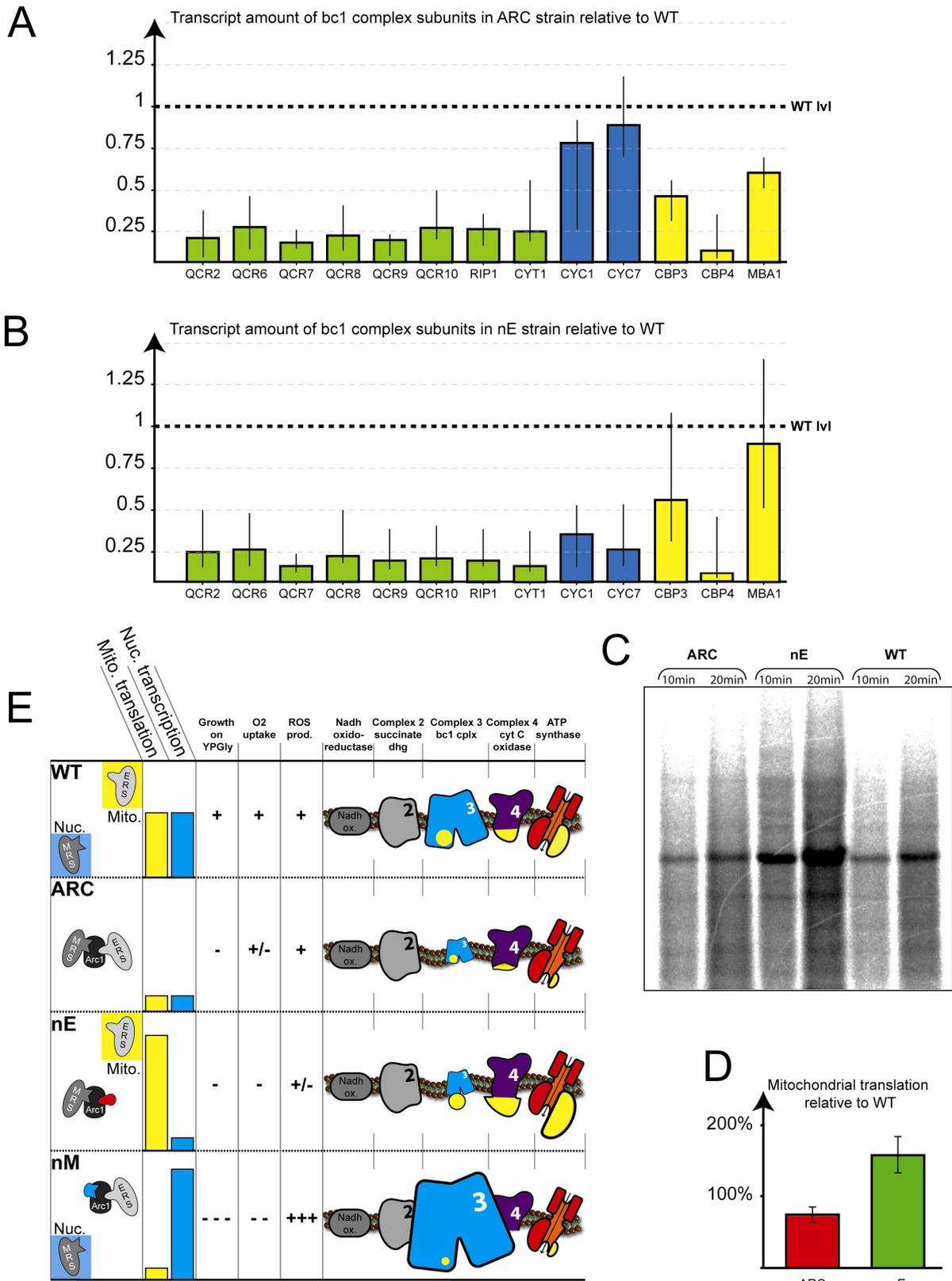


Figure 6, Frechin et al.

**Figure 6: Synchronization of nuclear transcription and mitochondrial translation of the genes of RC subunits is controlled by  $\epsilon$ MRS and  $\epsilon$ ERS released from Arc1p. (A and B) Relative q-PCR analysis of the transcription of the nuclear genes encoding subunits of the bc1 complex in the ARC (A) and nE (B) strains that sequesters  $\epsilon$ MRS in the cytosol compared to the WT strain.** Green histograms represent genes of core components of the bc1 complex, yellow histograms those of proteins involved in assembly of this complex and its insertion in the inner membrane and blue histograms alternative genes for cytochrome C. Squares represent standard errors and middle bars mean values, all p-values were below 0.002. Measurements were done using four genes as internal references, *ACT1*, *GUS1*, *NUP57* and *MES1*. For the effect of nuclear  $\epsilon$ MRS on transcription of other genes of the respiratory chain subunits encoded in the nucleus see Table S6A. **(C) PAGE monitoring the efficiency of protein synthesis in the mitochondria of the ARC, nE and WT strains.** Cytosolic proteins synthesis was inhibited using cycloheximide and mitochondrial protein synthesis is visualized by incorporation of [<sup>35</sup>S]Methionine in newly synthesized proteins. **(D) Comparison of the mitochondrial translation efficiency between the ARC and nE strains.** The quantity of total [<sup>35</sup>S]-radiolabeled mitochondrial proteins of the ARC and nE strains, relative to the WT strain, was measured using Image Quant on 4 independent PAGE experiments like the one shown in (C). **(E) Schematic summary of all effects triggered by desynchronizing release of  $\epsilon$ MRS and  $\epsilon$ ERS from Arc1p.** The state, released or anchored on Arc1p, of  $\epsilon$ MRS and  $\epsilon$ ERS in the WT, ARC, nE and nM strains is shown (first column). The level mitochondrial translation (yellow histograms) and nuclear transcription (blue histograms), is indicated. The growth phenotype on YPGly, the oxygen uptake and the ROS

production ranging from normal level (+) to severe decrease (---) or increase (+++) is shown. The respiratory chain complexes are schematized and the subunits under transcriptional control of  $\rho$ MRS are in blue and those under translational control of  $\rho$ ERS in are in yellow. The effect on transcription or translation, increase or decrease, of the subunits of the complexes controlled  $\rho$ MRS and  $\rho$ ERS in the WT, ARC, nE and nM strains are symbolized by increased or decreased sizes of the corresponding complexes.

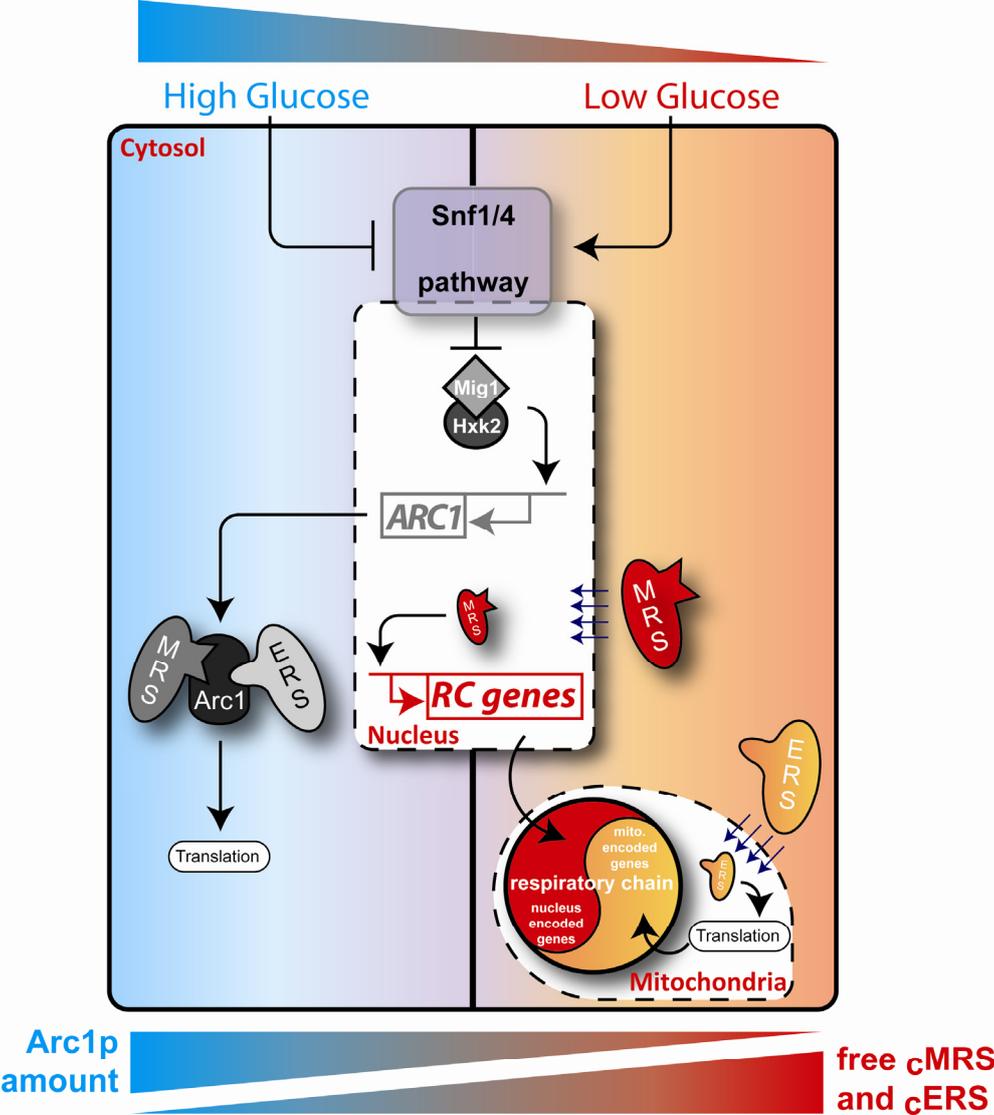


Figure 7, Frechin et al.

**Figure 7: Summary of spatio/temporal control of the release of  $\text{cMRS}$  and  $\text{cERS}$  from the AME complex and their role in adaptation of yeast to respiration.** Under high concentration of glucose, the Snf1/4 pathway is turned off ( $\dashv$ ) and the Mig1/Hxk2 complex stimulates ( $\rightarrow$ ) *ARC1* transcription ( $\leftarrow$ ) and therefore Arc1p production. When the glucose level decreases and reaches a critical threshold, the need to use non fermentable carbon sources stimulates ( $\rightarrow$ ) the Snf1/4 pathway, inhibiting ( $\dashv$ ) the transcription of *ARC1* via phosphorylation and subsequent export of Mig1 outside the nucleus.  $\text{cytoMRS}$  and  $\text{cytoERS}$  are progressively found into their free forms and imported (blue arrows) in the nucleus and the mitochondria respectively, in order to synchronize the nuclear transcription ( $\blacktriangleright$ ) and mitochondrial translation of partners of the respiratory chain.

## References

- Ahuatzi, D., Herrero, P., de la Cera, T., and Moreno, F. (2004). The glucose-regulated nuclear localization of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is Mig1-dependent. *J Biol Chem* 279, 14440-14446.
- Averet, N., Fitton, V., Bunoust, O., Rigoulet, M., and Guerin, B. (1998). Yeast mitochondrial metabolism: from in vitro to in situ quantitative study. *Mol Cell Biochem* 184, 67-79.
- Brauer, M.J., Saldanha, A.J., Dolinski, K., and Botstein, D. (2005). Homeostatic adjustment and metabolic remodeling in glucose-limited yeast cultures. *Mol Biol Cell* 16, 2503-2517.
- Brown, M. V., Reader, J. S. and Tzima, E. (2010). Mammalian aminoacyl-tRNA synthetases: Cell signaling functions of the protein translation machinery. *Vascular pharmacology* 52, 21-26.

- Chen, Q., Vazquez, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., and Lesnefsky, E.J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 278, 36027-36031.
- Choder, M. (2004). Rpb4 and Rpb7: subunits of RNA polymerase II and beyond. *Trends Biochem Sci* 29, 674-681.
- Coenen, M.J., van den Heuvel, L.P., and Smeitink, J.A. (2001). Mitochondrial oxidative phosphorylation system assembly in man: recent achievements. *Curr Opin Neurol* 14, 777-781.
- Eisenberg, T., Buttner, S., Kroemer, G., and Madeo, F. (2007). The mitochondrial pathway in yeast apoptosis. *Apoptosis* 12, 1011-1023.
- Forsburg, S.L., and Guarente, L. (1989). Communication between mitochondria and the nucleus in regulation of cytochrome genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Cell Biol* 5, 153-180.
- Frechin, M., Kern, D., Martin, R.P., Becker, H.D., and Senger, B. (2010). Arc1p: anchoring, routing, coordinating. *FEBS Lett* 584, 427-433.
- Frechin, M., Senger, B., Braye, M., Kern, D., Martin, R.P., and Becker, H.D. (2009). Yeast mitochondrial Gln-tRNA(Gln) is generated by a GatFAB-mediated transamidation pathway involving Arc1p-controlled subcellular sorting of cytosolic GluRS. *Genes Dev* 23, 1119-1130.
- Galani, K., Grosshans, H., Deinert, K., Hurt, E.C., and Simos, G. (2001). The intracellular location of two aminoacyl-tRNA synthetases depends on complex formation with Arc1p. *EMBO J* 20, 6889-6898.
- Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., *et al.* (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141-147.

- Golinelli-Cohen, M.P., and Mirande, M. (2007). Arc1p is required for cytoplasmic confinement of synthetases and tRNA. *Mol Cell Biochem* 300, 47-59.
- Gong, Y., Kakihara, Y., Krogan, N., Greenblatt, J., Emili, A., Zhang, Z., and Houry, W.A. (2009). An atlas of chaperone-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*: implications to protein folding pathways in the cell. *Mol Syst Biol* 5, 275.
- Graindorge, J.S., Senger, B., Tritch, D., Simos, G. and Fasiolo, F. (2005). Role of Arc1p in the modulation of yeast glutamyl-tRNA synthetase activity. *Biochemistry* 44, 1344-52.
- Hausmann, C.D. and Ibba, M. (2008). Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: molecular multitasking revealed. *FEMS Microbiol Rev* 32, 705-21.
- Ibba, M. and Söll, D. (2000). Aminoacyl-tRNA synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 617–50.
- Jiang, R., and Carlson, M. (1996). Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes Dev* 10, 3105-3115.
- Kaminska, M., Havrylenko, S., Decottignies, P., Gillet, S., Le Marechal, P., Negrutskii, B. and Mirande, M. (2009). Dissection of the structural organization of the aminoacyl-tRNA synthetase complex. *J Biol Chem* 284, 6053-60.
- Karanasios, E., Simader, H., Panayotou, G., Suck, D., and Simos, G. (2007). Molecular determinants of the yeast Arc1p-aminoacyl-tRNA synthetase complex assembly. *J Mol Biol* 374, 1077-1090.
- Ko, Y.G., Kang, Y.S., Kim, E.K., Park, S.G., and Kim, S. (2000). Nucleolar localization of human methionyl-tRNA synthetase and its role in ribosomal RNA synthesis. *J Cell Biol* 149, 567-574.
- Krogan, N.J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A.P., *et al.* (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 440, 637-643.

- Kronekova, Z., and Rodel, G. (2005). Organization of assembly factors Cbp3p and Cbp4p and their effect on bc(1) complex assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 47, 203-212.
- Li, R., and Guan, M.X. (2010). Human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase corrects mitochondrial dysfunctions due to the tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) A3243G mutation, associated with mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like symptoms and diabetes. *Mol Cell Biol* 30, 2147-2154.
- Liu, Z., and Butow, R.A. (2006). Mitochondrial retrograde signaling. *Annu Rev Genet* 40, 159-185.
- McCartney, R.R., and Schmidt, M.C. (2001). Regulation of Snf1 kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *J Biol Chem* 276, 36460-36466.
- Muller, F.L., Liu, Y., and Van Remmen, H. (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 279, 49064-49073.
- Mumberg, D., Muller, R., and Funk, M. (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* 156, 119-122.
- Negrutskii, B.S., Stapulionis, R. and Deutscher, M.P. (1994). Supramolecular organization of the mammalian translation system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 964-8.
- Niu, W., Li, Z., Zhan, W., Iyer, V.R., and Marcotte, E.M. (2008). Mechanisms of cell cycle control revealed by a systematic and quantitative overexpression screen in *S. cerevisiae*. *PLoS Genet* 4, e1000120.
- Otterstedt, K., Larsson, C., Bill, R.M., Stahlberg, A., Boles, E., Hohmann, S., and Gustafsson, L. (2004). Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Rep* 5, 532-537.

- Park, S.G., Schimmel, P. and Kim, S. (2008). Aminoacyl tRNA synthetases and their connections to disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 11043–11049.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* *30*, e36.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* *24*, 218-229.
- Rahner, A., Scholer, A., Martens, E., Gollwitzer, B., and Schuller, H.J. (1996). Dual influence of the yeast Cat1p (Snf1p) protein kinase on carbon source-dependent transcriptional activation of gluconeogenic genes by the regulatory gene CAT8. *Nucleic Acids Res* *24*, 2331-2337.
- Ray, P.S., Arif, A. and Fox, P.L. (2007). Macromolecular complexes as depots for releasable regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.* *32*, 158–164.
- Rep, M., and Grivell, L.A. (1996). MBA1 encodes a mitochondrial membrane-associated protein required for biogenesis of the respiratory chain. *FEBS Lett* *388*, 185-188.
- Rho, S.B., Lincecum Jr., T.L. and Martinis, S.A., (2002). An inserted region of leucyl-tRNA synthetase plays a critical role in group I intron splicing. *EMBO J.* *21*, 6874–6881.
- Ryan, M.T., and Hoogenraad, N.J. (2007). Mitochondrial-nuclear communications. *Annu Rev Biochem* *76*, 701-722.
- Sampath, P., Mazumder, B., Seshadri, V., Gerber, C.A., Chavatte, L., Kinter, M., Ting, S.M., Dignam, J.D., Kim, S., Driscoll, D.M. and Fox, P.L. (2004). Noncanonical function of glutamyl-prolyl-tRNA synthetase: gene-specific silencing of translation. *Cell* *119*, 195–208.

- Santangelo, G.M. (2006). Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* *70*, 253-282.
- Schagger, H., and Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* *19*, 1777-1783.
- Schimmel, P. and Ribas De Pouplana, L. (2000). Footprints of aminoacyl-tRNA synthetases are everywhere. *Trends Biochem. Sci.* *25*, 207–209.
- Schuller, H.J. (2003). Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* *43*, 139-160.
- Simader, H., Hothorn, M., Kohler, C., Basquin, J., Simos, G., and Suck, D. (2006). Structural basis of yeast aminoacyl-tRNA synthetase complex formation revealed by crystal structures of two binary sub-complexes. *Nucleic Acids Res* *34*, 3968-3979.
- Simos, G., Segref, A., Fasiolo, F., Hellmuth, K., Shevchenko, A., Mann, M. and Hurt, E.C. (1996). The yeast protein Arc1p binds to tRNA and functions as a cofactor for the methionyl- and glutamyl-tRNA synthetases. *EMBO J* *15*, 5437-48.
- Söll, D. and Schimmel, P.R. (1974) Aminoacyl-tRNA synthetases. *The Enzymes* *10*, 489–538.
- Stewart, T.S., Roberts, R.J. and Strominger, J.L. (1971) Novel species of tRNA. *Nature* *230*, 36–38.
- Vincent, O., and Carlson, M. (1999). Gal83 mediates the interaction of the Snf1 kinase complex with the transcription activator Sip4. *EMBO J* *18*, 6672-6681.
- Von Plehwe, U., Berndt, U., Conz, C., Chiabudini, M., Fitzke, E., Sickmann, A., Petersen, A., Pfeifer, D., and Rospert, S. (2009). The Hsp70 homolog Ssb is essential for glucose sensing via the SNF1 kinase network. *Genes Dev* *23*, 2102-2115.
- Wakasugi, K.. and Schimmel, P. (1999). Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase. *Science* *284*, 147–151.

- Yang, X., Jiang, R., and Carlson, M. (1994). A family of proteins containing a conserved domain that mediates interaction with the yeast SNF1 protein kinase complex. *EMBO J* 13, 5878-5886.
- Yin, Y., Yang, S., Yu, L., and Yu, C.A. (2010). Reaction mechanism of superoxide generation during ubiquinol oxidation by the cytochrome bc1 complex. *J Biol Chem* 285, 17038-17045.
- Zaman, S., Lippman, S.I., Zhao, X., and Broach, J.R. (2008). How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu Rev Genet* 42, 27-81.

## **Supplemental Information**

### **Extended Experimental Procedures**

#### **Fast purification of nuclei and preparation of nuclear protein extracts.**

Sorbitol buffer is composed of 1.1M Sorbitol and lysis buffer of 50 mM Hepes-Na at pH7.2 and 50 mM NaCl, both contains also 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol and protease inhibitor cocktail cOmplete®, EDTA-free (Roche). Evolution of the saturation of O<sub>2</sub> was monitored in a Labfors® bioreactor (Infors).

#### **Immunodetection analysis and FACS fluorescence measurements**

BY4741 S100 extracts were used as controls to visualize the proportion of the  $\rho$ MRS cytosolic fraction and for Arc1p quantification. For all extracts, protein concentration was determined using Bradford, and 10–15  $\mu$ g of proteins were separated by SDS-PAGE on a 12% gel prior to electroblotting onto Hybond-P® membrane (Amersham). Detection was carried out using anti-rabbit or anti-mouse goat antibodies, HRP-conjugated (Bio-Rad) and ECL-plus® reagents (Amersham) according to the manufacturer's instructions. We used rabbit anti- $\rho$ MRS

primary antibody (1:5000) to quantify the amount of  $\epsilon$ MRS in each extract. To control the relative quantity and purity of our nuclear extracts, we used as a nuclear protein marker the phosphorylated Histone 2A and the Nop1 nucleolar protein, which were detected using mouse anti-pH2A (1:1000) and mouse anti-Nop1 (1:2000) both from Abcam, and as a cytosolic marker, PGK, which was revealed using mouse anti-PGK (1:2000). The quantifications of Arc1p and  $\epsilon$ ERS, used as controls, were done using anti-Arc1p (1:5000) and anti- $\epsilon$ ERS (1:5000) rabbit antibodies. Evolution of the Arc1-GFP signal in classical conditions was monitored in a FACS Calibur from BD Biosciences by measuring the mean fluorescence generated by  $1 \times 10^5$  ARC1-GFP cells grown in SCGlu -His with 2% Glucose. Aliquots were taken during 16 h.

### **Engineering of the ARC, nE and nM strains and oximetry measurements**

The *arc*, *nE* and *nM* DNA fragments were synthesized by Genscript and subcloned into p425GPD (*arc*) and p424GPD (*nE* and *nM*) (Mumberg et al., 1995) between the SallI and SacI restriction sites. An *arc1* $\Delta$  strain was transformed with the p425GPD-*arc* recombinant plasmid and subsequently transformed with the empty p424GPD, p424GPD-*nE* or p424GPD-*nM* plasmids yielding respectively the ARC, nE and nM strains. Control Wild Type strain was BY4741 cotransformed with the p425GPD and p424GPD empty plasmids. These four strains were grown in SCGal -Leu -Trp with 2% Galactose up to 2 A<sub>600 nm</sub> and 300  $\mu$ L aliquots of each culture was mixed with 700  $\mu$ L of fresh medium in the hermetic chamber of an Hansatech oxygraph® oximeter. Rates of O<sub>2</sub> consumption were measured after addition of carbonylcyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) at the final concentration of 2  $\mu$ M and corrected by subtraction of 2 mM KCN-insensitive respiration.

### **Tandem affinity purification**

Nuclei from  $\rho$ MRS-TAP strain were purified as described above from 2 L of cells grown in respiration. The S100 obtained after sonication of nuclei in buffer A and 90 min of centrifugation at 105000g was subjected to the TAP procedure as described previously (Puig et al., 2001) except that washing steps after each binding on IgG and Calmoduline beads were repeated once.

### **Measurements of mitochondrial translation rates**

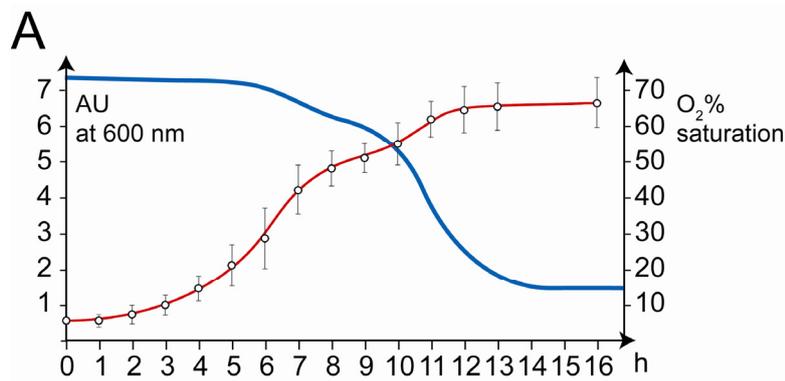
Mitochondrial translation labelling for the WT, ARC and nE strains were performed as described in (Barrientos et al., 2002). Protein extracts were separated by SDS-PAGE and the resulting 12% gel was dried and revealed by scanning the 1-h-exposed image plate with a Fuji Bioimager. Amounts of [ $^{35}$ S]-methionine-containing proteins in each lane were quantified using the ImageQuant software.

### **Protein digestion for nano-LC-MS/MS studies**

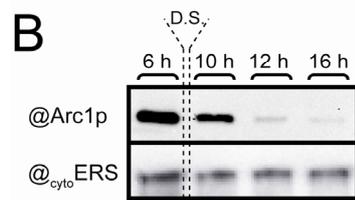
Protein bands were manually excised from the gels and transferred into 96-well microtitration plates. Excised gel samples were cut in small pieces and washed three times by incubation in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  for 15 min and then in 50% (v/v) acetonitrile containing 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  for 15 min. Samples were then dehydrated with 100% acetonitrile and then reduced with 10 mM DTT during 1 h before being alkylated with 55 mM iodoacetamide for 1 h in the dark. Gel pieces were washed again with the destaining solutions described above. 0.250  $\mu\text{g}$  of modified trypsin (Promega, sequencing grade) in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  were added to the dehydrated gel spots depending on protein amount. After 30 min incubation at room temperature, 20  $\mu\text{L}$  of 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  were added on gel pieces before incubation overnight at 37°C. Peptides were then extracted from gel pieces in 20  $\mu\text{L}$  of 50% acetonitrile / 5% formic acid.

### **Nano-LC-MS/MS analysis.**

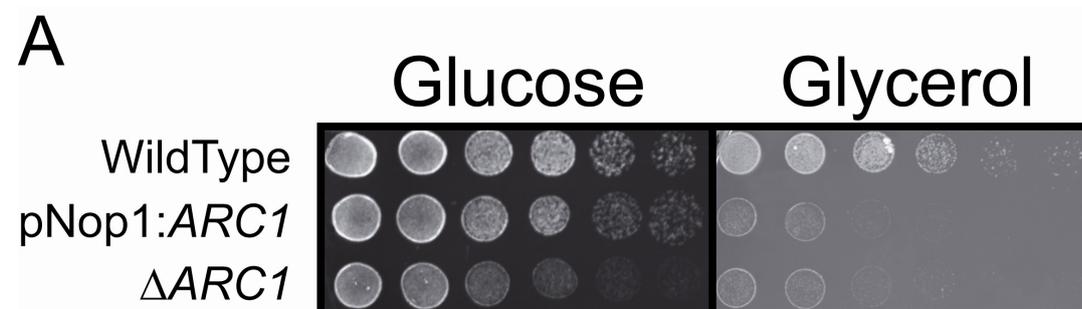
For nano-LC-MS/MS analysis, the dried extracted peptides were transferred in vials compatible with nano-LC-MS/MS analysis (Ultimate 3000, Dionex and MicroTOF-Q, Bruker). The method consisted in a 60-min gradient at a flow rate of 300 nL/min using a gradient from two solvents: A (0.1% formic acid in water) and B (0.08% formic acid in acetonitrile). The system includes: a 300  $\mu\text{m}$   $\times$  5 mm PepMap C18 precolumn (Dionex) in order to pre-concentrate peptides and a 75  $\mu\text{m}$   $\times$  150mm C18 column (Dionex) used for peptide elution. MS and MS/MS data were acquired in a data-dependent mode using Hystar (Bruker) and processed using Mascot software (Matrix Science). Consecutive searches against the NCBI nr database first and then against the *S. cerevisiae* taxonomy were performed for each sample using an intranet version of Mascot 2.0. Peptide modifications allowed during the search were: N-acetyl (protein), carbamidomethylation(C) and oxidation (M). The other parameters were: peptide tolerance = 0.4 Da, MS/MS tolerance = 0.4 Da, 2 missed cleavage sites by trypsin allowed. Proteins showing two peptides with a score higher than the query threshold (p-value<0.05) were automatically validated with Proteinscape (Bruker). Each protein identified by only one peptide was checked manually using the classical fragmentation rules.



**Supplemental figure 1.**  
**A. Evolution of the O<sub>2</sub> concentration during classical growth in SCGlu.** After the diauxic shift the medium O<sub>2</sub> saturation decrease from 75% to 15% because of the use of the respiration metabolism. **B. Western blot analysis of the evolution of Arc1p quantity during adaptation to respiration in classical growth conditions.** D.S means diauxic



shift. Time plots are relative to the time of growth of yeast in SCGlu 2% in conditions defined above.



**Supplemental figure 2. (A) Analysis of the capacity of the wild type (WT), pNop1:ARC1, and  $\Delta$ ARC1 strains to ferment or respire by drop tests on glucose and glycerol media.** The three strains were grown in SC (or SC -Ura for pNop1:ARC1) with 2% glucose up to 2 A 600<sub>nm</sub>, plated on glucose- (YPD) or glycerol- (YPGly) media and grown at 30°C for three days. Each dot represents a ten-fold dilution of the previous one.

Strain	Genotype	Source
BY4742 (Wild type)	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1, leu2<math>\Delta</math>0, lys2<math>\Delta</math>0, ura3<math>\Delta</math>0</i>	Euroscarf
tos3 $\Delta$	<i>Mat<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YGL179c::kanMX4</i>	Euroscarf
reg1 $\Delta$	<i>Mat<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YDR028c::kanMX4</i>	Euroscarf
snf1 $\Delta$	<i>Mat<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YDR477w::kanMX4</i>	Euroscarf
snf4 $\Delta$	<i>Mat<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YGL115w::kanMX4</i>	Euroscarf
gal83 $\Delta$	<i>Mat<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YER027c::kanMX4</i>	Euroscarf
mig1 $\Delta$	<i>Mat<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YGL035c::kanMX4</i>	Euroscarf
adr1 $\Delta$	<i>Mat<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YDR216w::kanMX4</i>	Euroscarf
cat8 $\Delta$	<i>Mat<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YMR280c::kanMX4</i>	Euroscarf
sip4 $\Delta$	<i>Mat<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YJL089w::kanMX4</i>	Euroscarf
hvk2 $\Delta$	<i>Mat<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YGL253w::kanMX4</i>	Euroscarf
tpk1 $\Delta$	<i>Mat<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YJL164c::kanMX4</i>	Euroscarf
tpk2 $\Delta$	<i>Mat<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YPL203w::kanMX4</i>	Euroscarf

tpk3 $\Delta$	<i>Mat<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YKL166c::kanMX4</i>	Euroscarf
tor1 $\Delta$	<i>Mat<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YJR066w::kanMX4</i>	Euroscarf
pkh1 $\Delta$	<i>Mat<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YDR490c::kanMX4</i>	Euroscarf
gpa1 $\Delta$	<i>Mat<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YHR005c::kanMX4</i>	Euroscarf
ras1 $\Delta$	<i>Mat<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YOR101w::kanMX4</i>	Euroscarf
yak1 $\Delta$	<i>Mat<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YJL141c::kanMX4</i>	Euroscarf
rgt1 $\Delta$	<i>Mat<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YKL038w::kanMX4</i>	Euroscarf
arc1 $\Delta$	<i>Mat<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YGL105w::kanMX4</i>	Euroscarf
WildType (WT)	<i>Mat<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0;, p425GPD, p424GPD</i>	Euroscarf
pNOP-ARC1	<i>Mat<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YGL105w::kanMX4, pRS316-pNOP-ARC1</i>	this work
ARC	<i>Mat<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YGL105w::kanMX4, p425GPD-ARC1, p424GPD</i>	this work
nM	<i>Mat<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YGL105w::kanMX4, p425GPD-ARC1, p424GPD-N MRS</i>	this work
nE	<i>Mat<math>\alpha</math>, his3<math>\Delta</math>1; leu2<math>\Delta</math>0; lys2<math>\Delta</math>0; ura3<math>\Delta</math>0; YGL105w::kanMX4, p425GPD-ARC1, p424GPD-N ERS</i>	this work
MRS-TAP	<i>MATa ade2 arg4 leu2-3,112 trp1-289 ura3-52, YGR264c-TAP:URA3</i>	CellZome
ARC-GFP	<i>MATa, his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0, YGL105w-GFP :HIS3MX6</i>	In vitrogen
MRS-GFP	<i>MATa, his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0, YGR264c-GFP:HIS3MX6</i>	In vitrogen

Table S1: Yeast strains used or engineered during this study

---

Expression	p-value	Std Error	ARC1 transcript.
			inhibition

---

Wild type	0.106	0.000	0.021-0.315	yes
$\Delta$ pkh1	0.047	0.000	0.005-0.368	yes
$\Delta$ tor1	0.065	0.005	0.035-0.111	yes
$\Delta$ tpk1	0.062	0.002	0.007-0.388	yes
$\Delta$ tpk2	0.032	0.002	0.018-0.056	yes
$\Delta$ gpa2	0.062	0.000	0.007-0.467	yes
$\Delta$ ras1	0.132	0.000	0.080-0.216	yes

Table S2 *ARCI* transcription (transcript.) is still inhibited during adaptation to respiration in strains deleted of essential genes of the TOR and PKA pathway (Std: standard).

Gene	Expression	p-value	Std Error	variation
FMC1	0,547	0,049	0,284 - 1,091	NO
ATP1	0,496	0,001	0,366 - 0,688	Down
ATP2	0,606	0,007	0,432 - 0,886	Not Clear
ATP3	0,340	0,000	0,148 - 0,609	Down
ATP5	2,269	0,025	1,818 - 2,968	Not Clear
ATP4	1,276	0,633	0,747 - 2,256	NO
ATP7	0,781	0,605	0,434 - 1,330	NO
ATP12	0,758	0,116	0,526 - 1,094	NO
ATP17	0,284	0,002	0,116 - 0,681	Down
ATP19	0,390	0,003	0,235 - 0,636	Down
ATP22	1,224	0,700	0,374 - 4,279	NO
INH1	2,758	0,330	0,803 - 9,812	NO
STF1	0,563	0,121	0,349 - 0,881	NO

STF2	0,428	0,252	0,157 - 1,082	NO
NDI1	0,985	0,963	0,609 - 1,473	NO
NDE1	0,743	0,429	0,459 - 1,271	NO
NDE2	0,207	0,063	0,081 - 0,490	Not Clear
SDH1	1,205	0,881	0,820 - 2,123	NO
SDH2	1,576	0,137	1,074 - 2,701	NO
SDH3	1,117	0,826	0,452 - 2,429	NO
SDH4	1,008	0,913	0,603 - 1,787	NO
ACP1	0,739	0,171	0,593 - 0,977	NO
OXA1	1,661	0,124	1,123 - 2,306	NO
COX4	1,170	0,707	0,768 - 2,380	NO
COX5B	1,601	0,212	0,959 - 3,051	NO
COX6	0,833	0,696	0,467 - 1,479	NO
COX7	0,726	0,551	0,374 - 1,289	NO
COX8	1,842	0,013	1,292 - 3,062	Not Clear
COX9	1,117	0,925	0,763 - 1,975	NO
COX11	2,038	0,229	1,052 - 3,705	NO
COX12	0,841	0,452	0,619 - 1,380	NO
COX13	1,107	0,789	0,777 - 1,808	NO
COX14	1,661	0,423	0,891 - 2,824	NO
COX15	0,744	0,353	0,444 - 1,518	NO
COX16	1,825	0,524	0,797 - 4,121	NO
COX17	2,296	0,025	1,515 - 2,969	Not Clear
COX19	1,324	0,490	0,695 - 2,531	NO

Table S3: Comparative quantification of nuclear respiratory chain gene transcription between WT and ARC strains. NO: no variation, Down: inhibition.

Gene	Expression	p-value	Std Error	variation
FMC1	0,426	0,059	0,190-0,981	Not clear
ATP1	0,447	0,001	0,278-0,742	Down
ATP2	0,376	0,002	0,227-0,614	Down
ATP3	0,318	0,002	0,206-0,553	Down
ATP4	0,996	0,815	0,621 - 1,871	NO
ATP5	2,038	0,108	1,609 - 2,654	NO
ATP7	0,884	0,858	0,463 - 1,433	NO
ATP12	0,540	0,010	0,333-0,861	Not clear
ATP17	0,229	0,000	0,097 - 0,620	Down
ATP19	0,565	0,019	0,359 - 0,878	Not clear
ATP22	0,479	0,067	0,188 - 1,358	NO
INH1	2,203	0,425	0,623 - 7,848	NO
STF1	0,418	0,000	0,253 - 0,655	Not Clear
STF2	0,354	0,096	0,127 - 0,846	Not Clear
NDI1	0,852	0,494	0,612 - 1,309	NO
NDE1	0,796	0,653	0,484 - 1,394	NO
NDE2	0,367	0,092	0,138 - 0,753	NO
SDH1	0,872	0,692	0,593 - 1,479	NO
SDH2	1,267	0,677	0,592 - 2,356	NO
SDH3	0,812	0,676	0,305 - 1,665	NO
SDH4	0,653	0,292	0,417 - 1,247	NO

ACP1	0,377	0,031	0,250 - 0,548	Not Clear
OXA1	1,591	0,191	1,087 - 2,481	NO
COX4	0,581	0,329	0,368 - 1,139	NO
COX5B	1,194	0,855	0,703 - 2,422	NO
COX6	0,714	0,451	0,421 - 1,274	NO
COX7	0,734	0,646	0,392 - 1,240	NO
COX8	1,399	0,387	0,918 - 2,161	NO
COX9	1,107	0,961	0,771 - 2,011	NO
COX11	1,859	0,208	1,341 - 3,061	NO
COX12	0,801	0,372	0,589 - 1,312	NO
COX13	1,167	0,583	0,795 - 1,828	NO
COX14	0,987	0,893	0,635 - 1,644	NO
COX15	0,463	0,198	0,302 - 1,021	NO
COX16	1,036	1,000	0,682 - 1,758	NO
COX17	2,066	0,108	1,501 - 2,938	NO
COX19	1,309	0,458	0,751 - 1,938	NO

Table S4: Comparative quantification of nuclear respiratory chain gene transcription between the WT and nE strains. NO: no variation, Down: inhibition.

## Supplemental References

- Barrientos, A., Korr, D., and Tzagoloff, A. (2002). Shy1p is necessary for full expression of mitochondrial COX1 in the yeast model of Leigh's syndrome. *EMBO J* 21, 43-52.
- Mumberg, D., Muller, R., and Funk, M. (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* 156, 119-122.

## ***F. Conclusions***

La raison pour laquelle les aminoacyl-ARNt synthétases (aaRS) forment des complexes multisynthétasiques (MSCs) reste encore à être élucidée. La première hypothèse sur laquelle les spécialistes se sont penchés concernait l'intérêt catalytique d'une telle organisation. Y a-t-il systématiquement augmentation de l'efficacité d'amination lorsque les aaRS sont associées en complexe et les protéines auxiliaires y participent-elles ? Si ce type d'effet peut être constaté dans certains cas particuliers (Figure I-17) il ne semble pas que ce soit la raison principale du regroupement des aaRS, puisque le MSC des mammifères, par exemple, n'apporte aucun avantage catalytique aux aminoacyl-ARNt synthétases qui le composent. De même, l'effet d'Arc1p sur les activités de la méthionyl- et de la glutamyl-ARNt synthétases (M- et ND-ERS) n'est pas essentiel puisque, par exemple, le  $K_m$  de la ND-ERS pour son ARNt<sup>E</sup> cytoplasmique reste stable que la synthétase soit ou non fixée à Arc1p (Graindorge et al., 2005).

Devant cette constatation, la communauté des spécialistes des aminoacyl-ARNt synthétases a très vite admis que la formation de tel complexes devait avoir un rôle dans le contrôle, non pas de la fonction primaire d'amination, mais des fonctions secondaires que ces enzymes auraient acquises au cours de l'évolution. En effet l'augmentation de la complexité d'un organisme va de pair avec une sophistication graduelle de tous les complexes macromoléculaires qu'il contient et donc ceux regroupant des aaRS également. Cela ne peut être expliqué que par la nécessité de créer puis de contrôler de nouvelles fonctions.

Malgré de nombreux indices et éléments de réponse concernant ce concept, il n'existe à ce jour qu'un seul cas décrivant dans sa quasi-totalité la régulation de la fonction secondaire d'une aminoacyl-ARNt synthétase (aaRS) par sa rétention dans un complexe multisynthétasique. En effet, le MSC de l'Homme contrôle la fonction secondaire de la glutamyl-prolyl-ARNt synthétase (EPRS) qui consiste à inhiber la traduction de certains ARN messagers de la réponse inflammatoire. Dans ce cas uniquement, on connaît le stimulus, le traitement à l'interféron  $\gamma$ , qui est à la base du relargage de l'EPRS, ainsi que la finalité de cet événement, qui consiste à former un complexe d'inhibition de la traduction. L'ensemble du

système assure un rétrocontrôle intégral permettant d'éteindre automatiquement une réponse inflammatoire au bout d'à peu près 14h.

De ce point de vue, notre étude représente une avancée majeure dans la compréhension du rôle des complexes multisynthétiques, puisque nous montrons qu'un stimulus précis, la baisse de la concentration en glucose, génère un signal relayé par la voie de signalisation Snf1/4 qui va permettre de diminuer la quantité d'Arc1p. Au travers de cette diminution, Arc1p endosse alors le rôle de chef d'orchestre qui sépare et synchronise l'information reçue en deux parties distinctes représentées par le relargage de ses deux partenaires la MRS et la ND-cERS. Ces aaRS libres rejoignent respectivement le noyau et la mitochondrie dans un mouvement concerté afin de déclencher de manière synchrone la production des partenaires de la chaîne respiratoire dont la production doit se faire de manière sur-contrôlée puisqu'une erreur de stoechiométrie peut mener à la surproduction de radicaux libres et à la mort de la cellule.

Par ce travail nous mettons en évidence deux concepts fondamentaux, premièrement l'intérêt que va avoir une cellule à former des complexes supramoléculaires, car nous voyons ici que la stratégie qui consiste à créer des dépôts de protéines multifonctionnelles se révèle être une solution très efficace lorsqu'il s'agit de créer de nouvelles fonctions ou d'augmenter la sophistication d'un système sans pour autant augmenter le nombre de gènes codant pour de nouveaux acteurs moléculaires. De plus, nous proposons un mécanisme qui permet, pour la première fois, d'expliquer dans son entièreté, comment la cellule parvient à synchroniser un événement vital qui est la mise en place de la chaîne respiratoire, alors que ses composants sont codés dans des compartiments différents, le noyau et la mitochondrie.

### III. Travaux parallèles

J'ai intégré le laboratoire avec une formation initiale de cristallographe, je ne voulais cependant pas mettre toute mon énergie dans un seul projet. J'ai donc débuté ma thèse avec deux sujets, celui concernant le rôle de la protéine Pet112 de levure ainsi qu'un projet cristallographique où il me fallait épauler Mickael Blaise alors en train de finir sa thèse dans notre équipe. J'ai donc été associé à deux de ses travaux : premièrement la résolution de la structure de l'Asparagine synthétase de *Pyrococcus horikoshii* complexée à ses substrats et deuxièmement la résolution de la structure du transamidosome de *T.thermophilus* pour lequel Mickael Blaise venait d'obtenir des cristaux.

J'ai également poursuivi les travaux initiés par Mickael concernant la résolution de la structure de la protéine YadB d'*E.coli*, dont le gène est un paralogue du gène de la glutamyl-ARNt synthétase mais ayant perdu le domaine de liaison à l'anticodon. Mon objectif était d'arriver à cristalliser puis résoudre la structure du complexe entre YadB et son substrat, l'ARNt<sup>aspartate</sup> (ARNt<sup>D</sup>). L'intérêt de l'obtention d'une telle structure, est que YadB reconnaît l'ARNt<sup>D</sup> par l'anticodon et aminoacyl, avec un glutamate (E), la première base de l'anticodon de l'ARNt qui est un nucléoside modifié appelé queuosine. La fonction de cette aminoacylation de l'anticodon de l'ARNt<sup>D</sup> est actuellement toujours inconnue. Pour une question d'homogénéité ainsi que d'espace je ne vous présenterai pas ce travail qui malheureusement n'a pas abouti à la l'obtention de cristaux du complexe YadB-tRNA<sup>D</sup> malgré le temps et l'énergie que j'y ai investi.

Je vais vous présenter dans les quelques pages qui suivent un travail publié récemment dans la revue *EMBO Journal* et mené principalement par Daniel Kern et Mickael Blaise (Blaise et al.). Dans ce travail, nous décrivons la structure du transamidosome de *T.thermophilus*, un complexe ribonucléoprotéique de 520 kDa composé de deux amidotransférases (AdT) GatCAB et de deux aspartyl-ARNt synthétases non discriminantes (ND-DRS) dimériques qui se font face ainsi que de quatre ARNt<sup>asparagine</sup> (ARNt<sup>N</sup>) assurant la cohésion de l'ensemble. Le rôle (décrit au chapitre I.C.3.b) ) de ce complexe est de promouvoir la formation de N-ARNt<sup>N</sup> par tansamidation ARNt-dépendante et ainsi éviter le relargage d'un D-ARNt<sup>N</sup> potentiellement dangereux pour la traduction des codons N.

La structure du complexe a été résolue par diffraction des rayons X à une résolution de 3 Angström et révèle une caractéristique exceptionnelle permettant à la ribonucléoprotéine d'exister. En effet, seulement deux ARNt<sup>N</sup> sur les quatre que contient le complexe, sont orientés de manière classique leur permettant d'atteindre séquentiellement les sites actifs de la ND-DRS puis de la GatCAB. Ces deux ARNt<sup>N</sup> catalytiques sont reconnus par un monomère de chacune des deux ND-DRS dimériques ainsi que par la sous-unité GatB de chaque AdT. Les deux autres ARNt<sup>N</sup>, en revanche, ne sont pas orientés d'une façon permettant la catalyse, mais créent un lien entre le deuxième monomère de chaque ND-DRS dimérique et l'interface GatC/GatB de l'AdT en regard. Ces ARNts permettent donc de maintenir la structure de l'ensemble du complexe lors de l'étape de relargage du N-ARNt<sup>N</sup>, ce sont des ARNts uniquement structurants.

Cette observation n'a pas manqué de nous surprendre, en effet, les expériences en solution menées précédemment (gel filtration, DLS ; (Bailly et al., 2007)) prouvaient sans conteste que le complexe en solution est plus petit (380 kDa) que le complexe décrit par la structure cristallographique, contenant apparemment une ND-DRS et deux ARNt<sup>N</sup> en moins. Ainsi la présence de ces ARNts structurants laissait penser à un éventuel artefact de cristallisation, il aurait été plus logique d'observer un complexe ne contenant que des ARNts orientés de manière productive.

Mickael a donc effectué des expériences de SAXS (small angles X-ray scattering) afin de déterminer non seulement l'enveloppe du complexe du transamidosome en solution mais également pour vérifier l'existence de l'ARNt structurant en solution. Les résultats ont tout de suite prouvé que l'enveloppe de la molécule ne peut contenir que deux AdTs, une ND-DRS dimérique et ses deux ARNt<sup>N</sup>. Ces résultats ont également permis de renforcer l'hypothèse de l'existence des ARNts structurants en solution pour les raisons que je vais exposer dans les paragraphes qui suivent.

Le dimère de ND-DRS possède un axe de symétrie d'ordre 2 passant par le centre de l'interface entre les deux sous-unités, autrement dit, si on soumet la moitié de la molécule à une rotation de 180° autour de cet axe, on reforme l'autre moitié de la molécule. Ainsi comme les deux ARNt<sup>N</sup> sont fixés de la même manière sur chacun des monomères, ils sont également soumis à la même symétrie.

Allons maintenant au bout du raisonnement, les AdT n'ont qu'une manière de reconnaître l'ARNt<sup>N</sup> dans le but de le transamider, manière que nous pouvons qualifier d'active. Ainsi les AdTs doivent également être reliées l'une et l'autre par cette symétrie d'ordre 2 dans le complexe en solution en admettant qu'elles reconnaissent toutes les deux leur ARNt<sup>N</sup> de manière identique dite "active".

Après cette suggestion de ma part, Mickael Blaise a généré deux modèles basés sur la structure cristallographique du transamidosome, *i)* une ND-DRS avec un ARNt<sup>N</sup> catalytique et l'autre structurant qui se différencient par le mode de reconnaissance utilisé par leur AdTs respectives, cette reconnaissance étant différente, la symétrie entre les deux AdTs n'est plus respectée. *ii)* Un modèle plus classique où les deux AdTs sont symétriques et reconnaissent les ARNt<sup>N</sup> en mode "actif". Mickael a tout de suite constaté que la forme *i)* s'adaptait beaucoup mieux dans l'enveloppe moléculaire définie par SAXS.

La présence d'un ARNt<sup>N</sup> structurant et inactif pour chaque ND-DRS impliquée dans le transamidosome a ensuite été confirmée encore une fois par des approches enzymatiques.

Brièvement, des expériences de cinétiques pré-stationnaires et stationnaires montrent clairement que les deux ARNt<sup>N</sup> portés par le dimère de ND-DRS ne sont absolument pas aminoacylés de manière équivalente lorsque cette dernière fait partie du transamidosome (effet qui n'existe pas lorsque la ND-DRS ne fait pas partie du transamidosome). La différence de l'ordre 100 fois entre les deux constantes ( $0.19 \text{ s}^{-1}$  et  $0.0018 \text{ s}^{-1}$ ) définies à partir des courbes biphasiques préstationnaires, montre clairement l'existence d'une population d'ARNt<sup>N</sup> très rapidement aminoacylée et d'une autre, comparativement, très peu aminoacylée. Couplée aux résultats de SAXS, cette constatation valide l'existence de l'ARNt<sup>N</sup> structurant au sein du transamidosome.

Ainsi, pour conclure, la structure cristallographique représente le complexe du transamidosome en solution lors de l'étape particulière de transition entre une nouvelle ND-DRS et celle portant l'ARNt<sup>N</sup> actif du cycle précédent. (Ce complexe peut être isolé et en raison des conditions de cristallisation dans lesquelles le transamidosome est inactif).

En effet, l'arrivée d'une nouvelle ND-DRS avec deux ARNt<sup>N</sup> actifs et structurants déclenche le départ de l'autre ND-DRS dont l'ARNt<sup>N</sup> actif vient d'être transamidé. Cet intermédiaire

structural de 520kDa, dont l'existence est très courte lors d'un cycle de transamidation normal, permet de maintenir une structure apparente constante en solution dont la masse moyenne est de 380 kDa tout en assurant un relargage efficace du N-ARNt<sup>N</sup> synthétisé, vers EF-Tu et donc le ribosome.

Mon rôle dans ce travail a principalement consisté à épauler Mickael Blaise lors de l'affinement des données cristallographiques afin de replacer si nécessaire les molécules de solvant et les acides aminés dans leur position/conformation vraisemblable. Ce qui représente un travail conséquent pour une structure de 520 kDa. Pour cela je me suis servi du logiciel de visualisation et de construction COOT couplé au logiciel PHENIX dont je n'ai utilisé en l'occurrence que les fonctionnalités dédiées à l'affinement de la structure.

## Crystal structure of a transfer-ribonucleoprotein particle that promotes asparagine formation

Mickaël Blaise<sup>1,\*</sup>, Marc Bailly<sup>2</sup>,  
Mathieu Frechin<sup>2</sup>, Manja Annette Behrens<sup>3</sup>,  
Frédéric Fischer<sup>2</sup>, Cristiano LP Oliveira<sup>3,4</sup>,  
Hubert Dominique Becker<sup>2</sup>,  
Jan Skov Pedersen<sup>3</sup>, Søren Thirup<sup>1</sup> and  
Daniel Kern<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology, CARB Centre, University of Aarhus, Århus C, Denmark, <sup>2</sup>Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UPR 9002 du CNRS, Strasbourg, Cedex, France and <sup>3</sup>Department of Chemistry, INANO Interdisciplinary Nanoscience Center, University of Aarhus, Århus C, Denmark

Four out of the 22 aminoacyl-tRNAs (aa-tRNAs) are systematically or alternatively synthesized by an indirect, two-step route requiring an initial mischarging of the tRNA followed by tRNA-dependent conversion of the non-cognate amino acid. During tRNA-dependent asparagine formation, tRNA<sup>Asn</sup> promotes assembly of a ribonucleoprotein particle called transamidosome that allows channelling of the aa-tRNA from non-discriminating aspartyl-tRNA synthetase active site to the GatCAB amidotransferase site. The crystal structure of the *Thermus thermophilus* transamidosome determined at 3 Å resolution reveals a particle formed by two GatCABs, two dimeric ND-AspRSs and four tRNAs<sup>Asn</sup> molecules. In the complex, only two tRNAs are bound in a functional state, whereas the two other ones act as an RNA scaffold enabling release of the asparaginyl-tRNA<sup>Asn</sup> without dissociation of the complex. We propose that the crystal structure represents a transient state of the transamidation reaction. The transamidosome constitutes a transfer-ribonucleoprotein particle in which tRNAs serve the function of both substrate and structural foundation for a large molecular machine. *The EMBO Journal* advance online publication, 17 August 2010; doi:10.1038/emboj.2010.192

**Subject Categories:** proteins; structural biology

**Keywords:** crystal structure; indirect tRNA asparaginylolation; transamidosome; transfer-ribonucleoprotein particle; tRNA scaffold

### Introduction

The fidelity of translation depends on accurate synthesis of aminoacyl-tRNAs (aa-tRNAs) by the aa-tRNA synthetases (aaRS). Eighteen of the 22 species of homologous aa-tRNAs participating in protein synthesis are formed by direct charging of the amino acid (aa) onto the cognate tRNA. In contrast, the cognate aa-tRNAs pairs charged with asparagine (Asn), glutamine (Gln), selenocysteine (Sec) and cysteine (Cys) are systematically (Sec) or alternatively (Asn, Gln and Cys) formed by a two-step process (Ibba and Söll, 2004; Kern *et al.*, 2005; Sheppard *et al.*, 2008). In these alternative pathways, the cognate aa-tRNA is formed by conversion of an esterified non-cognate amino acid (aa) first attached on the tRNA by a non-cognate aaRS (Curnow *et al.*, 1996, 1998; Becker and Kern, 1998). This pathway raises the question of how the mischarged aa-tRNA intermediate travels from the aaRS to the aa-modifying enzyme. This process must prevent both, the use of the mischarged aa-tRNA in protein synthesis as well as the hydrolysis of the very labile ester bond linking the aa to the tRNA. Recently, we have unraveled the coupling of the two steps of indirect asparaginyl-tRNA<sup>Asn</sup> (Asn-tRNA<sup>Asn</sup>) formation in *Thermus thermophilus* in which the aspartate (Asp) mischarged onto tRNA<sup>Asn</sup> by a non-discriminating aspartyl-tRNA synthetase (ND-AspRS) is amidated into Asn by a GatCAB tRNA-dependent amidotransferase (Bailly *et al.*, 2007). Both enzymes, together with the uncharged tRNA assemble into a ribonucleoprotein particle (RNP) called transamidosome in which the mischarged Asp-tRNA<sup>Asn</sup> formed by the ND-AspRS is channelled to the GatCAB that amidates the Asp esterified on the tRNA<sup>Asn</sup> (Bailly *et al.*, 2007). The assembly of the three partners prevents both the hydrolysis of the labile, mischarged aa-tRNA intermediate and its premature release that could potentially challenge the integrity of the genetic code (Bailly *et al.*, 2007).

Given the necessity of the transamidosome for faithful translation of Asn codons, there is a possibility that all so-called indirect pathways of aa-tRNA formation might systematically use particles in which the tRNA, the mischarging aaRS and the aa-modifying enzyme assemble. Indeed, it was recently shown that in methanogenic archaea, tRNA cysteinylolation is catalysed by a particle in which the tRNA<sup>Cys</sup> substrate is bound to O-phosphoseryl-tRNA synthase (SepRS) and Sep-tRNA•Cys-tRNA synthase (SepCysS) that form Cys-tRNA<sup>Cys</sup> (Zhang *et al.*, 2008). Likewise, in mammals, tRNA selenocysteinylation proceeds through formation of supramolecular complexes including the partners that promote formation of Sec-tRNA<sup>Sec</sup>, tRNA<sup>Sec</sup> modification and incorporation of Sec into polypeptide chains (Small-Howard *et al.*, 2006).

Discovery of transfer-ribonucleoprotein (tRNP) particles in which tRNA might act as a scaffold raises a wide range of new structural and functional issues concerning the assembly of the protein and nucleic acid partners, such as the recruitment of the specific substrate by the non-discriminating

\*Corresponding authors. M Blaise, Department of Molecular Biology, CARB Centre, University of Aarhus, Gustav Wieds Vej, 10 c, DK-8000 Århus C, Denmark. Tel.: +45 8942 5265; Fax: +45 8612 3178; E-mail: mickael.blaise@gmail.com or D Kern, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UPR 9002 du CNRS, 15, rue René Descartes, F-67084 Strasbourg, Cedex, France. Tel.: +33 (0)3 88 41 70 92; Fax: +33 (0)3 88 60 22 18; E-mail: d.kern@ibmc-cnrs.unistra.fr

<sup>4</sup>Present address: Complex Fluids Group, Department of Experimental Physics, University of São Paulo, São Paulo 05314-970, Brazil

Received: 14 April 2010; accepted: 15 July 2010

aaRS, and the mechanism of channelling of the mischarged aa-tRNA from one active site to the other one. To gain insights into which structural elements are involved in the assembly of these tRNPs and in channelling of the aa-tRNA inside these particles, we solved the 3D structure of the *T. thermophilus* transamidosome by X-ray crystallography and its structure in solution by small angle X-ray scattering (SAXS). The crystal structure represents a transient state of the transamidation reaction. The structural and biochemical data reveal a particle in which the four-bound tRNAs<sup>Asn</sup> have two different non-overlapping functions: two are substrates and cofactors for Asn formation, whereas the two others constitute catalytically inert but essential building blocks bricks of this molecular machine. The tRNA<sup>Asn</sup> stabilizes indeed the transamidosome to prevent release of the mischarged aa-tRNA intermediate and also to prevent the GatCAB denaturation at the optimal growth temperature of *T. thermophilus*. The crystal structure reveals how the ND-AspRS accommodates the tRNA<sup>Asn</sup> anticodon and suggests that the tRNA acceptor carrying the mischarged Asp undergoes a 35-Å shift to switch from the aminoacylation to the transamidation active site of the tRNP.

## Results

### Crystal structure of the transamidosome

The structure of the complex was solved by molecular replacement as described (Bailly *et al*, 2009). The refinement statistics are shown in Table I. The asymmetric unit contains

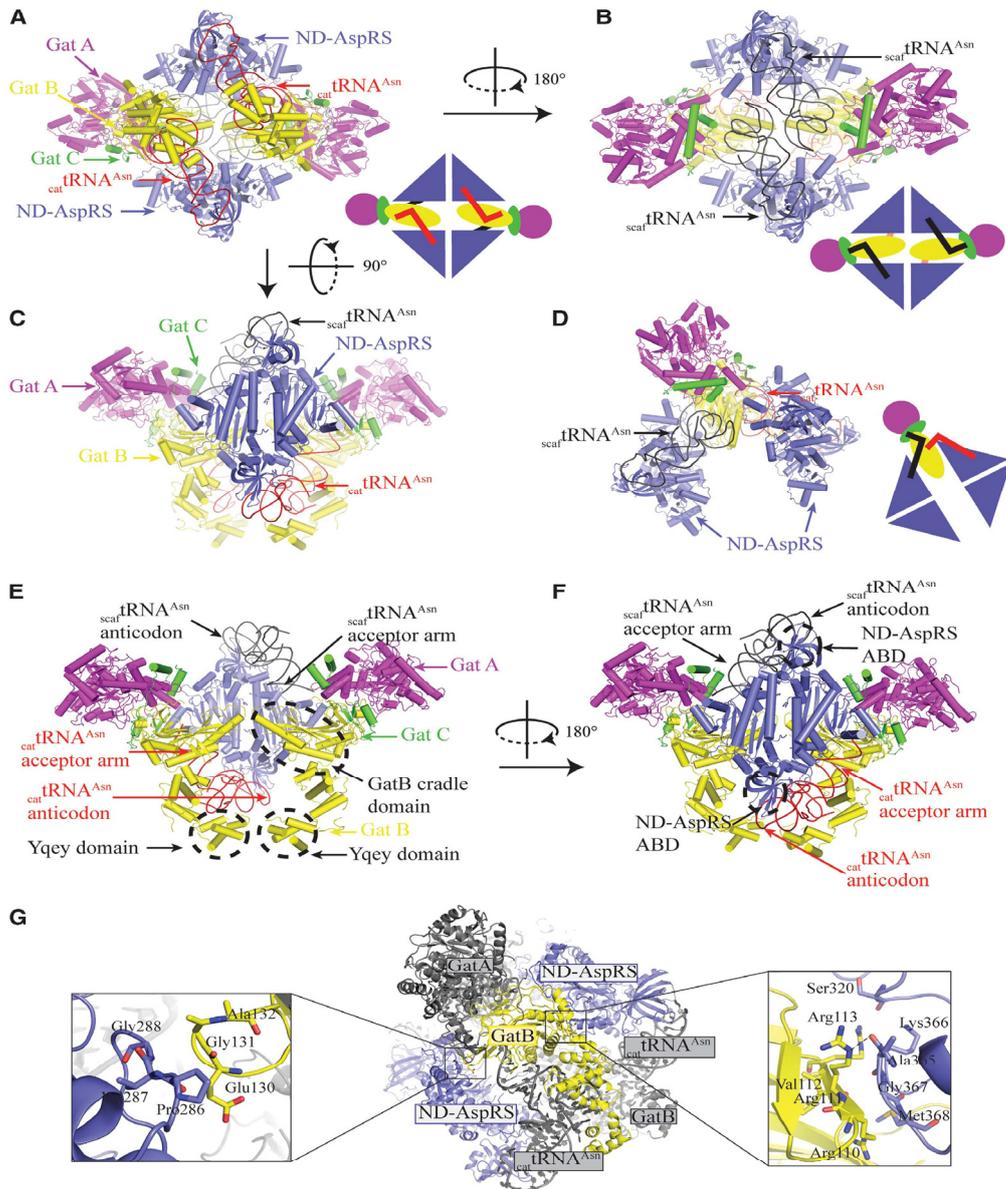
**Table I** Data collection and refinement statistics

<i>Data collection</i> <sup>a</sup>	
Beamline	X10SA, Swiss Light Source
Wavelength (Å)	0.98
Space group	<i>P</i> <sub>2</sub> <sub>1</sub>
Resolution (Å)	50-3
<i>Cell dimensions</i>	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	<i>a</i> = 115.9, <i>b</i> = 214.0, <i>c</i> = 127.8
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (deg)	$\alpha$ = 90, $\beta$ = 93.3, $\gamma$ = 90
Resolution (Å)	50-3
<i>R</i> <sub>meas</sub>	15.4 (80.5)
<i>R</i> <sub>merge</sub> <sup>4-F</sup>	14 (63.9)
( <i>I</i> / $\sigma$ ( <i>I</i> ))	10.3 (2.4)
Completeness (%)	99.9 (99.9)
Redundancy	4.25
<i>Refinement</i>	
Resolution (Å)	39.18-3.00
No. of reflections	123 924
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> (%)	21.1/25.1
<i>No. of atoms</i>	
Protein	27 186
Nucleic acids	6224
Ions Mg/Zn	29/2
Water	107
<i>B-factors</i>	
Protein overall	49.2
Nucleic acids overall	66.2
Ions Mg/Zn	28.3/63.6
Water	56.6
<i>R.m.s.d.</i>	
Bond lengths (Å)	0.01
Bond angles (deg)	0.95
<i>Ramachandran plot</i> <sup>b</sup> (%)	
In core	92.2
Allowed	7.3

<sup>a</sup>Values in parenthesis are for the last resolution shell.

<sup>b</sup>Values are from Molprobity.

a 520-kDa complex formed by two dimeric ND-AspRSs, two trimeric GatCABs and four tRNAs<sup>Asn</sup> (Figure 1A–C). The structure of the ND-AspRS resembles those described for other bacterial and eukaryotic AspRSs (Ruff *et al*, 1991; Delarue *et al*, 1994). Each subunit of the homodimer contains two main domains. The C-terminal (C-t) catalytic core, organized as a seven-stranded antiparallel  $\beta$ -sheet including the three consensus motifs of class II aaRSs (Charron *et al*, 2003), catalyses both the activation of Asp in the presence of ATP and its transfer onto the 3' OH ribose of the terminal adenosine of tRNA<sup>Asn</sup>. The N-terminal (N-t) anticodon-binding domain (ABD) is an OB fold formed by a five-stranded  $\beta$ -barrel (Charron *et al*, 2003) (Figure 1). The two domains are linked by a 20-aa-long hinge region essential for the aminoacylation activity, as it ensures inter-domain communication and dimerization of the subunits (Ruff *et al*, 1991; Delarue *et al*, 1994). The organization of *T. thermophilus* GatCAB resembles that of the enzymes from *Staphylococcus aureus* and *Aquifex aeolicus* (Nakamura *et al*, 2006, 2010; Wu *et al*, 2009). The core of the GatA subunit, which exhibits the amidohydrolase activity, is organized as an 11-stranded  $\beta$ -sheet mixed with  $\alpha$ -helices. GatB is formed by two domains connected by a long loop. The N-t part forms a globular cradle domain and the C-t an  $\alpha$ -helical domain named Yqey. However, because of the lack of clear electron density, the Yqey domain has been traced as a polyaniline chain (Figure 1E; Supplementary Figure S1). Notably, an anomalous signal peak was detected in each GatB subunit and attributed to a zinc ion tetrahedrally coordinated by residues Cys22, Cys24, Cys38 and Cys41 (Supplementary Figure S2). The zinc ion seems to contribute to the stability of the complex and to the organization of the ammonia channel crossing the GatA and GatB subunits. This channel ensures the transfer of the ammonium ions formed in the amidase site of GatA to the transamidase site of GatB (Nakamura *et al*, 2006). Finally, the contact area between GatA and GatB is surrounded by GatC, previously described as a chaperone, which forms a belt attaching the two subunits (Figure 1). The four tRNAs of the tRNP display two different binding modes to the GatCABs. The so-called catalytic tRNA<sup>Asn</sup> (<sub>cat</sub>tRNA<sup>Asn</sup>) are bound in a functional state with their anticodon loops contacting the ABD of one of the monomers of the ND-AspRS and their acceptor arms buried in the GatB active site of the GatCABs. Both <sub>cat</sub>tRNAs<sup>Asn</sup> bind the GatCAB and ND-AspRS molecules in the same manner (Figure 1C–F). The second tRNA-binding mode is adopted by the so-called scaffolding tRNAs<sup>Asn</sup> (<sub>scaf</sub>tRNA<sup>Asn</sup>), which binds in a non-catalytic manner. Although their anticodon loops bind the ABD of the other ND-AspRS monomer, their acceptor stems are entrapped in the interface between the GatA and GatB subunits of the second GatCAB molecule. Both <sub>scaf</sub>tRNAs<sup>Asn</sup> bind the GatCAB and ND-AspRS molecules in a same manner (Figure 1C–F). This means that in the complex each GatCAB binds one <sub>scaf</sub>tRNA<sup>Asn</sup> and one <sub>cat</sub>tRNA<sup>Asn</sup> (Figure 1D). Because of the lack of a clear electron density, the 3' OH-CCA end of <sub>scaf</sub>tRNAs<sup>Asn</sup> was not built. Only a limited number of protein–protein contacts could be observed between the ND-AspRS and the GatCAB. Each GatCAB interacts with the two surrounding ND-AspRS monomers; Arg110, Arg111 and Arg113 from the GatB subunit contact Ser320, Ala365, Lys366, Gly367, from the ND-AspRS monomer by H-bonds or Van der Waals interactions and Glu130, Gly131 and Ala132



**Figure 1** Crystal structure of the transamidosome. (A–C) Composition of the asymmetric unit. The ND-AspRS appears in blue, the  $_{cat}tRNA^{Asn}$  in red, the  $_{scat}tRNA^{Asn}$  in grey and the subunits of the trimeric GatCAB in green, magenta and yellow. The schematic structure follows the same colour code. (D) On this view, one GatCAB, one  $_{scat}tRNA^{Asn}$  and one  $_{cat}tRNA^{Asn}$  have been removed, to show that each ND-AspRS binds one  $_{scat}tRNA^{Asn}$  and one  $_{cat}tRNA^{Asn}$  in order to recruit one GatCAB. (E, F) Structure of the transamidosome in which one ND-AspRS, one  $_{cat}tRNA^{Asn}$  and one  $_{scat}tRNA^{Asn}$  have been removed and which corresponds to that in solution. The dotted circles indicate the GatB catalytic (cradle) and Yqey domains and the ND-AspRS ABD. (G) Protein–protein interactions in the transamidosome. All the components are in grey, except GatB and the two ND-AspRSs that appear, respectively, in yellow and blue. The panels show a zoom of the two regions of GatB and the ND-AspRS in contact and the residues involved in the interaction; the hydrogen bond is indicated by the dashed line.

from the same GatB contact residues 286–288 of the other ND-AspRS monomer, by Van der Waals interactions (Figure 1G). However, as previously demonstrated, these

few protein–protein interactions are not sufficient to mediate complex formation in the absence of tRNA (Bailey *et al*, 2007).

### Comparison between the crystal structure and the structure in solution determined by SAXS

The composition of the transamidosome in solution was previously investigated by size exclusion chromatography, static light scattering, dynamic light scattering and analytical ultracentrifugation (Bailly *et al*, 2008). All these approaches have predicted a molecular weight for the transamidosome ranging from 300 to 400 kDa, in agreement with a 380-kDa complex, composed of one dimeric ND-AspRS, two tRNAs<sup>Asn</sup> and two GatCABs but in contradiction with the crystal structure showing the presence of an extra ND-AspRS bound to two tRNAs<sup>Asn</sup>. Thus, to gain insights into the stoichiometry of the macromolecules that compose the transamidosome in solution, we investigated the particle by SAXS. The pair distribution function  $p(r)$  obtained by an indirect Fourier transformation of the experimental SAXS data shows that the transamidosome in solution is an elongated particle with a maximal diameter of 185 Å. The SAXS data give a molecular mass of  $325 \pm 50$  kDa and a radius of gyration of  $55 \pm 1$  Å (Supplementary Figure S3). The size of the model obtained by *ab initio* methods (Figure 2A and B) suggests that the complex in solution consists, as shown previously, of one dimeric ND-AspRS, two GatCABs and two tRNAs. This is further confirmed by the comparison of the calculated scattering curves for various stoichiometries of the partners with the SAXS data, which gives the best fit for the 380-kDa model (Supplementary Figure S4).

The position of the two GatCABs and the presence of the  $_{scat}$ tRNA<sup>Asn</sup> in the crystal structure are surprising, as we were expecting that, as proposed previously, each ND-AspRS would bind two  $_{cat}$ tRNA<sup>Asn</sup> and that the two GatCABs would be bound symmetrically to these tRNAs (Bailly *et al*, 2007). Thus, we compared the scattering curves for several models with the SAXS data. The theoretical scattering intensity calculated from the crystal structure of the transamidosome composed of one ND-AspRS bound to one  $_{scat}$ tRNA<sup>Asn</sup>, one  $_{cat}$ tRNA<sup>Asn</sup> and two GatCABs gives a reasonable fit to the scattering data ( $\chi = 6.8$ ) (Figure 2C and D). In contrast, the theoretical scattering intensity of a model in which the two tRNAs<sup>Asn</sup> are bound catalytically on the dimeric ND-AspRS and the two GatCABs are equivalent and symmetrical gives a poor fit ( $\chi = 8$ ) compared with the model extracted from the crystal structure (Figure 2E and F). As proposed previously, the C-t domain of the GatB subunit may be flexible in the absence of tRNA (Nakamura *et al*, 2006, 2010). We therefore performed rigid body refinement, using the SASREF program (Svergun and Petoukhov, 2005), in order to fit the GatB C-t domain, with the scattering data. A reasonable fit ( $\chi = 3.4$ ) was obtained with a model in which the C-t domain of one

GatB shifts closer to the GatB catalytic domain, whereas that of the other GatB is anchored to the bound tRNA<sup>Asn</sup>. Thus, one of the two GatB C-t domain is not bound to tRNA (Figure 2G and H).

Altogether, the SAXS results clearly indicate that in solution the transamidosome comprises one ND-AspRS, two GatCABs and two tRNAs<sup>Asn</sup>. But as the  $\chi$  value from model extracted from crystal structure fits with the SAXS data, the results agree with non-equivalent orientations of the two GatCABs. Finally, the rigid body refinement shows that one of the two GatBs has its C-t flexible and therefore it does not bind tRNA in its active site in solution. This tRNA is the  $_{scat}$ tRNA<sup>Asn</sup>. To confirm these observations, we investigated the equivalence of the tRNAs<sup>Asn</sup> by kinetic experiments.

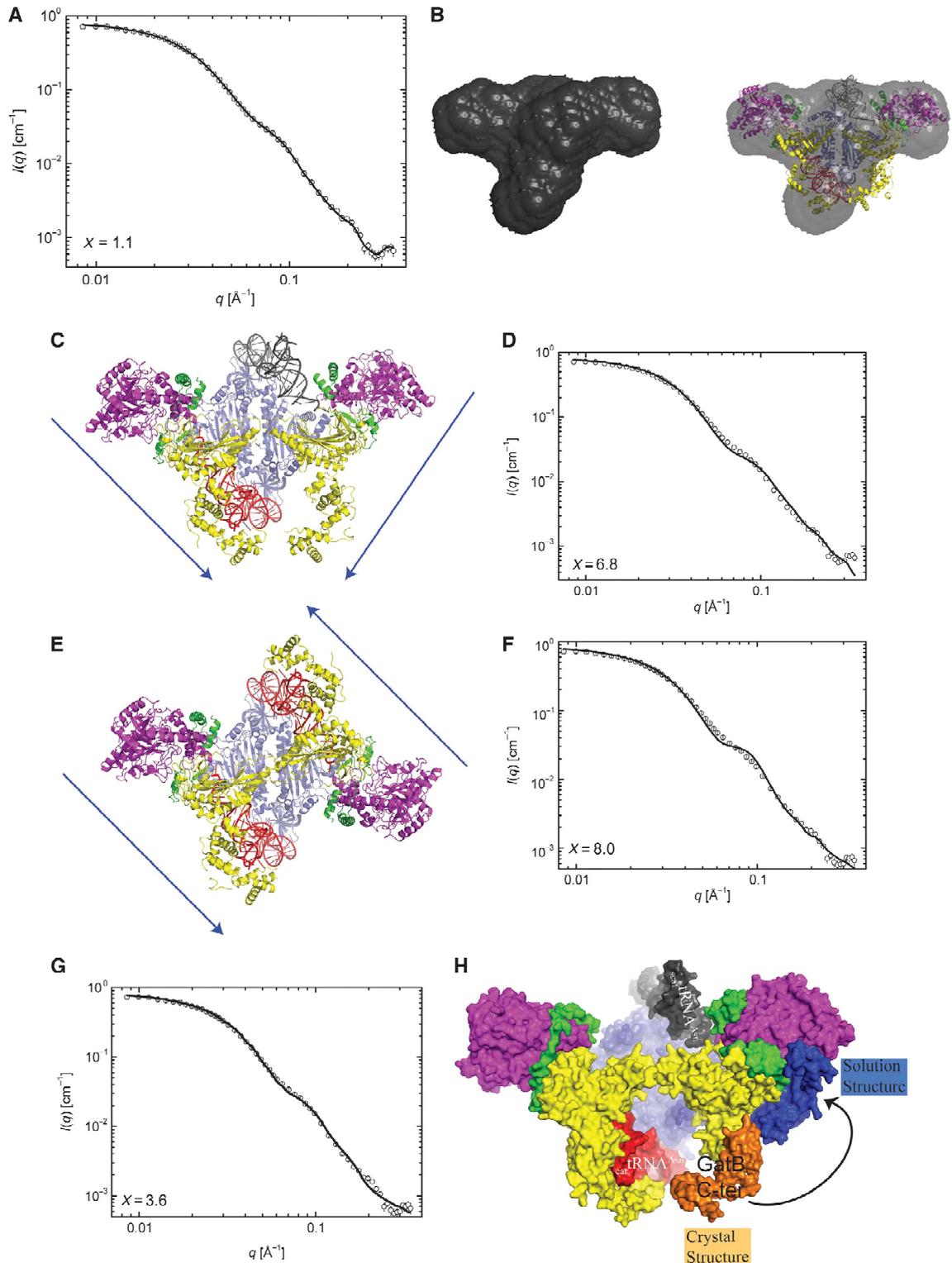
### GatCAB takes control of the ND-AspRS catalytic mode inside the tRNP

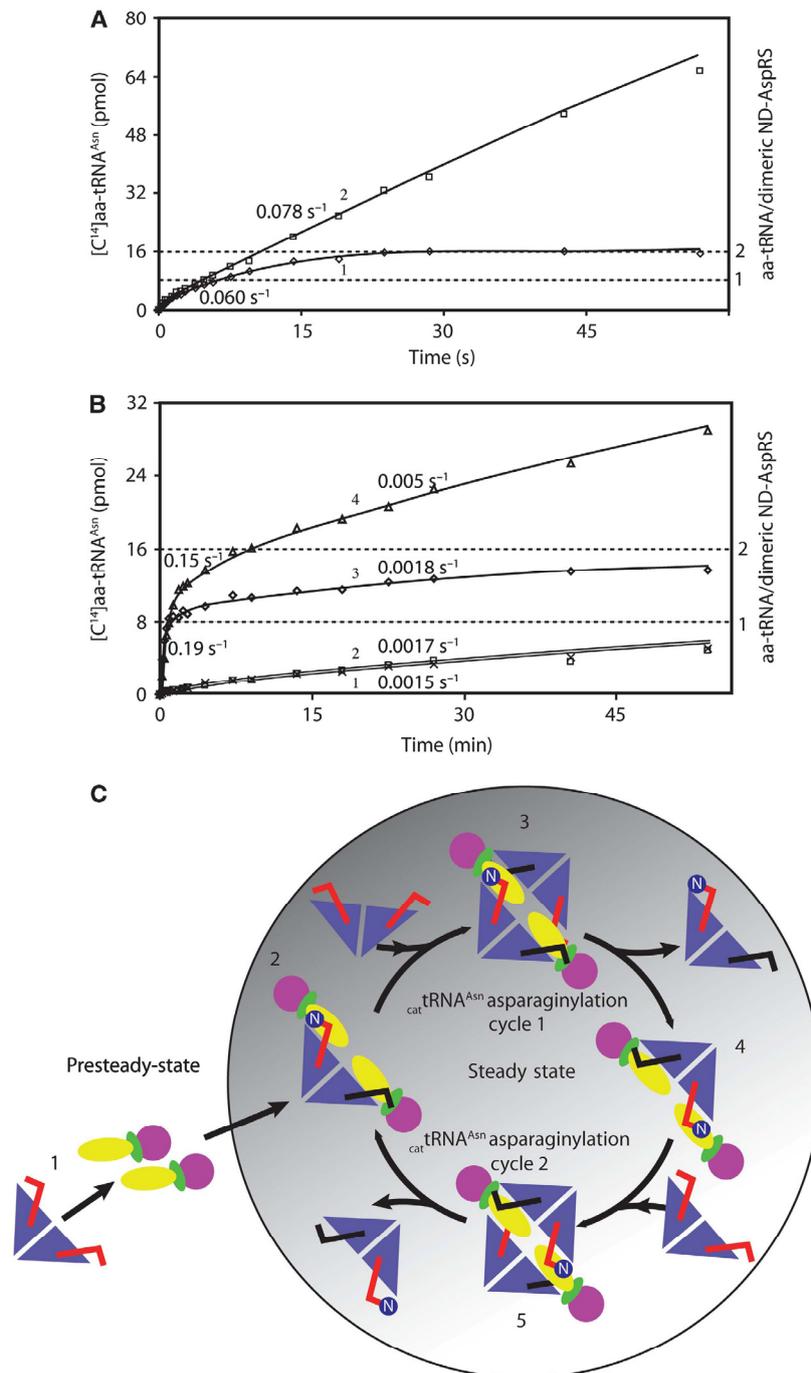
Aminoacylation of tRNA<sup>Asn</sup> by the preformed ND-AspRS•tRNA<sup>Asn</sup> complex, in the absence of free tRNA, shows a homogeneous hyperbolic kinetic and formation of two Asp-tRNA<sup>Asn</sup> with identical rate constants. Thus, both catalytic sites of the dimeric ND-AspRS are equivalent (Figure 3A). The rate constant equals that of tRNA charging at the steady state when free tRNA<sup>Asn</sup> is added in excess (Figure 3A). In contrast, in the preformed ternary ND-AspRS•tRNA<sup>Asn</sup>•GatCAB complex, aminoacylation of tRNA<sup>Asn</sup> occurs through a biphasic kinetic formed by a hyperbolic fast phase followed by a significantly slower linear phase (Figure 3B). The slow linear phase extrapolates at  $t_0$  to one Asp-tRNA<sup>Asn</sup> formed per dimeric ND-AspRS. The amplitude of the burst increases linearly with the concentration of the transamidosome (not shown) but is not altered in the presence of an excess of free tRNA<sup>Asn</sup> (Figure 3B). As the rate constants derived from two phases differ by two orders of magnitude (respectively, 0.19 and 0.0018/s; Figure 3B), the stoichiometry of one aa-tRNA formed in the burst by the two active sites of the dimeric ND-AspRS indicates that inside the transamidosome, the AspRS charges one tRNA<sup>Asn</sup> faster than the second one (Kern and Lapointe, 1979). Thus, the kinetic of Figure 3B is consistent with a non-equivalence of the two tRNA<sup>Asn</sup> aminoacylation sites of the ND-AspRS triggered by GatCAB binding that contrasts with the equivalent sites displayed by the free enzyme (Figure 3A). With respect to the structure of the transamidosome showing that the ND-AspRS binds one tRNA in a functional state but not the other one ( $_{cat}$ tRNA<sup>Asn</sup> and  $_{scat}$ tRNA<sup>Asn</sup>), the biphasic kinetic could reflect the aminoacylation of the two non-equivalently bound tRNA<sup>Asn</sup> by suggesting that, after fast aspartylation of  $_{cat}$ tRNA<sup>Asn</sup>, followed by amidation of the Asp moiety, the

**Figure 2** SAXS measurements of the transamidosome. (A, B) SAXS *ab initio* modelling. The black curve represents the best fit from the *ab initio* modelling to the scattering data (circle). On the right, the average model is represented in black and the crystal structure, the 380-kDa molecule, composed of two dimeric ND-AspRSs (blue), two GatCABs (green, magenta and yellow for the GatC, A and B subunits), one  $_{cat}$ tRNA<sup>Asn</sup> (red) and one  $_{scat}$ tRNA<sup>Asn</sup> (grey) is fitted to the SAXS average model. (C, D) Comparison of the crystal structure of the transamidosome to the experimental scattering data. (C) Crystal structure of the transamidosome depleted of one ND-AspRS bound on a  $_{cat}$ tRNA<sup>Asn</sup> and a  $_{scat}$ tRNA<sup>Asn</sup>. The two blue arrows are displayed to mark the different orientations of the GatCAB in the crystal structure compared with the model shown in panel E. (D) The circles represent the data and the curve represents the theoretical behaviour of the model calculated with CRY SOL. (E, F) Comparison of the model of the transamidosome to the experimental scattering data. (E) The model represents one ND-AspRS bound to two equivalent GatCABs and two  $_{cat}$ tRNAs<sup>Asn</sup>. (F) The circles represent the data and the curve represents the theoretical scattering of the model calculated with CRY SOL. (G, H) SAXS rigid body refinement. (G) Best fit of the rigid body refinement performed using the SASREF program (black curve) to the scattering data (circles). (H) SASREF model. The flexible GatB C-t domain is in blue, the position of the C-t GatB in the crystal structure is in orange and the black arrow illustrates the movement of the GatB C-t domain in the absence of bound tRNA. The colour code is the same as in Figure 1.

${}_{\text{scat}}\text{tRNA}^{\text{Asn}}$  is aspartylated slowly with the rate constant equaling that of the binary ND-AspRS•tRNA<sup>Asn</sup> complex (Figure 3A). Therefore, we propose a working model of the transamidation reaction in which the large complex observed in the crystal structure would represent a transient state of

the catalytic process and a snapshot of the transamidation reaction in which two ND-AspRSs saturated with tRNA<sup>Asn</sup> are bound together to two GatCABs, one of the two ND-AspRS is leaving the complex while the second one is binding to it (Figure 3C). As this complex is not seen in solution, likely





**Figure 3** Presteady-state and steady-state aminoacylation kinetics of the ND-AspRS•tRNA<sup>Asn</sup> complex and of the transamidosome and mechanism of transamidation. (A) Aminoacylation catalysed by the binary ND-AspRS•tRNA<sup>Asn</sup> complex at 25°C. The reactions were conducted in the absence (1) or in the presence (2) of free tRNA<sup>Asn</sup>. (B) Aminoacylation catalysed by the binary ND-AspRS•tRNA<sup>Asn</sup> complex (1, 2) and by the transamidosome (3, 4) at 6°C in the presence of 25% glycerol. The reactions were conducted without (1, 3) or with (2, 4) free tRNA<sup>Asn</sup>. The presteady-state and steady-state rate constants are indicated. (C) A proposed model of the dynamic of the presteady-state and steady-state functioning of the transamidosome. Two GatCABs (green ovals, magenta spheres and yellow ovals for the C, A and B subunits, respectively) bind the dimeric ND-AspRS (blue triangle) saturated by two tRNA<sup>Asn</sup> (L forms) (1) and induces non-equivalence of the ND-AspRS active sites (2); only one tRNA<sup>Asn</sup> ( $\text{cat-tRNA}^{\text{Asn}}$ ) is functionally bound (red L) and is asparaginylated, whereas the other one ( $\text{scat-tRNA}^{\text{Asn}}$ ) not functionally bound (black L) promotes stability of the complex. This complex binds a second dimeric tRNA<sup>Asn</sup>-bound ND-AspRS (3) promoting the dissociation of the ND-AspRS bound on the newly formed Asn-tRNA<sup>Asn</sup> (4) that is replaced by a new ND-AspRS•tRNA<sup>Asn</sup> complex (5). During this exchange, the  $\text{scat-tRNA}^{\text{Asn}}$  bound on the second ND-AspRS by maintaining the transamidosome prevents its dissociation, whereas the bound  $\text{cat-tRNA}^{\text{Asn}}$  is asparaginylated. The dimeric AspRS bound on Asn-tRNA<sup>Asn</sup> is then exchanged with a novel ND-AspRS•tRNA<sup>Asn</sup> complex (cycle 2). Steady-state cycles 1 and 2 refer to successive asparaginylation of the  $\text{cat-tRNA}^{\text{Asn}}$  bound on each dimeric ND-AspRS. The letter N in the blue circles indicates asparaginylation of the  $\text{cat-tRNA}^{\text{Asn}}$ .

binding of a second ND-AspRS•tRNA<sup>Asn</sup> complex provokes the release of the first one. According to the kinetic investigation, the leaving complex contains the Asn-cat-tRNA<sup>Asn</sup> end product and the <sub>scat</sub>tRNA<sup>Asn</sup>, whereas the entering one is saturated with uncharged tRNA<sup>Asn</sup>.

What happens with the released ND-AspRS•tRNA<sup>Asn</sup> complex? As most homologous aa-tRNAs, Asn-tRNA<sup>Asn</sup> is trapped by the elongation factor EF-Tu and exchanged on the ND-AspRS with free tRNA<sup>Asn</sup>. The <sub>scat</sub>tRNA<sup>Asn</sup> either remains bound on AspRS or is exchanged with another molecule. Thus, a new complex forms in which the ND-AspRS binds equivalently the two tRNA<sup>Asn</sup>. The strong affinity of tRNA<sup>Asn</sup>-bound ND-AspRS for GatCAB (Bailly *et al*, 2007) promotes then binding of the complex on the preformed transamidosome (Figure 3C, steps 4–5) or on free GatCABs to form a new transamidosome, whether the concentration of GatCAB is limiting or exceeds that of the ND-AspRS, respectively. The previous <sub>scat</sub>tRNA<sup>Asn</sup> can then bind functionally and become catalytic. If tRNA<sup>Asn</sup> is aspartylated before entry of the ND-AspRS complex in the transamidosome, the poor affinity of the aspartylated tRNA<sup>Asn</sup> for EF-Tu with respect to the ND-AspRS contrasting with its strong affinity when bound on the ND-AspRS for GatCAB will considerably restrict its use for protein synthesis.

#### Structural basis of the non-discriminating behaviour of the AspRS

The ND-AspRS aspartylates both tRNA<sup>Asp</sup> and tRNA<sup>Asn</sup> with similar efficiencies (Becker and Kern, 1998). The structure of the transamidosome reveals how the enzyme accommodates both the 34GUC36 anticodon of tRNA<sup>Asp</sup> and the 34GUU36 anticodon of tRNA<sup>Asn</sup>. Previous investigations have suggested that conformation of the L1-loop, connecting strands 4 and 5 of the ABD, is the key element that determines the relaxed specificity towards nucleotide 36 that distinguishes the two anticodons (Schmitt *et al*, 1998; Charron *et al*, 2003). Biochemical investigations have revealed that the *T. thermophilus* ND-AspRS uses G34 and U35 of tRNA<sup>Asp</sup> as major identity determinants for recognition but not C36, whereas all three nucleotides contribute strongly to recognition by the discriminating AspRS (Kern *et al*, 2005). Analysis of the interactions between ND-AspRS and tRNA<sup>Asn</sup> in the transamidosome shows that contacts are made between the ABD and all three nucleotides of the anticodon. The structure of the complex shows that G34 N1 establishes hydrogen bond with the Glu76 carboxyle group, whereas G34 N2 contacts both Asn68 Oδ1 and the carboxyle group of Glu76. In addition, U35 interacts with N3 and O4 of the Gln44 amide group and is involved in a stacking interaction with Phe33 (Figure 4A). Finally, the N3 and the ribose groups of U36 interact, respectively, with the Lys70 carbonyl and the Arg26 guanidinium groups. In the case of tRNA<sup>Asp</sup>, which has a cytosine at position 36, the same interactions can still be formed explaining why the ND-AspRS cannot discriminate between tRNA<sup>Asp</sup> and tRNA<sup>Asn</sup>.

#### GatB discriminates between tRNA<sup>Asp</sup> and tRNA<sup>Asn</sup> by recognizing U1 and measuring the D-loop length

The D- and T-loops as well as the T-stem of <sub>cat</sub>tRNA<sup>Asn</sup> interact with the α-helical C-t part of GatB (Figure 4B). Recognition of the two loops is based on a shape complementarity, as described for tRNA binding by the CCA-adding

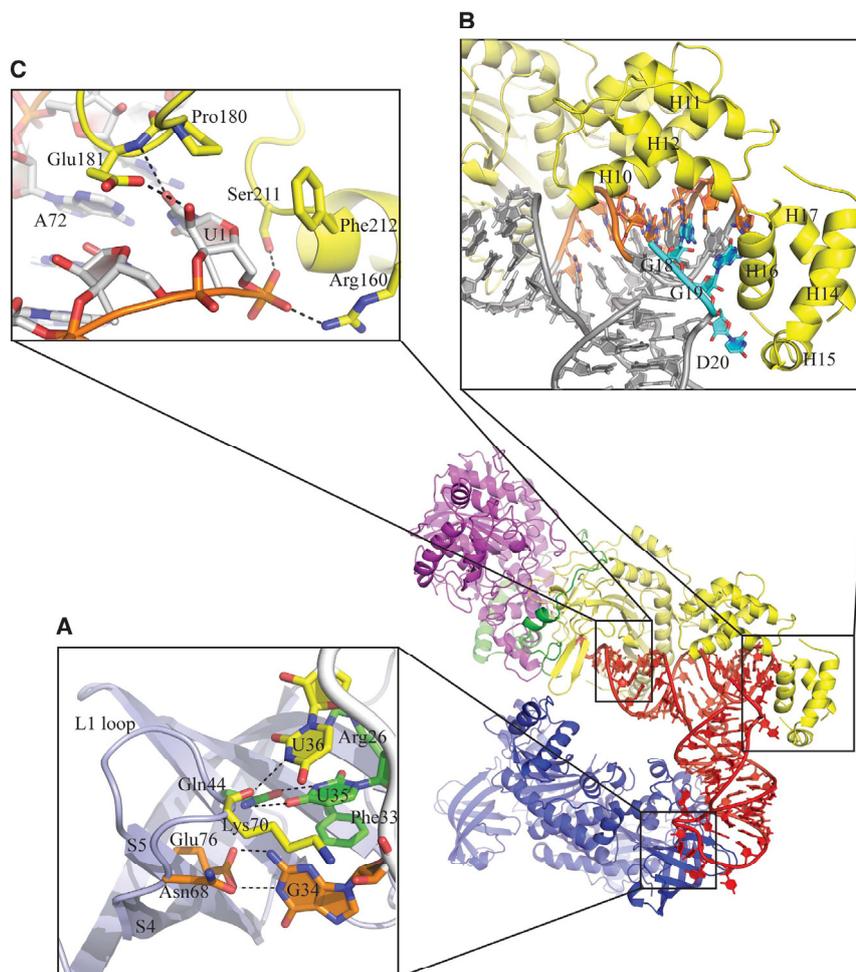
enzyme and the GatDE amidotransferase (Oshikane *et al*, 2006; Tomita *et al*, 2006). The GatB C-t part forms a concave area, which hosts the T-stem loop (Figure 4B). Even though no side chains could be attributed to the Yqey domain residues, the structure suggests that this domain has a crucial function in tRNA binding, as helix 15 contacts nucleotide D20 and helix 16 is entrapped between nucleotides in positions 19 and 20. According to the SAXS data, the GatB C-t domain is flexible (not shown), in agreement with previous results that revealed the flexibility of the Yqey domain (Nakamura *et al*, 2006, 2010; Oshikane *et al*, 2006; Denziak *et al*, 2007). This suggests that upon binding of GatCAB, the Yqey domain shifts to anchor the tRNA.

Previous biochemical investigations showed that the U1-A72 base-pair and more particularly nucleotide U1 constitutes the major tRNA<sup>Asn</sup> identity element for transamidation of the bound Asp by GatCAB. Substitution of the first base-pair of tRNA<sup>Asn</sup> with the G1-C72 pair prevents amidation of tRNA<sup>Asn</sup>-bound Asp (Bailly *et al*, 2006). The crystal structure shows that U1-A72 is in the vicinity of the 3<sub>10</sub> turn formed by residues 179–182, with U1 being tightly bound by Glu181 of GatB. The N atom from the main chain of Glu181 recognizes the O2 from the U1 ring, whereas its side chain contacts the ribose group. The recognition is achieved by interaction of the 5' terminal phosphate of tRNA with the side chains of Ser211 and Arg160 as well as the amino group of Lys213. Finally, Pro180 and Phe212 are in close proximity of U1 and may act as a stop for positioning U1, while A72 is contacted by any residue (Figure 4C).

#### <sub>cat</sub>tRNA<sup>Asn</sup> 3' end recognition by the transamidation catalytic site

The GatB and AspRS active sites are separated from each other by a distance of about 40 Å. The model of the ND-AspRS bound to tRNA with the CCA-3'OH tRNA end in the AspRS active site demonstrates that the acceptor arm of <sub>cat</sub>tRNA<sup>Asn</sup> has to shift 35 Å from the ND-AspRS to the GatB active site after aminoacylation (Figure 5A). The 3' end of <sub>cat</sub>tRNA<sup>Asn</sup> is deeply pushed into the GatB cradle domain (Figure 5B; Supplementary Figure S5). The terminal A76 sits in a pocket formed by Tyr81, Tyr83 and Tyr262, and its ribose ring contacts the Asp85 carboxyle group. Recognition is achieved by contacts established by C75, C74 and G73. The base ring of C75 interacts with the His128 imidazole and the Ser126 OH groups, whereas the phosphate contacts the Arg139 and Arg186 guanidinium groups. The C74 ring interacts, through the O2, with the Asn210 amide group, and the G73 phosphate and ribose groups interact with Lys125 and Pro180.

As A76 of <sub>cat</sub>tRNA<sup>Asn</sup> is located in the amidation active site, the crystal structure of the complex reflects an intermediate state between tRNA aspartylation and amidation of the esterified Asp. However, amidation of the β-carboxyl Asp occurs after activation by phosphorylation with ATP (Wilcox, 1969; Kern *et al*, 2005). Modelling of the ATP substrate in the GatB active site in the presence of <sub>cat</sub>tRNA<sup>Asn</sup>-bound Asp shows that the Asp moiety is 10 Å away from the γ-phosphate group of ATP (Nakamura *et al*, 2006) (Figure 5C and D). Furthermore, without moving the <sub>cat</sub>tRNA-CCA end, the β-phosphoryl Asp points to the direction of the ammonia channel exit (Figure 5C and D), suggesting that the crystal structure represents the state between phosphorylation and



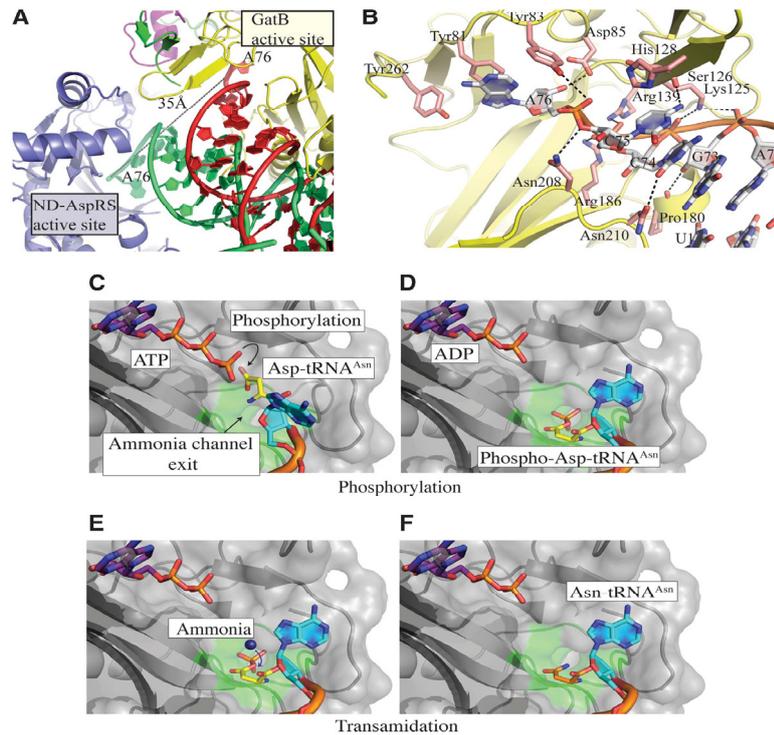
**Figure 4** Recognition of  $\text{catRNA}^{\text{Asn}}$  by the ND-AsPRS and the GatB subunit of GatCAB. **(A)** Recognition of  $\text{catRNA}^{\text{Asn}}$  anticodon by the ND-AsPRS. The ABD is in light blue, the tRNA backbone is in light grey and the tRNA anticodon nucleotides 34, 35 and 36 are, respectively, in orange, green and yellow. The OB fold L1-loop between strands S4 and S5 is indicated. The aa are coloured according to the nucleotide they contact. The black-dashed lines indicate hydrogen bonds. **(B)** Recognition of the  $\text{catRNA}^{\text{Asn}}$  by the C-terminal domain of GatB. The tRNA<sup>Asn</sup> D-loop is in blue and the T-loop and -arm in orange. The numbered H refers to the helix number. The GatB Yqey domain is formed by helices H14 to H17. **(C)** Recognition of nucleotide U1 of  $\text{catRNA}^{\text{Asn}}$  by the GatB subunit. The aa residues contacting the base, the ribose and the phosphate groups are represented. The black-dashed lines indicate hydrogen bonds.

amidation of the  $\text{catRNA}^{\text{Asn}}$ -bound Asp. We therefore propose that after aminoacylation, the aspartylated end of  $\text{catRNA}^{\text{Asn}}$  shifts from AsPRS active site to the ATP site of GatB and that after activation, the  $\beta$ -phosphocarboxyl-Asp is located at the exit of the ammonia channel in position for a nucleophilic attack by ammonia (Figure 5E and F).

#### **A scaffold tRNA<sup>Asn</sup> mediates stability and integrity of the complex**

$\text{scaftRNA}^{\text{Asn}}$  is sandwiched between the ND-AsPRS ABD and GatCAB (Figure 6). The electron density is clear from U1 to G73; however, the CCA end could not be traced. As for  $\text{catRNA}^{\text{Asn}}$ , the anticodon stem, D and acceptor arms from  $\text{scaftRNA}^{\text{Asn}}$  are recognized by the ND-AsPRS. The G34 and U35 bases establish H-bonds with, respectively, the carboxyl

group of Glu76 and the carbonyl group of Lys70, whereas Phe33 is stacking the U35 base. The ring of U36 is recognized by Gln44 side chain, whereas O4 from its ribose group establishes H-bonds with the guanidinium group of Arg26 (Figure 6A). Moreover, Gly29 contacts C32 by Van der Waals interactions, whereas the O1 phosphate group and N6 from A38 establish H-bonds with Nε1 from the Trp24 side chain and the carbonyl group of Asp27 (Figure 6B). The acceptor arm of  $\text{scaftRNA}^{\text{Asn}}$  is bound at the interface of GatA and GatB subunits. The ribose residues of U3 and A72 contact the loop of GatA formed by residues 351–354 by Van der Waals interactions (Figure 6C). The G73 ring is stacked by Tyr95 from GatB and its N2 and O6 groups contact, respectively, the carboxyl and carbonyl groups of Asp96 and Tyr264 from GatB, whereas Tyr264 contacts the O6 from the base by its

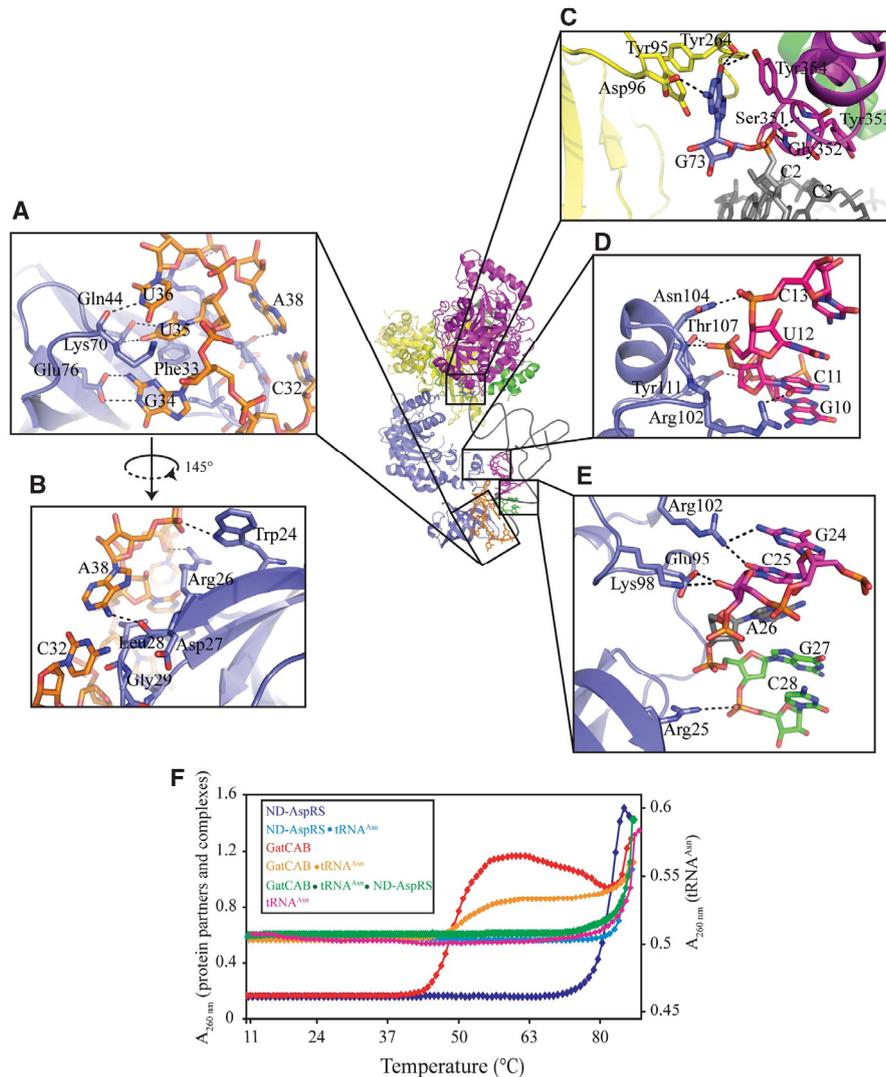


**Figure 5** Interaction of the *cat*tRNA<sup>Asn</sup>-CCA end with the GatB catalytic site and mechanism of transamidation. (A) Model of the *cat*tRNA<sup>Asn</sup>-CCA switch. The ND-AspRS•tRNA complex was modelled by superposing the ND-AspRS bound to tRNA<sup>Asn</sup> on the AspRS•tRNA<sup>Asp</sup> complex from yeast (PDB code: 1ASY). tRNA<sup>Asp</sup> is in green. The dashed line shows the distance between the binding sites of the tRNA terminal A76 in the ND-AspRS and in the GatB. (B) Recognition of the *cat*tRNA<sup>Asn</sup>-CCA end by the GatB active site. The GatB is in yellow cartoon and the tRNA-bound aa is in red salmon. *cat*tRNA<sup>Asn</sup> is shown as cartoon and sticks. The black-dashed lines indicate hydrogen bonds. (C–F) Models of β-carboxyl Asp phosphorylation and transamidation occurring in the GatB active site. ATP was modelled in the GatB active site using the structure of *S. aureus* GatCAB complexed with ADP-AlF<sub>4</sub> as a reference (PDB code: 2G5I). tRNA is in orange ribbon, whereas the terminal A76 is in light blue. The Asp attached to the A76 3'OH ribose is in yellow stick. Except manual rotation of the A76, no further rearrangement was made on the structure. The GatB subunit is in grey ribbon and surface; the ammonia channel exit is delimited by the green area. (C) Putative position of the *cat*tRNA<sup>Asn</sup>-bound Asp prior its phosphorylation. (D) *cat*tRNA<sup>Asn</sup>-bound β-phosphocarboxyl-Asp at the exit of the ammonia channel. (E) Amidation of the activated β-carboxyl group of the bound Asp with ammonia (blue sphere) coming out from ammonia channel. (F) Formation of Asn-*cat*tRNA<sup>Asn</sup>; the Asn attached to the A76 3'OH ribose is in orange stick.

carbonyl group (Figure 6C). Interestingly, all the residues from GatA and GatB contacting the acceptor end of *sca*tRNA<sup>Asn</sup> are well conserved among the species although they are not essential for catalysis. Four nucleotides of the D arm are contacted by the ND-AspRS mainly by their ribose and phosphate groups (Figure 6D). The O3 from G10 ribose and the phosphate of C11 are recognized by OH from the Tyr111 side chain. Recognition of C11 is strengthened by the interaction of its ribose group with the guanidinium group of Arg102. The Thr107 OH group and the main chain of Asn104 contact the U12 phosphate group, whereas the amide group of Asn104 main chain contacts the phosphate group of C13. Both N2 and O2 groups from, respectively, nucleotides G24 and C25 are contacted by the NH1 from Arg102 side chain, whereas O2 from the C25 ribose contacts the Oε1 of Glu95 and NH group of Lys98 side chain (Figure 6E). The phosphate group of C28 and the guanidinium group of Arg25 constitute the sole residues involved in recognition of the anticodon arm.

### The transamidosome is essential for the GatCAB thermostability

*T. thermophilus* is a thermophilic eubacterium with optimal growth at 80–85°C. Therefore, proteins of this bacterium have to be thermostable. We studied the stability of the transamidosome components, free or in complex from 10 to 85°C using absorption measurements at 260 nm (Figure 6F). It is shown that tRNA<sup>Asn</sup> is very stable, as its melting temperature (T<sub>m</sub>) is 85°C. The ND-AspRS is thermostable up to 70°C but its thermostability increases when complexed to tRNA<sup>Asn</sup>. In contrast, the GatCAB is poorly protected against heat inactivation, as its denaturation starts at 40°C. The presence of tRNA<sup>Asn</sup> does not prevent denaturation of the GatCAB at the growth temperature of this thermophilic bacteria, as the denaturation starts at 50°C, in agreement with the low affinity of this substrate for the enzyme. Interestingly, when complexed in the transamidosome, the GatCAB becomes fully thermostable at 85°C.



**Figure 6** Stabilization of the transamidosome by the *scaf*-tRNA<sup>Asn</sup>. (A–E) Recognition of the *scaf*-tRNA<sup>Asn</sup> by the ND-AspRS (A, B, D, E), and the GatA and GatB subunits (C). The nucleotides from the anticodon, D arm and anticodon arm are, respectively, in orange, magenta and green and the nucleotide G73 is in blue. (F) Stabilization of the protein partners of the transamidosome against thermal denaturation. The colour code is indicated in the insert. The same absorbance (A) scale is used for the two proteins either in free state or inside the complex, but a different scale is used for the free tRNA<sup>Asn</sup>.

## Discussion

The transamidosome characterized in solution is a 380-kDa complex formed by a dimeric ND-AspRS bound to two tRNAs<sup>Asn</sup> and two GatCABs. As, in addition to its function as substrate, the tRNA also acts as a scaffolding component, this complex constitutes a *bona fide* tRNP. One of the two tRNA<sup>Asn</sup> of the dimeric ND-AspRS, *cat*-tRNA<sup>Asn</sup>, is functionally bound and is devoted to asparaginylase, whereas the second one, *scaf*-tRNA<sup>Asn</sup>, has the function of a scaffolding molecule that ensures the stability of the dynamic complex by preventing dissociation of the two GatCABs. By converting the *cat*-tRNA<sup>Asn</sup>-bound Asp into Asn, the GatB subunit prevents release of Asp-*cat*-tRNA<sup>Asn</sup> and constitutes the key component in the complex that maintains the integrity of the genetic code. Moreover, misincorporation of Asp into polypeptide chains is

further prevented by an additional checkpoint promoted by the absence of significant affinity of the mischarged Asp-tRNA<sup>Asn</sup> for the elongation factor EF-Tu (Becker and Kern, 1998; LaRiviere *et al*, 2001; Roy *et al*, 2007).

In the crystal structure, the acceptor end of the *cat*-tRNA<sup>Asn</sup> is located in the GatB transamidation site. However, as tRNA must be charged with Asp by AspRS before transamidation, it can logically be assumed that formation of Asp-AMP by the ND-AspRS promotes binding of the tRNA CCA end in order to accept the activated Asp. Amidation of Asp occurs then after a shift of the aspartylated 3' tRNA-CCA end of about 35 Å from ND-AspRS to the GatCAB. Interestingly, this movement resembles that occurring in the hydrolytic post-transfer correction mechanism when the mischarged 3' end of tRNA shifts from the aaRS active site to the editing site (Nureki *et al*, 1998; Dock-Bregeon *et al*, 2004; Roy *et al*, 2004). It has

been shown that, in IleRS, the editing site is 34 Å away from synthetic site (Silvian *et al*, 1999).

tRNA<sup>Asp</sup> is capable of binding the ND-AspRS and even promoting formation of the ternary complex, albeit less efficiently than tRNA<sup>Asn</sup> (Bailly *et al*, 2007). Amidation of the bound Asp is, however, strongly disfavoured by the G1-C72 pair and the additional U20A of tRNA<sup>Asp</sup> both acting as antideterminants (Bailly *et al*, 2006). One may postulate that when the transamidosome is assembled with a dimeric ND-AspRS complexed to tRNA<sup>Asn</sup> on one subunit and tRNA<sup>Asp</sup> on the other one, tRNA<sup>Asn</sup> will bind functionally on the GatB site (<sub>cat</sub>tRNA<sup>Asn</sup>) but not tRNA<sup>Asp</sup> (<sub>scaf</sub>tRNA<sup>Asp</sup>), which therefore will escape asparaginylation. In any case, tRNA<sup>Asp</sup> will not be asparaginylation, as it cannot be aminoacylated in the transamidosome.

The crystal structure reveals that a particle of higher complexity than the 380-kDa one characterized in solution, can be formed, which contains an additional dimeric ND-AspRS bound to two tRNAs<sup>Asn</sup>. As the two tRNA-bound ND-AspRSs are symmetrical, this particle very likely reflects a transient state of the transamidosome formed during steady state of tRNA asparaginylation. In this supramolecular complex, each dimeric ND-AspRS is bound to a <sub>cat</sub>tRNA<sup>Asn</sup> whose CCA end is oriented towards the active site of one GatCAB and to a <sub>scaf</sub>tRNA<sup>Asn</sup> whose terminal end is trapped at the GatA/GatB interface of the other GatCAB. Only the <sub>cat</sub>tRNA<sup>Asn</sup> will be converted into Asn-tRNA<sup>Asn</sup>. In the preformed transamidosome, the rate constant of asparaginylation of the first <sub>cat</sub>tRNA<sup>Asn</sup> is probably determined by the shift of the aspartylated CCA end of the tRNA from AspRS to the GatCAB active site. Release of the asparaginylation tRNA<sup>Asn</sup> would dissociate the transamidosome and compromise GatCAB thermostability. Our study suggests that the kinetic mechanism has evolved to handle this paradox. We propose that after asparaginylation of the <sub>cat</sub>tRNA<sup>Asn</sup>, entering of a new tRNA<sup>Asn</sup> saturated ND-AspRS from the opposite side into the complex, promotes dissociation of the AspRS bound on Asn-tRNA<sup>Asn</sup>. The new <sub>cat</sub>tRNA<sup>Asn</sup> fits then into the active site of the previously non-functional GatCAB, whereas the new <sub>scaf</sub>tRNA<sup>Asn</sup> inserts within the scaffolding site of the previously functional GatCAB. According to this mechanism, the steady-state rate of aspartylation/transamidation is determined by the exchange of the ND-AspRS bound to the freshly formed Asn-tRNA<sup>Asn</sup> with a new tRNA saturated ND-AspRS. During this exchange, the tRNP remains assembled by the <sub>scaf</sub>tRNA<sup>Asn</sup> and <sub>cat</sub>tRNA<sup>Asn</sup> of the second AspRS seen in the crystal structure (Figure 3C). After release of the ND-AspRS complex, Asn-<sub>cat</sub>tRNA<sup>Asn</sup> is captured by EF-Tu to fuel the translation machinery.

Acquisition of thermal stability by the GatCAB only inside the transamidosome and, to a lesser extent by the ND-AspRS, to allow survival of *T. thermophilus* at its optimal growth temperature (80–85°C), is puzzling. It indicates that association of protein partners into multiprotein and nucleoprotein complexes can constitute an artifact developed by thermophilic organisms to confer thermal stability of their proteins at the optimal growth temperature. Because of its thermal instability, GatCAB may not derive from a thermostable protein ancestor but more likely from a mesophilic precursor. Likewise, the ND-AspRS, less thermostable than the discriminatory AspRS from *T. thermophilus*, is probably not of thermophilic origin and may also derive from a mesophilic organism.

## Materials and methods

### Purification, crystallization and structure determination of the transamidosome

The methods were described earlier (Bailly *et al*, 2007, 2008, 2009). Data and refinement statistics are summarized in Table I. The structure and the structure factors have been deposited to the Protein Data Bank under the accession number 3KFU.

### SAXS experiments

The measurements were carried out on a laboratory-based instrument at the University of Aarhus (Pedersen, 2004). Concentration series of c and c/2 were measured for 3 h at 4°C. Background subtraction and normalizations were performed by use of the SUPERSAXS package (CLP Oliveira and JS Pedersen, unpublished data). The data were normalized to absolute scale by use of water as a primary standard and the final intensity was displayed as a function of the scattering vector  $q = (4\pi/\lambda) \sin(\theta)$ , where  $\lambda = 1.54$  Å is the X-ray wavelength and  $\theta$  is the angle between the incoming and the scattered X-rays. The *ab initio* modelling and comparison with crystal structure data were carried out with, respectively, the DAMMIN (Svergun, 1999) and CRYSOLO (Svergun *et al*, 1995) programs. Rigid body modelling using subunits with known atomic structure were carried out using SASREF (Svergun *et al*, 1995). The optimization of the *ab initio* and rigid body models has been done using simulated annealing procedures. All averaging of the models were carried out using the DAMAVER program package (Kozin and Svergun, 2001).

### Aminoacylation and transamidation reactions

The reactions were conducted in 200 µl mixtures containing 0.1 M Hepes-Na buffer pH 7.2, 30 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 µM of either binary AspRS•tRNA<sup>Asn</sup> complex or transamidosome isolated by gel filtration, 10 µM L-[<sup>14</sup>C] Asp (330 c.p.m./pmol), 1 mM ATP, 2 mM L-Gln without or with 5 µM tRNA<sup>Asn</sup>. The [<sup>14</sup>C] aa-tRNA formed at the indicated temperature was determined as described (Bailly *et al*, 2007) in 20 µl aliquots withdrawn at various incubation times.

### Thermal denaturation

Thermal denaturation assays were performed with an Uvikon XL (SECOMAM, Domont, France) spectrophotometer equipped with a Peltier thermostated cell holder. Denaturation curves were recorded at 260 nm with a heating rate of 0.25°C/min between 10 and 85°C. The temperature was measured by a thermocouple inserted into one cell. Cells were designed specifically by Dr P Walter (IBMC, Strasbourg), in order to prevent any water loss by evaporation during the experiment. Experiments were carried out in 0.1 M Hepes-Na buffer pH 7.2 containing 30 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub> in the presence of the partners of the transamidosome in various states and in a stoichiometry found in the ternary complex: 0.8 µM tRNA<sup>Asn</sup> or GatCAB or purified GatCAB•tRNA<sup>Asn</sup> complex or ND-AspRS subunits, or 0.4 µM purified transamidosome or ND-AspRS•tRNA<sup>Asn</sup> complex.

The figures of the structure of the transamidosome were generated with Pymol. DeLano WL. The PyMOL Molecular Graphics System (2002) on World Wide Web <http://www.pymol.org>.

### Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online (<http://www.embojournal.org>).

## Acknowledgements

This work was supported by the University Louis Pasteur (Strasbourg), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), ACI Biologie Cellulaire Moléculaire et Structurale and the Center for Carbohydrate Recognition and Signalling (CARB). We thank E Westhof, P Nissen and J Stougaard for support, L Yattime and JP Morth for discussions, E Ennifar for help with UV-melting experiments, M Brayé for technical assistance and LE Sanderson for critical reading of the paper. M Bailly and M Blaise were recipients of a fellowship from ARC and AFM.

*Author contributions:* M Blaise crystallized, solved the structure, designed research and wrote the paper, M Bailly purified the complex and participated to the first crystallizations, M Bailly and

F Fischer performed the biochemical experiments, M Frechin helped with the structure rebuilding, MA Behrens did the SAXS measurements and SAXS data analysis, CPL Oliveira, JS Pedersen supervised the SAXS experiments and data analysis, S Thirup supervised research, H Becker and D Kern supervised research and wrote the paper.

*Author information:* Atomic coordinates and structure factors have been deposited with the Protein Data Bank under accession 3KUFU.

## Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Bailey M, Blaise M, Lorber B, Becker HD, Kern D (2007) The transamidosome: a dynamic ribonucleoprotein particle dedicated to prokaryotic tRNA-dependent asparagine biosynthesis. *Mol Cell* **28**: 228–239
- Bailey M, Blaise M, Lorber B, Thirup S, Kern D (2009) Isolation, crystallization and preliminary X-ray analysis of the transamidosome a ribonucleoprotein involved in asparagine formation. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **65**: 577–581
- Bailey M, Blaise M, Roy H, Deniziak M, Lorber B, Birck C, Becker HD, Kern D (2008) tRNA-dependent asparagine formation in prokaryotes: characterization isolation and structural and functional analysis of a ribonucleoprotein particle generating Asn-tRNA<sup>Asn</sup>. *Methods* **44**: 146–163
- Bailey M, Giannouli S, Blaise M, Stathopoulos C, Kern D, Becker HD (2006) A single tRNA base-pair mediates bacterial tRNA-dependent biosynthesis of asparagine. *Nucleic Acids Res* **34**: 6083–6094
- Becker HD, Kern D (1998) *Thermus thermophilus*: a link in evolution of the tRNA-dependent amino acid amidation pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12832–12837
- Charron C, Roy H, Blaise M, Giegé R, Kern D (2003) Non-discriminating and discriminating aspartyl-tRNA synthetases differ in the anticodon-binding domain. *EMBO J* **22**: 1632–1643
- Curnow AW, Ibba M, Söll D (1996) tRNA-dependent asparagine formation. *Nature* **382**: 589–590
- Curnow AW, Tumbula DL, Pelaschier JT, Min B, Söll D (1998) Glutamyl-tRNA<sup>Gln</sup> amidotransferase in *Deinococcus radiodurans* may be confined to asparagine biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12838–12843
- Delarue M, Poterszman A, Nikonov S, Garber M, Moras D, Thierry J-C (1994) Crystal structure of a prokaryotic aspartyl-tRNA-synthetase. *EMBO J* **13**: 189–197
- Deniziak M, Sauter C, Becker HD, Paulus CA, Giegé R, Kern D (2007) *Deinococcus* glutamyl-tRNA synthetase is a chimera between proteins from an ancient and the modern pathways of aminoacyl-tRNA formation. *Nucleic Acids Res* **35**: 1421–1431
- Dock-Bregeon AC, Rees B, Torres-Larios A, Bey G, Caillet J, Moras D (2004) Achieving error-free translation; the mechanism of proof-reading of threonyl-tRNA synthetase at atomic resolution. *Mol Cell* **16**: 375–386
- Ibba M, Söll D (2004) Aminoacyl-tRNAs: setting the limits of the genetic code. *Genes Dev* **18**: 731–738
- Kern D, Lapointe J (1979) Glutamyl-transfer ribonucleic acid synthetase from *Escherichia coli*. Effect of alteration of the 5-(methylaminomethyl)-2-thiouridine in the anticodon of glutamic acid transfer ribonucleic acid on the catalytic mechanism. *Biochemistry* **18**: 5819–5826
- Kern D, Roy H, Becker H (2005) Asparaginyl-tRNA synthetases. In *The Aminoacyl-tRNA Synthetases*, Ibba M, Francklyn C, Cusack S (eds), Chapter 28, Georgetown, TX: Landes Bioscience
- Kozin MB, Svergun DI (2001) Automated matching of high- and low-resolution structural models. *J Appl Cryst* **34**: 33–41
- LaRiviere FJ, Wolfson AD, Uhlenbeck OC (2001) Uniform binding of aminoacyl-tRNAs to elongation factor Tu by thermodynamic compensation. *Science* **294**: 165–168
- Nakamura A, Sheppard K, Yamane J, Yao M, Söll D, Tanaka I (2010) Two distinct regions in *Staphylococcus aureus* GatCAB guarantee accurate tRNA recognition. *Nucleic Acids Res* **38**: 672–682
- Nakamura A, Yao M, Chimmnarong S, Sakai N, Tanaka I (2006) Ammonia channel couples glutaminase with transamidase reactions in GatCAB. *Science* **312**: 1954–1958
- Nureki O, Vassylyev DG, Tateno M, Shimada A, Nakama T, Fukai S, Konno M, Hendrickson TL, Schimmel P, Yokoyama S (1998) Enzyme structure with two catalytic sites for double-sieve selection of substrate. *Science* **280**: 578–582
- Oshikane H, Sheppard K, Fukai S, Nakamura Y, Ishitani R, Numata T, Sherrer RL, Feng L, Schmitt E, Panvert M, Blanquet S, Mechulam Y, Söll D, Nureki O (2006) Structural basis of RNA-dependent recruitment of glutamine to the genetic code. *Science* **312**: 1950–1954
- Pedersen JS (2004) A flux- and background-optimized version of the NanoSTAR small-angle X-ray scattering camera for solution scattering. *J Appl Cryst* **37**: 369–380
- Roy H, Becker HD, Mazauric MH, Kern D (2007) Structural elements defining elongation factor Tu mediated suppression of codon ambiguity. *Nucleic Acids Res* **35**: 3420–3430
- Roy H, Ling J, Irnov M, Ibba M (2004) Post-transfer editing *in vitro* and *in vivo* by the beta subunit of phenylalanyl-tRNA synthetase. *EMBO J* **23**: 4639–4648
- Ruff M, Krishnaswamy S, Boeglin M, Poterszman A, Mitschler A, Podjarny A, Rees B, Thierry J-C, Moras D (1991) Class II aminoacyl transfer RNA synthetases: crystal structure of yeast aspartyl-tRNA synthetase complexed with tRNA<sup>Asp</sup>. *Science* **252**: 1682–1689
- Schmitt E, Moulinier L, Fujiwara S, Imanaka T, Thierry JC, Moras D (1998) Crystal structure of aspartyl-tRNA synthetase from *Pyrococcus kodakaraensis* KOD: archaeon specificity and catalytic mechanism of adenylate formation. *EMBO J* **17**: 5227–5237
- Sheppard K, Yuan J, Hohn MJ, Jester B, Devine KM, Söll D (2008) From one amino acid to another: tRNA-dependent amino acid biosynthesis. *Nucleic Acids Res* **36**: 1813–1825
- Silvian LF, Wang J, Steitz TA (1999) Insights into editing from an Ile-tRNA synthetase structure with tRNA<sup>Ile</sup> and mupirocin. *Science* **285**: 1074–1077
- Small-Howard A, Morozova N, Stoytcheva Z, Forry EP, Mansell JB, Harney JW, Carlson BA, Xu X-M, Hatfield DL, Berry MJ (2006) Supramolecular complexes mediate selenocysteine incorporation *in vivo*. *Mol Cell Biol* **26**: 2337–2346
- Svergun DI (1999) Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys J* **76**: 2879–2886
- Svergun DI, Barberato C, Koch MHJ (1995) CRYSOLO—a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J Appl Cryst* **28**: 768–773
- Svergun DI, Petoukhov MV (2005) Global rigid body modeling of macromolecular complexes against small-angle scattering data. *Biophys J* **89**: 1237–1250
- Tomita K, Ishitani R, Fukai S, Nureki O (2006) Complete crystallographic analysis of the dynamics of CCA sequence addition. *Nature* **443**: 956–960
- Wilcox M (1969) Gamma-glutamyl phosphate attached to glutamine-specific tRNA a precursor of glutamyl-tRNA in *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem* **11**: 405–412
- Wu J, Sheppard K, Kitabatake M, Kwon ST, Söll D, Smith JL (2009) Insights into tRNA-dependent amidotransferase evolution and catalysis from the structure of the *Aquifex aeolicus* enzyme. *J Mol Biol* **391**: 703–716
- Zhang C-M, Liu C, Slater S, Hou YM (2008) Aminoacylation of tRNA with phosphoserine for synthesis of cysteinyl-tRNA<sup>Cys</sup>. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 507–514

- Adams, A.E., Cooper, J.A., and Drubin, D.G. (1993). Unexpected combinations of null mutations in genes encoding the actin cytoskeleton are lethal in yeast. *Mol Biol Cell* *4*, 459-468.
- Agou, F., and Mirande, M. (1997). Aspartyl-tRNA synthetase from rat: in vitro functional analysis of its assembly into the multisynthetase complex. *Eur J Biochem* *243*, 259-267.
- Agris, P.F., Soll, D., and Seno, T. (1973). Biological function of 2-thiouridine in *Escherichia coli* glutamic acid transfer ribonucleic acid. *Biochemistry* *12*, 4331-4337.
- Agris, P.F., Vendeix, F.A., and Graham, W.D. (2007). tRNA's wobble decoding of the genome: 40 years of modification. *J Mol Biol* *366*, 1-13.
- Ahel, I., Korencic, D., Ibba, M., and Soll, D. (2003). Trans-editing of mischarged tRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 15422-15427.
- Ahuatzi, D., Herrero, P., de la Cera, T., and Moreno, F. (2004). The glucose-regulated nuclear localization of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is Mig1-dependent. *J Biol Chem* *279*, 14440-14446.
- Ahuatzi, D., Riera, A., Pelaez, R., Herrero, P., and Moreno, F. (2007). Hxk2 regulates the phosphorylation state of Mig1 and therefore its nucleocytoplasmic distribution. *J Biol Chem* *282*, 4485-4493.
- Akins RA, Lambowitz AM. (1987). A protein required for splicing group I introns in *Neurospora* mitochondria is mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase or a derivative thereof. *Cell*. *50*:331-45.
- Albert, R., Jeong, H., and Barabasi, A.L. (2000). Error and attack tolerance of complex networks. *Nature* *406*, 378-382.
- Alpers, D.H., and Tomkins, G.M. (1965). The Order of Induction and Deinduction of the Enzymes of the Lactose Operon in *E. Coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *53*, 797-802.
- Ambrogelly, A., Ahel, I., Polycarpo, C., Bunjun-Srihari, S., Krett, B., Jacquin-Becker, C., Ruan, B., Kohrer, C., Stathopoulos, C., RajBhandary, U.L., *et al.* (2002). *Methanocaldococcus jannaschii* prolyl-tRNA synthetase charges tRNA(Pro) with cysteine. *J Biol Chem* *277*, 34749-34754.
- Ammala, C., Eliasson, L., Bokvist, K., Berggren, P.O., Honkanen, R.E., Sjöholm, A., and Rorsman, P. (1994). Activation of protein kinases and inhibition of protein phosphatases play a central role in the regulation of exocytosis in mouse pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 4343-4347.
- An, S., and Musier-Forsyth, K. (2004). Trans-editing of Cys-tRNA<sup>Pro</sup> by *Haemophilus influenzae* YbaK protein. *J Biol Chem*. *279*:42359-62.

- An, S., and Musier-Forsyth, K. (2005). Cys-tRNA(Pro) editing by *Haemophilus influenzae* YbaK via a novel synthetase. YbaK.tRNA ternary complex. *J Biol Chem* *280*, 34465-34472.
- Angeli, D., Ferrell, J.E., Jr., and Sontag, E.D. (2004). Detection of multistability, bifurcations, and hysteresis in a large class of biological positive-feedback systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 1822-1827.
- Arif, A., Jia, J., Mukhopadhyay, R., Willard, B., Kinter, M., and Fox, P.L. (2009). Two-site phosphorylation of EPRS coordinates multimodal regulation of noncanonical translational control activity. *Mol Cell* *35*, 164-180.
- Arosio, D., Ricci, F., Marchetti, L., Gualdani, R., Albertazzi, L., and Beltram, F. (2010). Simultaneous intracellular chloride and pH measurements using a GFP-based sensor. *Nat Methods* *7*, 516-518.
- Averet, N., Fitton, V., Bunoust, O., Rigoulet, M., and Guerin, B. (1998). Yeast mitochondrial metabolism: from in vitro to in situ quantitative study. *Mol Cell Biochem* *184*, 67-79.
- Bailly, M., Blaise, M., Lorber, B., Becker, H.D., and Kern, D. (2007). The transamidosome: a dynamic ribonucleoprotein particle dedicated to prokaryotic tRNA-dependent asparagine biosynthesis. *Mol Cell* *28*, 228-239.
- Bailly, M., Blaise, M., Roy, H., Deniziak, M., Lorber, B., Birck, C., Becker, H.D., and Kern, D. (2008). tRNA-dependent asparagine formation in prokaryotes: characterization, isolation and structural and functional analysis of a ribonucleoprotein particle generating Asn-tRNA(Asn). *Methods* *44*, 146-163.
- Bailly, M., Giannouli, S., Blaise, M., Stathopoulos, C., Kern, D., and Becker, H.D. (2006). A single tRNA base pair mediates bacterial tRNA-dependent biosynthesis of asparagine. *Nucleic Acids Res* *34*, 6083-6094.
- Baldwin, A.N., and Berg, P. (1966). Transfer ribonucleic acid-induced hydrolysis of valyladenylate bound to isoleucyl ribonucleic acid synthetase. *J Biol Chem* *241*, 839-845.
- Baldwin, M.L., Cammarota, M., Sim, A.T., and Rostas, J.A. (2006). Src family tyrosine kinases differentially modulate exocytosis from rat brain nerve terminals. *Neurochem Int* *49*, 80-86.
- 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.
- Bandyopadhyay, A.K., and Deutscher, M.P. (1971). Complex of aminoacyl-transfer RNA synthetases. *J Mol Biol* *60*, 113-122.
- Barrientos, A., Korr, D., and Tzagoloff, A. (2002). Shy1p is necessary for full expression of mitochondrial COX1 in the yeast model of Leigh's syndrome. *EMBO J* *21*, 43-52.

- Bec, G., Kerjan, P., Waller, J.P. (1994). Reconstitution in vitro of the valyl-tRNA synthetase-elongation factor (EF) 1 beta gamma delta complex. Essential roles of the NH<sub>2</sub>-terminal extension of valyl-tRNA synthetase and of the EF-1 delta subunit in complex formation. *J Biol Chem* 269:2086-92.
- Beck, T., and Hall, M.N. (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* 402, 689-692.
- Becker, H.D., and Kern, D. (1998). *Thermus thermophilus*: a link in evolution of the tRNA-dependent amino acid amidation pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12832-12837.
- Becker, H.D., Reinbolt, J., Kreutzer, R., Giege, R., and Kern, D. (1997). Existence of two distinct aspartyl-tRNA synthetases in *Thermus thermophilus*. Structural and biochemical properties of the two enzymes. *Biochemistry* 36, 8785-8797.
- Benne, R. (1994). RNA editing in trypanosomes. *Eur J Biochem* 221, 9-23.
- Berry, M.J., Banu, L., Chen, Y.Y., Mandel, S.J., Kieffer, J.D., Harney, J.W., and Larsen, P.R. (1991). Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region. *Nature* 353, 273-276.
- Blaise, M., Bailly, M., Frechin, M., Behrens, M.A., Fischer, F., Oliveira, C.L., Becker, H.D., Pedersen, J.S., Thirup, S., and Kern, D. Crystal structure of a transfer-ribonucleoprotein particle that promotes asparagine formation. *EMBO J*.
- Bolender, N., Sickmann, A., Wagner, R., Meisinger, C., and Pfanner, N. (2008). Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Rep* 9, 42-49.
- Bond, S., and Forgac, M. (2008). The Ras/cAMP/protein kinase A pathway regulates glucose-dependent assembly of the vacuolar (H<sup>+</sup>)-ATPase in yeast. *J Biol Chem* 283, 36513-36521.
- Boyer PD. (1997). The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* 66:717-49.
- Brauer, M.J., Saldanha, A.J., Dolinski, K., and Botstein, D. (2005). Homeostatic adjustment and metabolic remodeling in glucose-limited yeast cultures. *Mol Biol Cell* 16, 2503-2517.
- Brick, P., Bhat, T.N., and Blow, D.M. (1989). Structure of tyrosyl-tRNA synthetase refined at 2.3 Å resolution. Interaction of the enzyme with the tyrosyl adenylate intermediate. *J Mol Biol* 208, 83-98.
- Brogna, S., and Ashburner, M. (1997). The Adh-related gene of *Drosophila melanogaster* is expressed as a functional dicistronic messenger RNA: multigenic transcription in higher organisms. *EMBO J* 16, 2023-2031.
- Brown, A.J. (1993). mRNA translation and turnover: a cellular perspective on their relationship. *Trends Cell Biol* 3, 180-183.

- Brown, J.R., Gentry, D., Becker, J.A., Ingraham, K., Holmes, D.J., and Stanhope, M.J. (2003). Horizontal transfer of drug-resistant aminoacyl-transfer-RNA synthetases of anthrax and Gram-positive pathogens. *EMBO Rep* 4, 692-698.
- Brown, T.A., Fetter, R.D., Tkachuk, A.N., and Clayton, D.A. Approaches toward super-resolution fluorescence imaging of mitochondrial proteins using PALM. *Methods*.
- Brunel C, Romby P, Moine H, Caillet J, Grunberg-Manago M, Springer M, Ehresmann B, Ehresmann C. (1993). Translational regulation of the *Escherichia coli* threonyl-tRNA synthetase gene: structural and functional importance of the thrS operator domains. *Biochimie*. 75:1167-79.
- Buddha, M.R., Crane, B.R. (2005) Structure and activity of an aminoacyl-tRNA synthetase that charges tRNA with nitro-tryptophan. *Nat Struct Mol Biol*.12:274-5.
- Buddha, M.R., Keery, K.M., and Crane, B.R. (2004a). An unusual tryptophanyl tRNA synthetase interacts with nitric oxide synthase in *Deinococcus radiodurans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15881-15886.
- Buddha, M.R., Tao, T., Parry, R.J., and Crane, B.R. (2004b). Regioselective nitration of tryptophan by a complex between bacterial nitric-oxide synthase and tryptophanyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* 279, 49567-49570.
- Bult, C.J., White, O., Olsen, G.J., Zhou, L., Fleischmann, R.D., Sutton, G.G., Blake, J.A., FitzGerald, L.M., Clayton, R.A., Gocayne, J.D., *et al.* (1996). Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273, 1058-1073.
- Burnett, G., and Kennedy, E.P. (1954). The enzymatic phosphorylation of proteins. *J Biol Chem* 211, 969-980.
- Cai, X., Lietha, D., Ceccarelli, D.F., Karginov, A.V., Rajfur, Z., Jacobson, K., Hahn, K.M., Eck, M.J., and Schaller, M.D. (2008). Spatial and temporal regulation of focal adhesion kinase activity in living cells. *Mol Cell Biol* 28, 201-214.
- Cannarozzi, G., Schraudolph, N.N., Faty, M., von Rohr, P., Friberg, M.T., Roth, A.C., Gonnet, P., Gonnet, G., and Barral, Y. (2010). A role for codon order in translation dynamics. *Cell* 141, 355-367.
- Carlson, M. (1999). Glucose repression in yeast. *Curr Opin Microbiol* 2, 202-207.
- Carpenter, A.E., Jones, T.R., Lamprecht, M.R., Clarke, C., Kang, I.H., Friman, O., Guertin, D.A., Chang, J.H., Lindquist, R.A., Moffat, J., *et al.* (2006). CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol* 7, R100.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.

- Chang, Y.F., Imam, J.S., and Wilkinson, M.F. (2007). The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem* 76, 51-74.
- Chatton, B., Walter, P., Ebel, J.P., Lacroute, F., and Fasiolo, F. (1988). The yeast VAS1 gene encodes both mitochondrial and cytoplasmic valyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem* 263, 52-57.
- Chen, Q., Vazquez, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., and Lesnefsky, E.J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 278, 36027-36031.
- Cherniack AD, Garriga G, Kittle JD Jr, Akins RA, Lambowitz AM. (1990). Function of *Neurospora* mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase in RNA splicing requires an idiosyncratic domain not found in other synthetases. *Cell*. 62:745-55.
- Choder, M. (2004). Rpb4 and Rpb7: subunits of RNA polymerase II and beyond. *Trends Biochem Sci* 29, 674-681.
- Christian, E.L., Zahler, N.H., Kaye, N.M., and Harris, M.E. (2002). Analysis of substrate recognition by the ribonucleoprotein endonuclease RNase P. *Methods* 28, 307-322.
- Chuang, H.Y., Hofree, M., and Ideker, T. (2010). A Decade of Systems Biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*.
- Cigan, A.M., Feng, L., and Donahue, T.F. (1988). tRNA<sup>i</sup>(met) functions in directing the scanning ribosome to the start site of translation. *Science* 242, 93-97.
- Cirakoglu, B., Mirande, M., and Waller, J.P. (1985). A model for the structural organization of aminoacyl-tRNA synthetases in mammalian cells. *FEBS Lett* 183, 185-190.
- Ciriacy, M. (1977). Isolation and characterization of yeast mutants defective in intermediary carbon metabolism and in carbon catabolite derepression. *Mol Gen Genet* 154, 213-220.
- Cline, M.S., Smoot, M., Cerami, E., Kuchinsky, A., Landys, N., Workman, C., Christmas, R., Avila-Campilo, I., Creech, M., Gross, B., *et al.* (2007). Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nat Protoc* 2, 2366-2382.
- Coenen, M.J., van den Heuvel, L.P., and Smeitink, J.A. (2001). Mitochondrial oxidative phosphorylation system assembly in man: recent achievements. *Curr Opin Neurol* 14, 777-781.
- Cohen, J., and Stewart, I. (1994). *The collapse of chaos : discovering simplicity in a complex world* (New York, Viking).
- Coluccio, A., Bogengruber, E., Conrad, M.N., Dresser, M.E., Briza, P., and Neiman, A.M. (2004). Morphogenetic pathway of spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 3, 1464-1475.

- Cone, J.E., Del Rio, R.M., Davis, J.N., and Stadtman, T.C. (1976). Chemical characterization of the selenoprotein component of clostridial glycine reductase: identification of selenocysteine as the organoselenium moiety. *Proc Natl Acad Sci U S A* *73*, 2659-2663.
- Costanzo, M., Baryshnikova, A., Bellay, J., Kim, Y., Spear, E.D., Sevier, C.S., Ding, H., Koh, J.L., Toufighi, K., Mostafavi, S., *et al.* (2010). The genetic landscape of a cell. *Science* *327*, 425-431.
- Cramer, F., Faulhammer, H., von der Haar, F., Sprinzl, M., and Sternbach, H. (1975). Aminoacyl-tRNA synthetases from baker's yeast: reacting site of enzymatic aminoacylation is not uniform for all tRNAs. *FEBS Lett* *56*, 212-214.
- Crick, F.H. (1966). Codon--anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J Mol Biol* *19*, 548-555.
- Crick, F.H. (1968). The origin of the genetic code. *J Mol Biol* *38*, 367-379.
- Crofts, A.R. (2004). The cytochrome bc1 complex: function in the context of structure. *Annu Rev Physiol* *66*, 689-733.
- Curnow, A.W., Hong, K., Yuan, R., Kim, S., Martins, O., Winkler, W., Henkin, T.M., and Soll, D. (1997). Glu-tRNA<sup>Gln</sup> amidotransferase: a novel heterotrimeric enzyme required for correct decoding of glutamine codons during translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 11819-11826.
- Curnow, A.W., Tumbula, D.L., Pelaschier, J.T., Min, B., and Soll, D. (1998). Glutamyl-tRNA<sup>Gln</sup> amidotransferase in *Deinococcus radiodurans* may be confined to asparagine biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 12838-12843.
- Cusack, S., Berthet-Colominas, C., Hartlein, M., Nassar, N., and Leberman, R. (1990). A second class of synthetase structure revealed by X-ray analysis of *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase at 2.5 Å. *Nature* *347*, 249-255.
- Cyran, S.A., Buchsbaum, A.M., Reddy, K.L., Lin, M.C., Glossop, N.R., Hardin, P.E., Young, M.W., Storti, R.V., and Blau, J. (2003). vrille, Pdp1, and dClock form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell* *112*, 329-341.
- Dagkessamanskaia, A., Martin-Yken, H., Basmaji, F., Briza, P., and Francois, J. (2001). Interaction of Knr4 protein, a protein involved in cell wall synthesis, with tyrosine tRNA synthetase encoded by TYS1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* *200*, 53-58.
- Dao, V., Guenther, R.H., and Agris, P.F. (1992). The role of 5-methylcytidine in the anticodon arm of yeast tRNA<sup>Phe</sup>: site-specific Mg<sup>2+</sup> binding and coupled conformational transition in DNA analogs. *Biochemistry* *31*, 11012-11019.
- de Visser, J.A., Hermisson, J., Wagner, G.P., Ancel Meyers, L., Bagheri-Chaichian, H., Blanchard, J.L., Chao, L., Cheverud, J.M., Elena, S.F., Fontana, W., *et al.* (2003). Perspective: Evolution and detection of genetic robustness. *Evolution* *57*, 1959-1972.

- De Winde, J.H., Crauwels, M., Hohmann, S., Thevelein, J.M., and Winderickx, J. (1996). Differential requirement of the yeast sugar kinases for sugar sensing in establishing the catabolite-repressed state. *Eur J Biochem* 241, 633-643.
- Delille, H.K., Alves, R., and Schrader, M. (2009). Biogenesis of peroxisomes and mitochondria: linked by division. *Histochem Cell Biol* 131, 441-446.
- Delon, I., and Brown, N.H. (2007). Integrins and the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 19, 43-50.
- DeRisi, J.L., Iyer, V.R., and Brown, P.O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278, 680-686.
- Descartes, R. (1637) *Le Discours de la méthode, pour bien conduire sa raison et chercher la vérité dans les sciences*. Préface à la Dioptrique, les Météores, la Géométrie.
- Dilova, I., Aronova, S., Chen, J.C., and Powers, T. (2004). Tor signaling and nutrient-based signals converge on Mks1p phosphorylation to regulate expression of Rtg1.Rtg3p-dependent target genes. *J Biol Chem* 279, 46527-46535.
- Dong, H., Nilsson, L., and Kurland, C.G. (1996). Co-variation of tRNA abundance and codon usage in *Escherichia coli* at different growth rates. *J Mol Biol* 260, 649-663.
- Drummond, D.A., and Wilke, C.O. (2009). The evolutionary consequences of erroneous protein synthesis. *Nat Rev Genet* 10, 715-724.
- Duret, L. (2000). tRNA gene number and codon usage in the *C. elegans* genome are co-adapted for optimal translation of highly expressed genes. *Trends Genet* 16, 287-289.
- Ebel, J.P., Giege, R., Bonnet, J., Kern, D., Befort, N., Bollack, C., Fasiolo, F., Gangloff, J., and Dirheimer, G. (1973). Factors determining the specificity of the tRNA aminoacylation reaction. Non-absolute specificity of tRNA-aminoacyl-tRNA synthetase recognition and particular importance of the maximal velocity. *Biochimie* 55, 547-557.
- Eisenberg, T., Buttner, S., Kroemer, G., and Madeo, F. (2007). The mitochondrial pathway in yeast apoptosis. *Apoptosis* 12, 1011-1023.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.
- Elledge, S.J. (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274, 1664-1672.
- Eriani, G., Cavarelli, J., Martin, F., Dirheimer, G., Moras, D., and Gangloff, J. (1993). Role of dimerization in yeast aspartyl-tRNA synthetase and importance of the class II invariant proline. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10816-10820.

- Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J., and Moras, D. (1990). Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* 347, 203-206.
- Fernandez-Murray, J.P., and McMaster, C.R. (2006). Identification of novel phospholipid binding proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 580, 82-86.
- Fersht, A.R. (1977). Editing mechanisms in protein synthesis. Rejection of valine by the isoleucyl-tRNA synthetase. *Biochemistry* 16, 1025-1030.
- Finley, L.W., and Haigis, M.C. (2009). The coordination of nuclear and mitochondrial communication during aging and calorie restriction. *Ageing Res Rev* 8, 173-188.
- Fleckner, J., Rasmussen, H.H., and Justesen, J. (1991). Human interferon gamma potently induces the synthesis of a 55-kDa protein (gamma 2) highly homologous to rabbit peptide chain release factor and bovine tryptophanyl-tRNA synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11520-11524.
- Forchhammer, J., and Lindahl, L. (1971). Growth rate of polypeptide chains as a function of the cell growth rate in a mutant of *Escherichia coli* 15. *J Mol Biol* 55, 563-568.
- Forsburg, S.L., and Guarente, L. (1989). Communication between mitochondria and the nucleus in regulation of cytochrome genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Cell Biol* 5, 153-180.
- Forster, C., Limmer, S., Zeidler, W., and Sprinzl, M. (1994). Effector region of the translation elongation factor EF-Tu.GTP complex stabilizes an orthoester acid intermediate structure of aminoacyl-tRNA in a ternary complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4254-4257.
- Frechin, M., Kern, D., Martin, R.P., Becker, H.D., and Senger, B. (2010). Arc1p: anchoring, routing, coordinating. *FEBS Lett* 584, 427-433.
- Frechin, M., Senger, B., Braye, M., Kern, D., Martin, R.P., and Becker, H.D. (2009). Yeast mitochondrial Gln-tRNA(Gln) is generated by a GatFAB-mediated transamidation pathway involving Arc1p-controlled subcellular sorting of cytosolic GluRS. *Genes Dev* 23, 1119-1130.
- Frugier, M., Ryckelynck, M., and Giege, R. (2005). tRNA-balanced expression of a eukaryal aminoacyl-tRNA synthetase by an mRNA-mediated pathway. *EMBO Rep* 6, 860-865.
- Funahashi, A., Jouraku, A., Matsuoka, Y., and Kitano, H. (2007). Integration of CellDesigner and SABIO-RK. *In Silico Biol* 7, S81-90.
- Galani, K., Grosshans, H., Deinert, K., Hurt, E.C., and Simos, G. (2001). The intracellular location of two aminoacyl-tRNA synthetases depends on complex formation with Arc1p. *EMBO J* 20, 6889-6898.
- Gardner, M. (1970) The fantastic combinations of John Conway's new solitaire game « life », *Scientific American* 223, 120-123.

- Gaur, R., Grasso, D., Datta, P.P., Krishna, P.D., Das, G., Spencer, A., Agrawal, R.K., Spremulli, L., and Varshney, U. (2008). A single mammalian mitochondrial translation initiation factor functionally replaces two bacterial factors. *Mol Cell* *29*, 180-190.
- Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., *et al.* (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* *415*, 141-147.
- Giannouli, S., Kyritsis, A., Malissovass, N., Becker, H.D., and Stathopoulos, C. (2009). On the role of an unusual tRNA<sup>Gly</sup> isoacceptor in *Staphylococcus aureus*. *Biochimie* *91*, 344-351.
- Giege, R. (2003). Genetic code expansion. *Nat Struct Biol* *10*, 414-416.
- Giege, R., Puglisi, J.D., and Florentz, C. (1993). tRNA structure and aminoacylation efficiency. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* *45*, 129-206.
- Giege, R., Sissler, M., and Florentz, C. (1998). Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Res* *26*, 5017-5035.
- Godinic, V., Mocibob, M., Rocak, S., Ibba, M., and Weygand-Durasevic, I. (2007). Peroxin Pex21p interacts with the C-terminal noncatalytic domain of yeast seryl-tRNA synthetase and forms a specific ternary complex with tRNA(Ser). *FEBS J* *274*, 2788-2799.
- Goldgur, Y., and Safro, M. (1994). Aminoacyl-tRNA synthetases from *Haloarcula marismortui*: an evidence for a multienzyme complex in a procaryotic system. *Biochem Mol Biol Int* *32*, 1075-1083.
- Golinelli-Cohen, M.P., and Mirande, M. (2007). Arc1p is required for cytoplasmic confinement of synthetases and tRNA. *Mol Cell Biochem* *300*, 47-59.
- Gong, Y., Kakiyama, Y., Krogan, N., Greenblatt, J., Emili, A., Zhang, Z., and Houry, W.A. (2009). An atlas of chaperone-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*: implications to protein folding pathways in the cell. *Mol Syst Biol* *5*, 275.
- Graindorge, J.S., Senger, B., Tritsch, D., Simos, G., and Fasiolo, F. (2005). Role of Arc1p in the modulation of yeast glutamyl-tRNA synthetase activity. *Biochemistry* *44*, 1344-1352.
- Granjon, Y. (2003) *Automatique. - Systèmes linéaires, non linéaires, à temps continu, à temps discret, représentation d'état.* Dunod, collection science sup
- Gray, M.W., Burger, G., and Lang, B.F. (2001). The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol* *2*, REVIEWS1018.
- Green, D.R., and Kroemer, G. (2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* *458*, 1127-1130.

- Greenberg Y, King M, Kiosses WB, Ewalt K, Yang X, Schimmel P, Reader JS, Tzima E. (2008). The novel fragment of tyrosyl tRNA synthetase, mini-TyrRS, is secreted to induce an angiogenic response in endothelial cells. *FASEB J.* 22:1597-605.
- Grewal, S.I., and Rice, J.C. (2004). Regulation of heterochromatin by histone methylation and small RNAs. *Curr Opin Cell Biol* 16, 230-238.
- Guo, F., Gabor, J., Cen, S., Hu, K., Mouland, A.J., Kleiman, L. (2005). Inhibition of cellular HIV-1 protease activity by lysyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem.* 280:26018-23.
- Guo WW, Moran JV, Hoffman PW, Henke RM, Butow RA, Perlman PS. (1995). The mobile group I intron 3 alpha of the yeast mitochondrial COXI gene encodes a 35-kDa processed protein that is an endonuclease but not a maturase. *J Biol Chem.* 270:15563-70.
- Guzzo, C.M., Yang, D.C. (2008). Lysyl-tRNA synthetase interacts with EF1alpha, aspartyl-tRNA synthetase and p38 in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 365:718-23.
- Halaschek-Wiener, J., Wacheck, V., Kloog, Y., and Jansen, B. (2004). Ras inhibition leads to transcriptional activation of p53 and down-regulation of Mdm2: two mechanisms that cooperatively increase p53 function in colon cancer cells. *Cell Signal* 16, 1319-1327.
- Hale, S.P., Auld, D.S., Schmidt, E., and Schimmel, P. (1997). Discrete determinants in transfer RNA for editing and aminoacylation. *Science* 276, 1250-1252.
- Han, J.D., Bertin, N., Hao, T., Goldberg, D.S., Berriz, G.F., Zhang, L.V., Dupuy, D., Walhout, A.J., Cusick, M.E., Roth, F.P., *et al.* (2004). Evidence for dynamically organized modularity in the yeast protein-protein interaction network. *Nature* 430, 88-93.
- Han, J.M., Kim, J.Y., and Kim, S. (2003). Molecular network and functional implications of macromolecular tRNA synthetase complex. *Biochem Biophys Res Commun* 303, 985-993.
- Han, J.M., Lee, M.J., Park, S.G., Lee, S.H., Razin, E., Choi, E.C., and Kim, S. (2006a). Hierarchical network between the components of the multi-tRNA synthetase complex: implications for complex formation. *J Biol Chem* 281, 38663-38667.
- Han, J.M., Park, B.J., Park, S.G., Oh, Y.S., Choi, S.J., Lee, S.W., Hwang, S.K., Chang, S.H., Cho, M.H., and Kim, S. (2008). AIMP2/p38, the scaffold for the multi-tRNA synthetase complex, responds to genotoxic stresses via p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 11206-11211.
- Han, J.M., Park, S.G., Lee, Y., and Kim, S. (2006b). Structural separation of different extracellular activities in aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multi-functional protein, p43/AIMP1. *Biochem Biophys Res Commun* 342, 113-118.
- Hannoun, Z., Greenhough, S., Jaffray, E., Hay, R.T., and Hay, D.C. Post Translational Modification by SUMO. *Toxicology.*

- Hao, B., Gong, W., Ferguson, T.K., James, C.M., Krzycki, J.A., and Chan, M.K. (2002). A new UAG-encoded residue in the structure of a methanogen methyltransferase. *Science* 296, 1462-1466.
- Hardie, D.G., Carling, D., and Carlson, M. (1998). The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu Rev Biochem* 67, 821-855.
- Hartman, J.L.t., Garvik, B., and Hartwell, L. (2001). Principles for the buffering of genetic variation. *Science* 291, 1001-1004.
- Hartwell, L.H., Hopfield, J.J., Leibler, S., and Murray, A.W. (1999). From molecular to modular cell biology. *Nature* 402, C47-52.
- Hasty, J., McMillen, D., and Collins, J.J. (2002). Engineered gene circuits. *Nature* 420, 224-230.
- Hausmann, C.D., and Ibba, M. (2008). Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: molecular multitasking revealed. *FEMS Microbiol Rev* 32, 705-721.
- Hausmann, C.D., Praetorius-Ibba, M., and Ibba, M. (2007). An aminoacyl-tRNA synthetase:elongation factor complex for substrate channeling in archaeal translation. *Nucleic Acids Res* 35, 6094-6102.
- He, S.L., and Green, R. (2010). Visualization of codon-dependent conformational rearrangements during translation termination. *Nat Struct Mol Biol* 17, 465-470.
- Heitman, J., Movva, N.R., and Hall, M.N. (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253, 905-909.
- Helgadottir, S., Rosas-Sandoval, G., Soll, D., and Graham, D.E. (2007). Biosynthesis of phosphoserine in the Methanococcales. *J Bacteriol* 189, 575-582.
- Herbert CJ, Labouesse M, Dujardin G, Slonimski PP. (1988). The NAM2 proteins from *S. cerevisiae* and *S. douglasii* are mitochondrial leucyl-tRNA synthetases, and are involved in mRNA splicing. *EMBO J.* 7:473-83.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-479.
- Hietakangas, V., and Cohen, S.M. (2009). Regulation of tissue growth through nutrient sensing. *Annu Rev Genet* 43, 389-410.
- Hohmann, S., and Mager, W.H. (2003). *Yeast stress responses*, [Rev. edn (Berlin ; New York, Springer).
- Holley, R.W., Apgar, J., Everett, G.A., Madison, J.T., Marquisee, M., Merrill, S.H., Penswick, J.R., and Zamir, A. (1965). Structure of a Ribonucleic Acid. *Science* 147, 1462-1465.

- Holzmann, J., Frank, P., Löffler, E., Bennett, K.L., Gerner, C., and Rossmann, W. (2008). RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme. *Cell* 135, 462-474.
- Hong, S.P., Leiper, F.C., Woods, A., Carling, D., and Carlson, M. (2003). Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8839-8843.
- Hountondji, C., Blanquet, S., and Lederer, F. (1985). Methionyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*: primary structure at the binding site for the 3'-end of tRNA<sup>fMet</sup>. *Biochemistry* 24, 1175-1180.
- Hountondji, C., Dessen, P., and Blanquet, S. (1986). Sequence similarities among the family of aminoacyl-tRNA synthetases. *Biochimie* 68, 1071-1078.
- Hountondji, C., Schmitter, J.M., Beauvallet, C., and Blanquet, S. (1990). Mapping of the active site of *Escherichia coli* methionyl-tRNA synthetase: identification of amino acid residues labeled by periodate-oxidized tRNA<sup>fMet</sup> molecules having modified lengths at the 3'-acceptor end. *Biochemistry* 29, 8190-8198.
- Howard OM, Dong HF, Yang D, Raben N, Nagaraju K, Rosen A, Casciola-Rosen L, Härtle M, Kron M, Yang D, Yiadom K, Dwivedi S, Plotz PH, Oppenheim JJ. (2002). Histidyl-tRNA synthetase and asparaginyl-tRNA synthetase, autoantigens in myositis, activate chemokine receptors on T lymphocytes and immature dendritic cells. *J Exp Med*.196:781-91.
- Hu, Z., Snitkin, E.S., and DeLisi, C. (2008). VisANT: an integrative framework for networks in systems biology. *Brief Bioinform* 9, 317-325.
- Hudspeth ME, Ainley WM, Shumard DS, Butow RA, Grossman LI. (1982). Location and structure of the var1 gene on yeast mitochondrial DNA: nucleotide sequence of the 40.0 allele. *Cell*. 30:617-26.
- Ibba, M. (2001). Protein synthesis. Discriminating right from wrong. *Science* 294, 70-71.
- Ibba, M., Curnow, A.W., and Soll, D. (1997). Aminoacyl-tRNA synthesis: divergent routes to a common goal. *Trends Biochem Sci* 22, 39-42.
- Ibba, M., Francklyn, C., and Cusack, S. (2005). The aminoacyl-tRNA synthetases (Georgetown, Tex., U.S.A., Landes Bioscience : Eureka.com).
- Ikemura, T. (1985). Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol Biol Evol* 2, 13-34.
- Ivakhno, S.S., and Kornelyuk, A.I. (2005). Bioinformatic analysis of changes in expression level of tyrosyl-tRNA synthetase during sporulation process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mikrobiol Z* 67, 37-49.

- Iwasaki, W., Sekine, S., Kuroishi, C., Kuramitsu, S., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2006). Structural basis of the water-assisted asparagine recognition by asparaginyl-tRNA synthetase. *J Mol Biol* 360, 329-342.
- Jacob, F., Perrin, D., Sanchez, C., and Monod, J. (1960). [Operon: a group of genes with the expression coordinated by an operator.]. *C R Hebd Seances Acad Sci* 250, 1727-1729.
- Jacquier A, Dujon B. (1985). An intron-encoded protein is active in a gene conversion process that spreads an intron into a mitochondrial gene. *Cell*. 41:383-94.
- Javanbakht, H., Halwani, R., Cen, S., Saadatmand, J., Musier-Forsyth, K., Gottlinger, H., Kleiman, L. (2003). The interaction between HIV-1 Gag and human lysyl-tRNA synthetase during viral assembly. *J Biol Chem*. 278:27644-51.
- Jenner, L., Demeshkina, N., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2010). Structural rearrangements of the ribosome at the tRNA proofreading step. *Nat Struct Mol Biol*.
- Jeon, Y.J., Kim, I.K., Hong, S.H., Nan, H., Kim, H.J., Lee, H.J., Masuda, E.S., Meyuhas, O., Oh, B.H., and Jung, Y.K. (2008). Ribosomal protein S6 is a selective mediator of TRAIL-apoptotic signaling. *Oncogene* 27, 4344-4352.
- Jia, J., Arif, A., Ray, P.S., and Fox, P.L. (2008). WHEP domains direct noncanonical function of glutamyl-Prolyl tRNA synthetase in translational control of gene expression. *Mol Cell* 29, 679-690.
- Jiang, R., and Carlson, M. (1996). Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes Dev* 10, 3105-3115.
- Jiang, R., and Carlson, M. (1997). The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Mol Cell Biol* 17, 2099-2106.
- Johnson, J.E., Smith, J.S., Kozak, M.L., and Johnson, F.B. (2008). In vivo veritas: using yeast to probe the biological functions of G-quadruplexes. *Biochimie* 90, 1250-1263.
- Joza, N., Pospisilik, J.A., Hangen, E., Hanada, T., Modjtahedi, N., Penninger, J.M., and Kroemer, G. (2009). AIF: not just an apoptosis-inducing factor. *Ann N Y Acad Sci* 1171, 2-11.
- Kamada, Y., Fujioka, Y., Suzuki, N.N., Inagaki, F., Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M.N., and Ohsumi, Y. (2005). Tor2 directly phosphorylates the AGC kinase Ypk2 to regulate actin polarization. *Mol Cell Biol* 25, 7239-7248.
- Kaminska, M., Havrylenko, S., Decottignies, P., Gillet, S., Le Marechal, P., Negrutskii, B., and Mirande, M. (2009). Dissection of the structural organization of the aminoacyl-tRNA synthetase complex. *J Biol Chem* 284, 6053-6060.
- Kandel, E.S., Skeen, J., Majewski, N., Di Cristofano, A., Pandolfi, P.P., Feliciano, C.S., Gartel, A., and Hay, N. (2002). Activation of Akt/protein kinase B overcomes a G(2)/m cell cycle checkpoint induced by DNA damage. *Mol Cell Biol* 22, 7831-7841.

- Kang, J., Kim, T., Ko, Y.G., Rho, S.B., Park, S.G., Kim, M.J., Kwon, H.J., and Kim, S. (2000). Heat shock protein 90 mediates protein-protein interactions between human aminoacyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem* 275, 31682-31688.
- Kapasi, P., Chaudhuri, S., Vyas, K., Baus, D., Komar, A.A., Fox, P.L., Merrick, W.C., and Mazumder, B. (2007). L13a blocks 48S assembly: role of a general initiation factor in mRNA-specific translational control. *Mol Cell* 25, 113-126.
- Karanasios, E., Simader, H., Panayotou, G., Suck, D., and Simos, G. (2007). Molecular determinants of the yeast Arc1p-aminoacyl-tRNA synthetase complex assembly. *J Mol Biol* 374, 1077-1090.
- Kelly, R.B. (1990). Microtubules, membrane traffic, and cell organization. *Cell* 61, 5-7.
- Kennell JC, Moran JV, Perlman PS, Butow RA, Lambowitz AM. (1993). Reverse transcriptase activity associated with maturase-encoding group II introns in yeast mitochondria. *Cell*. 73:133-46.
- Kerjan, P., Cerini, C., Semeriva, M., and Mirande, M. (1994). The multienzyme complex containing nine aminoacyl-tRNA synthetases is ubiquitous from *Drosophila* to mammals. *Biochim Biophys Acta* 1199, 293-297.
- Kern, D., and Lapointe, J. (1979). The glutamyl-tRNA synthetase of *Escherichia coli*: substrate-induced protection against its thermal inactivation. *Nucleic Acids Res* 7, 501-515.
- Kern, D., and Lapointe, J. (1980). The catalytic mechanism of glutamyl-tRNA synthetase of *Escherichia coli*. Evidence for a two-step aminoacylation pathway, and study of the reactivity of the intermediate complex. *Eur J Biochem* 106, 137-150.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Kholodenko, B.N., Hoek, J.B., and Westerhoff, H.V. (2000). Why cytoplasmic signalling proteins should be recruited to cell membranes. *Trends Cell Biol* 10, 173-178.
- Kim, H.S., Hoja, U., Stolz, J., Sauer, G., and Schweizer, E. (2004). Identification of the tRNA-binding protein Arc1p as a novel target of *in vivo* biotinylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279, 42445-42452.
- Kim, J.Y., Kang, Y.S., Lee, J.W., Kim, H.J., Ahn, Y.H., Park, H., Ko, Y.G., and Kim, S. (2002). p38 is essential for the assembly and stability of macromolecular tRNA synthetase complex: implications for its physiological significance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7912-7916.
- Kim, M.D., Hong, S.P., and Carlson, M. (2005). Role of Tos3, a Snf1 protein kinase kinase, during growth of *Saccharomyces cerevisiae* on nonfermentable carbon sources. *Eukaryot Cell* 4, 861-866.

- Kim, S.H., Suddath, F.L., Quigley, G.J., McPherson, A., Sussman, J.L., Wang, A.H., Seeman, N.C., and Rich, A. (1974). Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA. *Science* *185*, 435-440.
- Kim, T., Park, S.G., Kim, J.E., Seol, W., Ko, Y.G., and Kim, S. (2000). Catalytic peptide of human glutamyl-tRNA synthetase is essential for its assembly to the aminoacyl-tRNA synthetase complex. *J Biol Chem* *275*, 21768-21772.
- Kise Y, Lee SW, Park SG, Fukai S, Sengoku T, Ishii R, Yokoyama S, Kim S, Nureki O. (2004). A short peptide insertion crucial for angiostatic activity of human tryptophanyl-tRNA synthetase. *Nat Struct Mol Biol.* *11*:149-56.
- Kitamura, N., and Yoshida, M. (1983). Small deletion in src of Rous sarcoma virus modifying transformation phenotypes: identification of 207-nucleotide deletion and its smaller product with protein kinase activity. *J Virol* *46*, 985-992.
- Kitano, H., Funahashi, A., Matsuoka, Y., and Oda, K. (2005). Using process diagrams for the graphical representation of biological networks. *Nat Biotechnol* *23*, 961-966.
- Ko, Y.G., Kang, Y.S., Kim, E.K., Park, S.G., and Kim, S. (2000). Nucleolar localization of human methionyl-tRNA synthetase and its role in ribosomal RNA synthesis. *J Cell Biol* *149*, 567-574.
- Ko, Y.G., Kim, E.Y., Kim, T., Park, H., Park, H.S., Choi, E.J., and Kim, S. (2001). Glutamine-dependent antiapoptotic interaction of human glutamyl-tRNA synthetase with apoptosis signal-regulating kinase 1. *J Biol Chem* *276*, 6030-6036.
- Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* *15*, 8125-8148.
- Kovaleski BJ, Kennedy R, Hong MK, Datta SA, Kleiman L, Rein A, Musier-Forsyth K. (2006). In vitro characterization of the interaction between HIV-1 Gag and human lysyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem.* *281*:19449-56.
- Krogan, N.J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A.P., *et al.* (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* *440*, 637-643.
- Kronekova, Z., and Rodel, G. (2005). Organization of assembly factors Cbp3p and Cbp4p and their effect on bc(1) complex assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* *47*, 203-212.
- Kumazawa, Y., Yokogawa, T., Miura, K., and Watanabe, K. (1988). Bovine mitochondrial tRNA<sup>Phe</sup>, tRNA<sup>Ser</sup> (AGY) and tRNA<sup>Ser</sup> (UCN): preparation using a new detection method and their properties in aminoacylation. *Nucleic Acids Symp Ser*, 97-100.
- Labouesse M. (1990). The yeast mitochondrial leucyl-tRNA synthetase is a splicing factor for the excision of several group I introns. *Mol Gen Genet.* *224*:209-21.

- Lapointe, J., Duplain, L., and Proulx, M. (1986). A single glutamyl-tRNA synthetase aminoacylates tRNAGlu and tRNAGln in *Bacillus subtilis* and efficiently misacylates *Escherichia coli* tRNAGln1 in vitro. *J Bacteriol* *165*, 88-93.
- LaRiviere, F.J., Wolfson, A.D., and Uhlenbeck, O.C. (2001). Uniform binding of aminoacyl-tRNAs to elongation factor Tu by thermodynamic compensation. *Science* *294*, 165-168.
- Lauffenburger, D.A. (2000). Cell signaling pathways as control modules: complexity for simplicity? *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 5031-5033.
- Lazowska J, Claisse M, Gargouri A, Kotylak Z, Spyridakis A, Slonimski PP. (1989). Protein encoded by the third intron of cytochrome b gene in *Saccharomyces cerevisiae* is an mRNA maturase. Analysis of mitochondrial mutants, RNA transcripts proteins and evolutionary relationships. *J Mol Biol.* *205*:275-89.
- Lee, C., Tibbetts, A.S., Kramer, G., and Appling, D.R. (2009). Yeast AEP3p is an accessory factor in initiation of mitochondrial translation. *J Biol Chem* *284*, 34116-34125.
- Lee, S.W., Cho, B.H., Park, S.G., and Kim, S. (2004). Aminoacyl-tRNA synthetase complexes: beyond translation. *J Cell Sci* *117*, 3725-3734.
- Lewis, D.A., and Bisson, L.F. (1991). The HXT1 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* is a new member of the family of hexose transporters. *Mol Cell Biol* *11*, 3804-3813.
- Li, L.Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* *412*, 95-99.
- Li, R., and Guan, M.X. (2010). Human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase corrects mitochondrial dysfunctions due to the tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) A3243G mutation, associated with mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like symptoms and diabetes. *Mol Cell Biol* *30*, 2147-2154.
- Liberali, P., Ramo, P., and Pelkmans, L. (2008). Protein kinases: starting a molecular systems view of endocytosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* *24*, 501-523.
- Ling, J., So, B.R., Yadavalli, S.S., Roy, H., Shoji, S., Fredrick, K., Musier-Forsyth, K., and Ibba, M. (2009). Resampling and editing of mischarged tRNA prior to translation elongation. *Mol Cell* *33*, 654-660.
- Lipman, R.S., Chen, J., Evilia, C., Vitseva, O., and Hou, Y.M. (2003). Association of an aminoacyl-tRNA synthetase with a putative metabolic protein in archaea. *Biochemistry* *42*, 7487-7496.
- Lira, V.A., Benton, C.R., Yan, Z., and Bonen, A. (2010). PGC-1alpha regulation by exercise training and its influences on muscle function and insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* *299*, E145-161.

- Litvak, S., Sarih-Cottin, L., Fournier, M., Andreola, M., and Tarrago-Litvak, L. (1994). Priming of HIV replication by tRNA(Lys3): role of reverse transcriptase. *Trends Biochem Sci* *19*, 114-118.
- Liu, J., Shue, E., Ewalt, K.L., and Schimmel, P. (2004). A new gamma-interferon-inducible promoter and splice variants of an anti-angiogenic human tRNA synthetase. *Nucleic Acids Res* *32*, 719-727.
- Liu, Z., and Butow, R.A. (2006). Mitochondrial retrograde signaling. *Annu Rev Genet* *40*, 159-185.
- Lobanov, A.V., Hatfield, D.L., and Gladyshev, V.N. (2009). Eukaryotic selenoproteins and selenoproteomes. *Biochim Biophys Acta* *1790*, 1424-1428.
- Loewer, A., Batchelor, E., Gaglia, G., and Lahav, G. (2010). Basal dynamics of p53 reveal transcriptionally attenuated pulses in cycling cells. *Cell* *142*, 89-100.
- Lwigale, P.Y., and Bronner-Fraser, M. (2009). Semaphorin3A/neuropilin-1 signaling acts as a molecular switch regulating neural crest migration during cornea development. *Dev Biol* *336*, 257-265.
- Ma, M., and Liu, Z.L. (2010). Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* *87*, 829-845.
- Ma, P., Wera, S., Van Dijck, P., and Thevelein, J.M. (1999). The PDE1-encoded low-affinity phosphodiesterase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a specific function in controlling agonist-induced cAMP signaling. *Mol Biol Cell* *10*, 91-104.
- Mah, A.S., Elia, A.E., Devgan, G., Ptacek, J., Schutkowski, M., Snyder, M., Yaffe, M.B., and Deshaies, R.J. (2005). Substrate specificity analysis of protein kinase complex Dbf2-Mob1 by peptide library and proteome array screening. *BMC Biochem* *6*, 22.
- Marion, R.M., Regev, A., Segal, E., Barash, Y., Koller, D., Friedman, N., and O'Shea, E.K. (2004). Sfp1 is a stress- and nutrient-sensitive regulator of ribosomal protein gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 14315-14322.
- Maris, A.F., Assumpcao, A.L., Bonatto, D., Brendel, M., and Henriques, J.A. (2001). Diauxic shift-induced stress resistance against hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae* is not an adaptive stress response and does not depend on functional mitochondria. *Curr Genet* *39*, 137-149.
- Martin, K.C. (2010). Anchoring local translation in neurons. *Cell* *141*, 566-568.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., *et al.* (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* *316*, 1160-1166.

- Matthaei, J.H., Jones, O.W., Martin, R.G., and Nirenberg, M.W. (1962). Characteristics and composition of RNA coding units. *Proc Natl Acad Sci U S A* *48*, 666-677.
- Mazauric, M.H., Keith, G., Logan, D., Kreutzer, R., Giege, R., and Kern, D. (1998). Glycyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus*--wide structural divergence with other prokaryotic glycyl-tRNA synthetases and functional inter-relation with prokaryotic and eukaryotic glycylation systems. *Eur J Biochem* *251*, 744-757.
- Mazumder, B., Sampath, P., Seshadri, V., Maitra, R.K., DiCorleto, P.E., and Fox, P.L. (2003). Regulated release of L13a from the 60S ribosomal subunit as a mechanism of transcript-specific translational control. *Cell* *115*, 187-198.
- McBride, H.M., Neuspiel, M., and Wasiak, S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr Biol* *16*, R551-560.
- McCartney, R.R., and Schmidt, M.C. (2001). Regulation of Snf1 kinase. Activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the Snf4 subunit. *J Biol Chem* *276*, 36460-36466.
- Mechulam, Y., Dardel, F., Le Corre, D., Blanquet, S., and Fayat, G. (1991). Lysine 335, part of the KMSKS signature sequence, plays a crucial role in the amino acid activation catalysed by the methionyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* *217*, 465-475.
- Mirande, M., Le Corre, D., Waller, J.P. (1985). A complex from cultured Chinese hamster ovary cells containing nine aminoacyl-tRNA synthetases. Thermolabile leucyl-tRNA synthetase from the tsH1 mutant cell line is an integral component of this complex. *Eur J Biochem*. *147*:281-9.
- Misra, P., Owuor, E.D., Li, W., Yu, S., Qi, C., Meyer, K., Zhu, Y.J., Rao, M.S., Kong, A.N., and Reddy, J.K. (2002). Phosphorylation of transcriptional coactivator peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-binding protein (PBP). Stimulation of transcriptional regulation by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* *277*, 48745-48754.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., and Tollervey, D. (1997). The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'-->5' exoribonucleases. *Cell* *91*, 457-466.
- Mocibob, M., and Weygand-Durasevic, I. (2008). The proximal region of a noncatalytic eukaryotic seryl-tRNA synthetase extension is required for protein stability in vitro and in vivo. *Arch Biochem Biophys* *470*, 129-138.
- Monteiro, G., and Netto, L.E. (2004). Glucose repression of PRX1 expression is mediated by Tor1p and Ras2p through inhibition of Msn2/4p in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* *241*, 221-228.
- Motorin, YuA., Wolfson, A.D., Orlovsky, A.F., Gladilin, K.L. (1988). Mammalian valyl-tRNA synthetase forms a complex with the first elongation factor. *FEBS Lett*. *238*:262-4.

- Moura, G.R., Carreto, L.C., and Santos, M.A. (2009). Genetic code ambiguity: an unexpected source of proteome innovation and phenotypic diversity. *Curr Opin Microbiol* 12, 631-637.
- Mower, J.P., and Bonen, L. (2009). Ribosomal protein L10 is encoded in the mitochondrial genome of many land plants and green algae. *BMC Evol Biol* 9, 265.
- Mulero, J.J., Rosenthal, J.K., and Fox, T.D. (1994). PET112, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene required to maintain rho+ mitochondrial DNA. *Curr Genet* 25, 299-304.
- Muller, F.L., Liu, Y., and Van Remmen, H. (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 279, 49064-49073.
- Mumberg, D., Muller, R., and Funk, M. (1995). Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* 156, 119-122.
- Muzzey, D., Gomez-Uribe, C.A., Mettetal, J.T., and van Oudenaarden, A. (2009). A systems-level analysis of perfect adaptation in yeast osmoregulation. *Cell* 138, 160-171.
- Muzzey, D., and van Oudenaarden, A. (2009). Quantitative time-lapse fluorescence microscopy in single cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25, 301-327.
- Nagao, A., Suzuki, T., Katoh, T., and Sakaguchi, Y. (2009). Biogenesis of glutaminyl-mt tRNAGln in human mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16209-16214.
- Nakamura, A., Yao, M., Chimnaronk, S., Sakai, N., and Tanaka, I. (2006). Ammonia channel couples glutaminase with transamidase reactions in GatCAB. *Science* 312, 1954-1958.
- Namgoong, S., Sheppard, K., Sherrer, R.L., and Soll, D. (2007). Co-evolution of the archaeal tRNA-dependent amidotransferase GatCAB with tRNA(Asn). *FEBS Lett* 581, 309-314.
- Negrutskii BS, Shalak VF, Kerjan P, El'skaya AV, Mirande M. (1999). Functional interaction of mammalian valyl-tRNA synthetase with elongation factor EF-1alpha in the complex with EF-1H. *J Biol Chem.* 274:4545-50.
- Nirenberg, M.W., Matthaei, J.H., and Jones, O.W. (1962). An intermediate in the biosynthesis of polyphenylalanine directed by synthetic template RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48, 104-109.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289, 920-930.
- Niu, W., Li, Z., Zhan, W., Iyer, V.R., and Marcotte, E.M. (2008). Mechanisms of cell cycle control revealed by a systematic and quantitative overexpression screen in *S. cerevisiae*. *PLoS Genet* 4, e1000120.

- Norcum, M.T. (1989). Isolation and electron microscopic characterization of the high molecular mass aminoacyl-tRNA synthetase complex from murine erythroleukemia cells. *J Biol Chem* 264, 15043-15051.
- Norcum, M.T. (1991). Structural analysis of the high molecular mass aminoacyl-tRNA synthetase complex. Effects of neutral salts and detergents. *J Biol Chem* 266, 15398-15405.
- Norcum, M.T. (1999). Ultrastructure of the eukaryotic aminoacyl-tRNA synthetase complex derived from two dimensional averaging and classification of negatively stained electron microscopic images. *FEBS Lett* 447, 217-222.
- Nureki, O., Vassylyev, D.G., Tateno, M., Shimada, A., Nakama, T., Fukai, S., Konno, M., Hendrickson, T.L., Schimmel, P., and Yokoyama, S. (1998). Enzyme structure with two catalytic sites for double-sieve selection of substrate. *Science* 280, 578-582.
- O'Donoghue, P., Sethi, A., Woese, C.R., and Luthey-Schulten, Z.A. (2005). The evolutionary history of Cys-tRNA<sup>Cys</sup> formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 19003-19008.
- Ogle, J.M., and Ramakrishnan, V. (2005). Structural insights into translational fidelity. *Annu Rev Biochem* 74, 129-177.
- Oshikane, H., Sheppard, K., Fukai, S., Nakamura, Y., Ishitani, R., Numata, T., Sherrer, R.L., Feng, L., Schmitt, E., Panvert, M., *et al.* (2006). Structural basis of RNA-dependent recruitment of glutamine to the genetic code. *Science* 312, 1950-1954.
- Otani A, Slike BM, Dorrell MI, Hood J, Kinder K, Ewalt KL, Cheresch D, Schimmel P, Friedlander M. (2002). A fragment of human TrpRS as a potent antagonist of ocular angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:178-83.
- Otterstedt, K., Larsson, C., Bill, R.M., Stahlberg, A., Boles, E., Hohmann, S., and Gustafsson, L. (2004). Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Rep* 5, 532-537.
- Ozcan, S., and Johnston, M. (1999). Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 554-569.
- Park, B.J., Kang, J.W., Lee, S.W., Choi, S.J., Shin, Y.K., Ahn, Y.H., Choi, Y.H., Choi, D., Lee, K.S., and Kim, S. (2005). The haploinsufficient tumor suppressor p18 upregulates p53 via interactions with ATM/ATR. *Cell* 120, 209-221.
- Park, S.G., Choi, E.C., and Kim, S. (2010). Aminoacyl-tRNA synthetase-interacting multifunctional proteins (AIMPs): a triad for cellular homeostasis. *IUBMB Life* 62, 296-302.
- Park, S.H., Bolender, N., Eisele, F., Kostova, Z., Takeuchi, J., Coffino, P., and Wolf, D.H. (2007). The cytoplasmic Hsp70 chaperone machinery subjects misfolded and endoplasmic reticulum import-incompetent proteins to degradation via the ubiquitin-proteasome system. *Mol Biol Cell* 18, 153-165.

- Paukstelis PJ, Coon R, Madabusi L, Nowakowski J, Monzingo A, Robertus J, Lambowitz AM. (2005). A tyrosyl-tRNA synthetase adapted to function in group I intron splicing by acquiring a new RNA binding surface. *Mol Cell* 17:417-28.
- Pelletier, J., and Sonenberg, N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 334, 320-325.
- Perret, V., Garcia, A., Puglisi, J., Grosjean, H., Ebel, J.P., Florentz, C., and Giege, R. (1990). Conformation in solution of yeast tRNA(Asp) transcripts deprived of modified nucleotides. *Biochimie* 72, 735-743.
- Perru, O. (2003). Self-organization and emergence in the life sciences. *Revue Philosophique De Louvain* 101, 181-188.
- Pestova, T.V., and Kolupaeva, V.G. (2002). The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev* 16, 2906-2922.
- Peters, J.M., Franke, W.W., and Kleinschmidt, J.A. (1994). Distinct 19 S and 20 S subcomplexes of the 26 S proteasome and their distribution in the nucleus and the cytoplasm. *J Biol Chem* 269, 7709-7718.
- Petry, S., Weixlbaumer, A., and Ramakrishnan, V. (2008). The termination of translation. *Curr Opin Struct Biol* 18, 70-77.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30, e36.
- Polacek, N., Gaynor, M., Yassin, A., and Mankin, A.S. (2001). Ribosomal peptidyl transferase can withstand mutations at the putative catalytic nucleotide. *Nature* 411, 498-501.
- Praetorius-Ibba, M., Hausmann, C.D., Paras, M., Rogers, T.E., and Ibba, M. (2007). Functional association between three archaeal aminoacyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem* 282, 3680-3687.
- Praetorius-Ibba, M., Rogers, T.E., Samson, R., Kelman, Z., and Ibba, M. (2005). Association between Archaeal prolyl- and leucyl-tRNA synthetases enhances tRNA(Pro) aminoacylation. *J Biol Chem* 280, 26099-26104.
- Proud, C.G. (2004). Role of mTOR signalling in the control of translation initiation and elongation by nutrients. *Curr Top Microbiol Immunol* 279, 215-244.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24, 218-229.
- Pujol, C., Bailly, M., Kern, D., Marechal-Drouard, L., Becker, H., and Duchene, A.M. (2008). Dual-targeted tRNA-dependent amidotransferase ensures both mitochondrial and

- chloroplastic Gln-tRNA<sup>Gln</sup> synthesis in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 6481-6485.
- Putney, S.D., and Schimmel, P. (1981). An aminoacyl tRNA synthetase binds to a specific DNA sequence and regulates its gene transcription. *Nature* *291*, 632-635.
- Quevillon, S., Robinson, J.C., Berthonneau, E., Siatecka, M., and Mirande, M. (1999). Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: identification of protein-protein interactions and characterization of a core protein. *J Mol Biol* *285*, 183-195.
- Rahner, A., Scholer, A., Martens, E., Gollwitzer, B., and Schuller, H.J. (1996). Dual influence of the yeast Cat1p (Snf1p) protein kinase on carbon source-dependent transcriptional activation of gluconeogenic genes by the regulatory gene CAT8. *Nucleic Acids Res* *24*, 2331-2337.
- Raj, A., Rifkin, S.A., Andersen, E., and van Oudenaarden, A. (2010). Variability in gene expression underlies incomplete penetrance. *Nature* *463*, 913-918.
- Raj, A., and van Oudenaarden, A. (2008). Nature, nurture, or chance: stochastic gene expression and its consequences. *Cell* *135*, 216-226.
- Rak M, Tzagoloff A. (2009). F1-dependent translation of mitochondrially encoded Atp6p and Atp8p subunits of yeast ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. *106*(44):18509-14.
- Ramaswamy, S., Nakamura, N., Vazquez, F., Batt, D.B., Perera, S., Roberts, T.M., and Sellers, W.R. (1999). Regulation of G1 progression by the PTEN tumor suppressor protein is linked to inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 2110-2115.
- Ramirez, B.L., Howard, O.M., Dong, H.F., Edamatsu, T., Gao, P., Hartlein, M., and Kron, M. (2006). *Brugia malayi* asparaginyl-transfer RNA synthetase induces chemotaxis of human leukocytes and activates G-protein-coupled receptors CXCR1 and CXCR2. *J Infect Dis* *193*, 1164-1171.
- Ran, Q., Liang, H., Ikeno, Y., Qi, W., Prolla, T.A., Roberts, L.J., 2nd, Wolf, N., Van Remmen, H., and Richardson, A. (2007). Reduction in glutathione peroxidase 4 increases life span through increased sensitivity to apoptosis. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* *62*, 932-942.
- Randau, L., Munch, R., Hohn, M.J., Jahn, D., and Soll, D. (2005). Nanoarchaeum equitans creates functional tRNAs from separate genes for their 5'- and 3'-halves. *Nature* *433*, 537-541.
- Ray, P.S., Arif, A., and Fox, P.L. (2007). Macromolecular complexes as depots for releasable regulatory proteins. *Trends Biochem Sci* *32*, 158-164.
- Reed, V.S., Wastney, M.E., Yang, D.C. (1994). Mechanisms of the transfer of aminoacyl-tRNA from aminoacyl-tRNA synthetase to the elongation factor 1 alpha. *J Biol Chem*. *269*:32932-6.

- Reed VS, Yang DC. (1994). Characterization of a novel N-terminal peptide in human aspartyl-tRNA synthetase. Roles in the transfer of aminoacyl-tRNA from aminoacyl-tRNA synthetase to the elongation factor 1 alpha. *J Biol Chem.* 269:32937-41.
- Reinders, A., Burckert, N., Boller, T., Wiemken, A., and De Virgilio, C. (1998). *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-dependent protein kinase controls entry into stationary phase through the Rim15p protein kinase. *Genes Dev* 12, 2943-2955.
- Rep, M., and Grivell, L.A. (1996). MBA1 encodes a mitochondrial membrane-associated protein required for biogenesis of the respiratory chain. *FEBS Lett* 388, 185-188.
- Rho, S.B., Kim, M.J., Lee, J.S., Seol, W., Motegi, H., Kim, S., and Shiba, K. (1999). Genetic dissection of protein-protein interactions in multi-tRNA synthetase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4488-4493.
- Rho SB, Lincecum TL Jr, Martinis SA. (2002). An inserted region of leucyl-tRNA synthetase plays a critical role in group I intron splicing. *EMBO J.* 21:6874-81.
- Rho SB, Martinis SA. (2000). The bI4 group I intron binds directly to both its protein splicing partners, a tRNA synthetase and maturase, to facilitate RNA splicing activity. *RNA.* 6:1882-94.
- Rich, A., and RajBhandary, U.L. (1976). Transfer RNA: molecular structure, sequence, and properties. *Annu Rev Biochem* 45, 805-860.
- Rieger, R.A., Zaika, E.I., Xie, W., Johnson, F., Grollman, A.P., Iden, C.R., and Zharkov, D.O. (2006). Proteomic approach to identification of proteins reactive for abasic sites in DNA. *Mol Cell Proteomics* 5, 858-867.
- Rinehart, J., Krett, B., Rubio, M.A., Alfonzo, J.D., and Soll, D. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* imports the cytosolic pathway for Gln-tRNA synthesis into the mitochondrion. *Genes Dev* 19, 583-592.
- Robinson, J.C., Kerjan, P., and Mirande, M. (2000). Macromolecular assemblage of aminoacyl-tRNA synthetases: quantitative analysis of protein-protein interactions and mechanism of complex assembly. *J Mol Biol* 304, 983-994.
- Rocak, S., Landeka, I., and Weygand-Durasevic, I. (2002). Identifying Pex21p as a protein that specifically interacts with yeast seryl-tRNA synthetase. *FEMS Microbiol Lett* 214, 101-106.
- Romby P, Caillet J, Ebel C, Sacerdot C, Graffe M, Eyermann F, Brunel C, Moine H, Ehresmann C, Ehresmann B, Springer M. (1996). The expression of *E.coli* threonyl-tRNA synthetase is regulated at the translational level by symmetrical operator-repressor interactions. *EMBO J.* 15:5976-87.
- Romby, P., and Springer, M. (2003). Bacterial translational control at atomic resolution. *Trends Genet* 19, 155-161.

- Ross, J.F., and Orłowski, M. (1982). Growth-rate-dependent adjustment of ribosome function in chemostat-grown cells of the fungus *Mucor racemosus*. *J Bacteriol* *149*, 650-653.
- Rossmann, M.G., Moras, D., and Olsen, K.W. (1974). Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature* *250*, 194-199.
- Roth, S., Kumme, J., and Schuller, H.J. (2004). Transcriptional activators Cat8 and Sip4 discriminate between sequence variants of the carbon source-responsive promoter element in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* *45*, 121-128.
- Rould, M.A., Perona, J.J., Soll, D., and Steitz, T.A. (1989). Structure of *E. coli* glutamyl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Gln) and ATP at 2.8 Å resolution. *Science* *246*, 1135-1142.
- Roy, H., Becker, H.D., Reinbolt, J., and Kern, D. (2003). When contemporary aminoacyl-tRNA synthetases invent their cognate amino acid metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 9837-9842.
- Ruan, B., and Soll, D. (2005). The bacterial YbaK protein is a Cys-tRNA<sup>Pro</sup> and Cys-tRNA Cys deacylase. *J Biol Chem* *280*, 25887-25891.
- Ruff, M., Krishnaswamy, S., Boeglin, M., Poterszman, A., Mitschler, A., Podjarny, A., Rees, B., Thierry, J.C., and Moras, D. (1991). Class II aminoacyl transfer RNA synthetases: crystal structure of yeast aspartyl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Asp). *Science* *252*, 1682-1689.
- Ryabova, L.A., Pooggin, M.M., and Hohn, T. (2002). Viral strategies of translation initiation: ribosomal shunt and reinitiation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* *72*, 1-39.
- Ryan, M.T., and Hoogenraad, N.J. (2007). Mitochondrial-nuclear communications. *Annu Rev Biochem* *76*, 701-722.
- Saini, A.K., Nanda, J.S., Lorsch, J.R., and Hinnebusch, A.G. (2010). Regulatory elements in eIF1A control the fidelity of start codon selection by modulating tRNA(i)(Met) binding to the ribosome. *Genes Dev* *24*, 97-110.
- Sampath, P., Mazumder, B., Seshadri, V., and Fox, P.L. (2003). Transcript-selective translational silencing by gamma interferon is directed by a novel structural element in the ceruloplasmin mRNA 3' untranslated region. *Mol Cell Biol* *23*, 1509-1519.
- Sampath, P., Mazumder, B., Seshadri, V., Gerber, C.A., Chavatte, L., Kinter, M., Ting, S.M., Dignam, J.D., Kim, S., Driscoll, D.M., *et al.* (2004). Noncanonical function of glutamyl-prolyl-tRNA synthetase: gene-specific silencing of translation. *Cell* *119*, 195-208.
- Sang Lee, J., Gyu Park, S., Park, H., Seol, W., Lee, S., and Kim, S. (2002). Interaction network of human aminoacyl-tRNA synthetases and subunits of elongation factor 1 complex. *Biochem Biophys Res Commun* *291*, 158-164.

- Santangelo, G.M. (2006). Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 253-282.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol* 17, 596-603.
- Saraste M, Castresana J. (1994). Cytochrome oxidase evolved by tinkering with denitrification enzymes. *FEBS Lett.* 341:1-4.
- Schagger, H., and Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* 19, 1777-1783.
- Schaller, M.D., Borgman, C.A., Cobb, B.S., Vines, R.R., Reynolds, A.B., and Parsons, J.T. (1992). pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5192-5196.
- Schmitt, E., Moulinier, L., Fujiwara, S., Imanaka, T., Thierry, J.C., and Moras, D. (1998). Crystal structure of aspartyl-tRNA synthetase from *Pyrococcus kodakaraensis* KOD: archaeon specificity and catalytic mechanism of adenylate formation. *EMBO J* 17, 5227-5237.
- Schon, A., Kannangara, C.G., Gough, S., and Soll, D. (1988). Protein biosynthesis in organelles requires misaminoacylation of tRNA. *Nature* 331, 187-190.
- Schuller, H.J. (2003). Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 43, 139-160.
- Schurer, H., Schiffer, S., Marchfelder, A., and Morl, M. (2001). This is the end: processing, editing and repair at the tRNA 3'-terminus. *Biol Chem* 382, 1147-1156.
- S raphin B, Faye G, Hatat D, Jacq C. (1992). The yeast mitochondrial intron aI5 alpha: associated endonuclease activity and in vivo mobility. *Gene.* 113:1-8.
- Shalak, V., Kaminska, M., and Mirande, M. (2009). Translation initiation from two in-frame AUGs generates mitochondrial and cytoplasmic forms of the p43 component of the multisynthetase complex. *Biochemistry* 48, 9959-9968.
- Shalak, V., Kaminska, M., Mitnacht-Kraus, R., Vandenabeele, P., Clauss, M., and Mirande, M. (2001). The EMAPII cytokine is released from the mammalian multisynthetase complex after cleavage of its p43/proEMAPII component. *J Biol Chem* 276, 23769-23776.
- Shamji, A.F., Kuruvilla, F.G., and Schreiber, S.L. (2000). Partitioning the transcriptional program induced by rapamycin among the effectors of the Tor proteins. *Curr Biol* 10, 1574-1581.
- Sharma, M.R., Koc, E.C., Datta, P.P., Booth, T.M., Spremulli, L.L., and Agrawal, R.K. (2003). Structure of the mammalian mitochondrial ribosome reveals an expanded functional role for its component proteins. *Cell* 115, 97-108.

- Sheppard, K., Akochy, P.M., Salazar, J.C., and Soll, D. (2007). The *Helicobacter pylori* amidotransferase GatCAB is equally efficient in glutamine-dependent transamidation of Asp-tRNA<sup>Asn</sup> and Glu-tRNA<sup>Gln</sup>. *J Biol Chem* *282*, 11866-11873.
- Sheppard, K., Yuan, J., Hohn, M.J., Jester, B., Devine, K.M., and Soll, D. (2008). From one amino acid to another: tRNA-dependent amino acid biosynthesis. *Nucleic Acids Res* *36*, 1813-1825.
- Shiba, K. (2002). Intron positions delineate the evolutionary path of a pervasively appended peptide in five human aminoacyl-tRNA synthetases. *J Mol Evol* *55*, 727-733.
- Silvian, L.F., Wang, J., and Steitz, T.A. (1999). Insights into editing from an ile-tRNA synthetase structure with tRNA<sup>Ile</sup> and mupirocin. *Science* *285*, 1074-1077.
- Simader, H., Hothorn, M., Kohler, C., Basquin, J., Simos, G., and Suck, D. (2006). Structural basis of yeast aminoacyl-tRNA synthetase complex formation revealed by crystal structures of two binary sub-complexes. *Nucleic Acids Res* *34*, 3968-3979.
- Simon, M., Binder, M., Adam, G., Hartig, A., and Ruis, H. (1992). Control of peroxisome proliferation in *Saccharomyces cerevisiae* by ADR1, SNF1 (CAT1, CCR1) and SNF4 (CAT3). *Yeast* *8*, 303-309.
- Slesarev, A.I., Mezhevaya, K.V., Makarova, K.S., Polushin, N.N., Shcherbinina, O.V., Shakhova, V.V., Belova, G.I., Aravind, L., Natale, D.A., Rogozin, I.B., *et al.* (2002). The complete genome of hyperthermophile *Methanopyrus kandleri* AV19 and monophyly of archaeal methanogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 4644-4649.
- Smirnov, A., Tarassov, I., Mager-Heckel, A.M., Letzelter, M., Martin, R.P., Krasheninnikov, I.A., and Entelis, N. (2008). Two distinct structural elements of 5S rRNA are needed for its import into human mitochondria. *RNA* *14*, 749-759.
- Smith, D.R., Doucette-Stamm, L.A., Deloughery, C., Lee, H., Dubois, J., Aldredge, T., Bashirzadeh, R., Blakely, D., Cook, R., Gilbert, K., *et al.* (1997). Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. *J Bacteriol* *179*, 7135-7155.
- Smith, J.A., and Martin, L. (1973). Do cells cycle? *Proc Natl Acad Sci U S A* *70*, 1263-1267.
- Smith, T.P., Young, L.S., Bender, L.B., and Sprague, K.U. (1995). Silkworm TFIIIA requires additional class III factors for commitment to transcription complex assembly on a 5S RNA gene. *Nucleic Acids Res* *23*, 1244-1251.
- Snijder, B., Sacher, R., Ramo, P., Damm, E.M., Liberali, P., and Pelkmans, L. (2009). Population context determines cell-to-cell variability in endocytosis and virus infection. *Nature* *461*, 520-523.
- Solari, A., and Deutscher, M.P. (1982). Subcellular localization of the tRNA processing enzyme, tRNA nucleotidyltransferase, in *Xenopus laevis* oocytes and in somatic cells. *Nucleic Acids Res* *10*, 4397-4407.

- Soll, D., Ohtsuka, E., Jones, D.S., Lohrmann, R., Hayatsu, H., Nishimura, S., and Khorana, H.G. (1965). Studies on polynucleotides, XLIX. Stimulation of the binding of aminoacyl-sRNA's to ribosomes by ribotrinucleotides and a survey of codon assignments for 20 amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 54, 1378-1385.
- Spieth, J., Brooke, G., Kuersten, S., Lea, K., and Blumenthal, T. (1993). Operons in *C. elegans*: polycistronic mRNA precursors are processed by trans-splicing of SL2 to downstream coding regions. *Cell* 73, 521-532.
- Srinivasan, G., James, C.M., and Krzycki, J.A. (2002). Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA. *Science* 296, 1459-1462.
- Stan, R., McLaughlin, M.M., Cafferkey, R., Johnson, R.K., Rosenberg, M., and Livi, G.P. (1994). Interaction between FKBP12-rapamycin and TOR involves a conserved serine residue. *J Biol Chem* 269, 32027-32030.
- Steiner-Mosonyi, M., and Mangroo, D. (2004). The nuclear tRNA aminoacylation-dependent pathway may be the principal route used to export tRNA from the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 378, 809-816.
- Stelling, J., Sauer, U., Szallasi, Z., Doyle, F.J., 3rd, and Doyle, J. (2004). Robustness of cellular functions. *Cell* 118, 675-685.
- Suetsugu, S., Miki, H., and Takenawa, T. (2002). Spatial and temporal regulation of actin polymerization for cytoskeleton formation through Arp2/3 complex and WASP/WAVE proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* 51, 113-122.
- Szczepanek T, Jamoussi K, Lazowska J. (2000). Critical base substitutions that affect the splicing and/or homing activities of the group I intron bi2 of yeast mitochondria. *Mol Gen Genet.* 264:137-44.
- Tachibana, C., Yoo, J.Y., Tagne, J.B., Kacherovsky, N., Lee, T.I., and Young, E.T. (2005). Combined global localization analysis and transcriptome data identify genes that are directly coregulated by Adr1 and Cat8. *Mol Cell Biol* 25, 2138-2146.
- Tamura, K., Himeno, H., Asahara, H., Hasegawa, T., and Shimizu, M. (1992). In vitro study of *E.coli* tRNA(Arg) and tRNA(Lys) identity elements. *Nucleic Acids Res* 20, 2335-2339.
- Tang, H.L., Yeh, L.S., Chen, N.K., Ripmaster, T., Schimmel, P., and Wang, C.C. (2004). Translation of a yeast mitochondrial tRNA synthetase initiated at redundant non-AUG codons. *J Biol Chem* 279, 49656-49663.
- Tcherkezian, J., Brittis, P.A., Thomas, F., Roux, P.P., and Flanagan, J.G. (2010). Transmembrane receptor DCC associates with protein synthesis machinery and regulates translation. *Cell* 141, 632-644.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., and Wigler, M. (1987). Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* 50, 277-287.

- Tontonoz, P., and Spiegelman, B.M. (2008). Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu Rev Biochem* 77, 289-312.
- Torres-Larios A, Dock-Bregeon AC, Romby P, Rees B, Sankaranarayanan R, Caillet J, Springer M, Ehresmann C, Ehresmann B, Moras D. (2002). Structural basis of translational control by *Escherichia coli* threonyl tRNA synthetase. *Nat Struct Biol* 9:343-7.
- Torres-Larios, A., Swinger, K.K., Pan, T., and Mondragon, A. (2006). Structure of ribonuclease P--a universal ribozyme. *Curr Opin Struct Biol* 16, 327-335.
- Traba, J., Froschauer, E.M., Wiesenberger, G., Satrustegui, J., and Del Arco, A. (2008). Yeast mitochondria import ATP through the calcium-dependent ATP-Mg/Pi carrier Sallp, and are ATP consumers during aerobic growth in glucose. *Mol Microbiol* 69, 570-585.
- Trotta, C.R., Paushkin, S.V., Patel, M., Li, H., and Peltz, S.W. (2006). Cleavage of pre-tRNAs by the splicing endonuclease requires a composite active site. *Nature* 441, 375-377.
- Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S. (1996). The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 272:1136-44.
- Tu, J., and Carlson, M. (1995). REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 14, 5939-5946.
- Tuller, T., Carmi, A., Vestsigian, K., Navon, S., Dorfan, Y., Zaborske, J., Pan, T., Dahan, O., Furman, I., and Pilpel, Y. (2010). An evolutionarily conserved mechanism for controlling the efficiency of protein translation. *Cell* 141, 344-354.
- Tumbula, D.L., Becker, H.D., Chang, W.Z., and Soll, D. (2000). Domain-specific recruitment of amide amino acids for protein synthesis. *Nature* 407, 106-110.
- Turner, R.J., Lovato, M., and Schimmel, P. (2000). One of two genes encoding glycyl-tRNA synthetase in *Saccharomyces cerevisiae* provides mitochondrial and cytoplasmic functions. *J Biol Chem* 275, 27681-27688.
- Vallier, L.G., and Carlson, M. (1994). Synergistic release from glucose repression by mig1 and ssn mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 137, 49-54.
- Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029-1033.
- Vasudevan, S., Peltz, S.W., and Wilusz, C.J. (2002). Non-stop decay--a new mRNA surveillance pathway. *Bioessays* 24, 785-788.
- Vellekamp, G., and Deutscher, M.P. (1987). A basic NH<sub>2</sub>-terminal extension of rat liver arginyl-tRNA synthetase required for its association with high molecular weight complexes. *J Biol Chem* 262, 9927-9930.

- Venema, R.C., Peters, H.I., Traugh, J.A. (1991). Phosphorylation of elongation factor 1 (EF-1) and valyl-tRNA synthetase by protein kinase C and stimulation of EF-1 activity. *J Biol Chem.* 266:12574-80.
- Vincent, O., and Carlson, M. (1999). Gal83 mediates the interaction of the Snf1 kinase complex with the transcription activator Sip4. *EMBO J* 18, 6672-6681.
- Vincent, O., Townley, R., Kuchin, S., and Carlson, M. (2001). Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes Dev* 15, 1104-1114.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.
- von Plehwe, U., Berndt, U., Conz, C., Chiabudini, M., Fitzke, E., Sickmann, A., Petersen, A., Pfeifer, D., and Rospert, S. (2009). The Hsp70 homolog Ssb is essential for glucose sensing via the SNF1 kinase network. *Genes Dev* 23, 2102-2115.
- Wakasugi, K., Slike, B.M., Hood, J., Ewalt, K.L., Cheresch, D.A., and Schimmel, P. (2002a). Induction of angiogenesis by a fragment of human tyrosyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem* 277, 20124-20126.
- Wakasugi, K., Slike, B.M., Hood, J., Otani, A., Ewalt, K.L., Friedlander, M., Cheresch, D.A., and Schimmel, P. (2002b). A human aminoacyl-tRNA synthetase as a regulator of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 173-177.
- Wan, F., Anderson, D.E., Barnitz, R.A., Snow, A., Bidere, N., Zheng, L., Hegde, V., Lam, L.T., Staudt, L.M., Levens, D., *et al.* (2007). Ribosomal protein S3: a KH domain subunit in NF-kappaB complexes that mediates selective gene regulation. *Cell* 131, 927-939.
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309-314.
- Wernette CM, Saldahna R, Perlman PS, Butow RA. (1990). Purification of a site-specific endonuclease, I-Sce II, encoded by intron 4 alpha of the mitochondrial coxI gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 265:18976-82.
- Wilcox, M., and Nirenberg, M. (1968). Transfer RNA as a cofactor coupling amino acid synthesis with that of protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61, 229-236.
- Wilson, K.P., Black, J.A., Thomson, J.A., Kim, E.E., Griffith, J.P., Navia, M.A., Murcko, M.A., Chambers, S.P., Aldape, R.A., Raybuck, S.A., *et al.* (1994). Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* 370, 270-275.
- Winder, W.W., and Hardie, D.G. (1999). AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol* 277, E1-10.

- Wolfe, C.L., Warrington, J.A., Davis, S., Green, S., and Norcum, M.T. (2003). Isolation and characterization of human nuclear and cytosolic multisynthetase complexes and the intracellular distribution of p43/EMAPII. *Protein Sci* 12, 2282-2290.
- Wolfson, A., and Knight, R. (2005). Occurrence of the aminoacyl-tRNA synthetases in high-molecular weight complexes correlates with the size of substrate amino acids. *FEBS Lett* 579, 3467-3472.
- Woo, R.A., and Poon, R.Y. (2003). Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells. *Cell Cycle* 2, 316-324.
- Woods, A., Munday, M.R., Scott, J., Yang, X., Carlson, M., and Carling, D. (1994). Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase in vivo. *J Biol Chem* 269, 19509-19515.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C., *et al.* (1999). Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115-124.
- Xiao, L., and Grove, A. (2009). Coordination of Ribosomal Protein and Ribosomal RNA Gene Expression in Response to TOR Signaling. *Curr Genomics* 10, 198-205.
- Yang, X., Jiang, R., and Carlson, M. (1994). A family of proteins containing a conserved domain that mediates interaction with the yeast SNF1 protein kinase complex. *EMBO J* 13, 5878-5886.
- Yang, X.J., and Seto, E. (2008). Lysine acetylation: codified crosstalk with other posttranslational modifications. *Mol Cell* 31, 449-461.
- Yarus, M. (1982). Translational efficiency of transfer RNA's: uses of an extended anticodon. *Science* 218, 646-652.
- Yin, Y., Yang, S., Yu, L., and Yu, C.A. (2010). Reaction mechanism of superoxide generation during ubiquinol oxidation by the cytochrome bc1 complex. *J Biol Chem* 285, 17038-17045.
- Yoshionari, S., Koike, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., Ueda, T., Miura, K., and Watanabe, K. (1994). Existence of nuclear-encoded 5S-rRNA in bovine mitochondria. *FEBS Lett* 338, 137-142.
- Youk, H., and van Oudenaarden, A. (2009). Growth landscape formed by perception and import of glucose in yeast. *Nature* 462, 875-879.
- Young, J.C., Hoogenraad, N.J., and Hartl, F.U. (2003). Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* 112, 41-50.

- 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.
- Zaman, S., Lippman, S.I., Zhao, X., and Broach, J.R. (2008). How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu Rev Genet* 42, 27-81.
- Zara, V., Conte, L., and Trumpower, B.L. (2009). Biogenesis of the yeast cytochrome bc<sub>1</sub> complex. *Biochim Biophys Acta* 1793, 89-96.
- Zetterberg, A.H., Pettersson, R.F., and Lindahl, S.G. (2001). [Hartwell, Hunt and Nurse share the 2001 Nobel Prize in physiology or medicine. CDK and cyclin--molecular motors of cell cycle]. *Läkartidningen* 98, 4544-4550.