Analyse structurale de la nouvelle N7 guanine-MTase du virus de la Brème bordelière

Pierre Gauffre, Ashleigh Shannon, Bhawna Sama, Bruno Canard, François Ferron

▶ **To cite this version:**

Pierre Gauffre, Ashleigh Shannon, Bhawna Sama, Bruno Canard, François Ferron. Analyse structurale de la nouvelle N7 guanine-MTase du virus de la Brème bordelière. 23ème Journées Francophones de Virologie, Apr 2021, Paris (en ligne), France. Virologie. 2021;25(1):68-74, 25 (S1), pp.68-74, 2021, 10.1684/vir.2021.0892 . hal-04246230

HAL Id: hal-04246230
https://hal.science/hal-04246230

Submitted on 17 Oct 2023

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

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

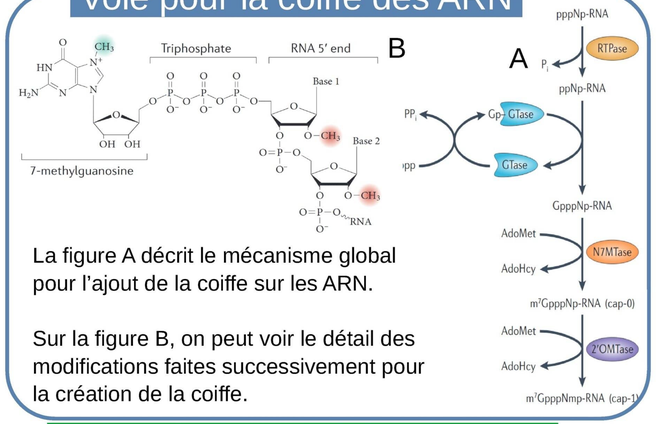
Caractérisation structurale d'une nouvelle N7 guanine-MTase

Pierre Gauffre[1*], Ashleigh SHANNON[1], Bhawna SAMA[1], Bruno CANARD[1,2] , François FERRON[1,2]
1. Architecture et Fonctions des Macromolécules Biologiques (AFMB), UMR 7257/CNRS, Aix-Marseille Université
2. European Virus Bioinformatics Center, Leutragraben 1, 07743 Jena,Germany
*Contact: Pierre.Gauffre@univ-amu.fr

Abstract

Récemment l'ordre des Nidovirales a été reclassé en 9 familles (1) en fonction de leur organisation génomique et de la conservation des enzymes réplicatives. Cet ordre est composé de virus à génome d'ARN (+) simple brin, de complexité et de taille variables, allant de 12,7kb pour les Arteriviridae à 41,1kb pour les Mononiviridae qui sont parmi les plus grands virus à ARN (+) connus (2). On présume que la plupart des Nidovirales ont adopté un système de coiffe en 5' de leurs génomes d'ARN. Cette coiffe permet à la fois la protection de l'ARN contre la dégradation par les exonucléases 5' de l'hôte, mais permet aussi son recrutement par le ribosome pour la traduction.
L'acquisition de la coiffe s'effectue en 4 étapes successives nécessitant 4 enzymes : RTPase, GTPase, N7-MTase, 2-O-Mtase.
Une étude récente (3) de recherche bio-informatique d'analyse de séquences a permis de mettre en évidence la présence de 2'-O-MTase dans la quasi-totalité de l'ordre des Nidovirales.
De plus, cette recherche a mis en évidence 6 motifs conservés chez les N7-MTase. L'analyse des séquences dans le sous-ordre des Tobaniviridae a permis la découverte de 10 séquences de N7-MTase putative. Ces nouvelles signatures ont la particularité d'avoir été identifiées dans l'Orf1a alors que jusqu'ici ces enzymes ne se trouvaient que dans l'Orf1ab.
Poursuivant ce travail, nous avons réalisé différentes constructions à partir du génome du Virus de la Brème bordelière (VBB) afin d'exprimer des protéines de différentes longueurs, contenant les 6 motifs caractéristiques des N7-MTase. L'activité N7-MTase de ces protéines a été caractérisée jusqu'à obtenir la protéine optimale active. Ce candidat est en cours de caractérisation structurale, notamment par la recherche de conditions adéquates de cristallogenèse et de test de diffraction des cristaux.

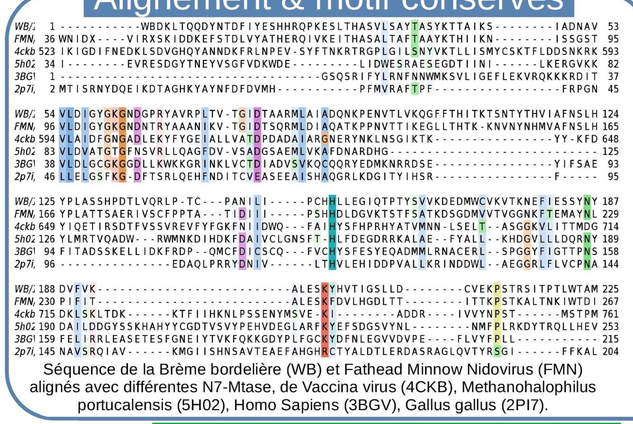
Voie pour la coiffe des ARN



La figure A décrit le mécanisme global pour l'ajout de la coiffe sur les ARN.

Sur la figure B, on peut voir le détail des modifications faites successivement pour la création de la coiffe.

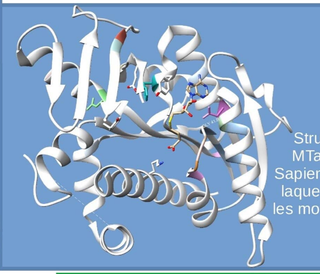
Alignement & motif conservés



Séquence de la Brème bordelière (WB) et Fathead Minnow Nidovirus (FMN) alignés avec différentes N7-Mtase, de Vaccina virus (4CKB), Methanohalophilus portucalensis (5H02), Homo Sapiens (3BGV), Gallus gallus (2PI7).

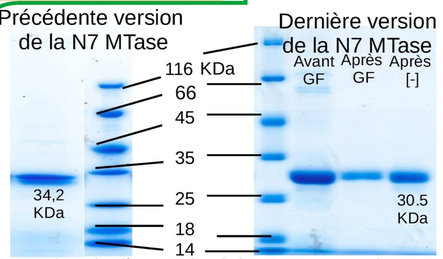
Objectifs

- Production et purification de la N7 guanine-Mtase optimalement active
- Définir les conditions de cristallogenèse
- Tester la diffraction des différents cristaux obtenus
- Résoudre la structure et affiner la structure

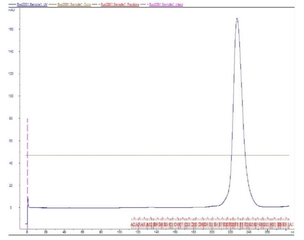


Purification de la forme optimalement active

Le passage à une version plus courte de la N7-MTase nous a permis d'éviter d'avoir une double bande et ainsi d'avoir une protéine plus pure

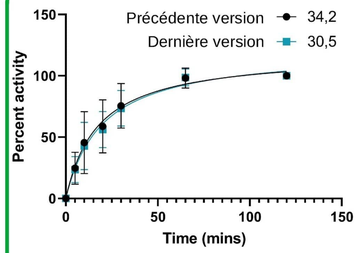


Les deux dernières version de la N7 MTase sur gel SDS-Page 12%



Purification sur GF 26/60 S200

Essais de l'activité N7 MTase



- Le test a été réalisé sur un ARN (13 mer) coiffé d'un GpppG.

- La N7 Mtase est ajoutée en présence de son cofacteur S-adénosyl-L-méthionine (SAM) radio-marqué

- L'échantillon est ensuite déposé sur une membrane et la radioactivité est lavée pour ne quantifier que les ARN méthylés.

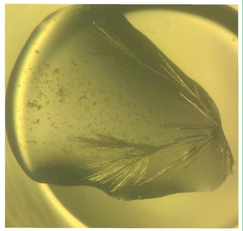
Le passage à une version plus courte de la N7 Mtase n'affecte pas l'activité methyltransferase de la protéine

Essais de cristallogenèse

Essai réalisé sur petite et grande plaques

Conditions de l'essai :

- pH de 7,5 à 8,5
- PEG3350 de 15 à 25%
- 0 or 10 % isopropanol
- (C) protéine * 1,3 = (C) cofacteur SAM



On obtient des cristaux de type baguette

Premières données de diffractions

```
For estimated molecular weight    32889.
 Nmol/asym  Matthews Coeff  %solvent       P(2.10)      P(tot)

     1          4.06           69.74          0.03         0.06
     2          2.03           39.48          0.97         0.93
     3          1.35            9.22          0.00         0.01

 LATTICE-  BRAVAIS-   QUALITY  UNIT CELL CONSTANTS (ANGSTROEM & DEGREES
 CHARACTER  LATTICE    OF FIT      a      b      c   alpha  beta gamma

 *  44       aP          0.0     50.0   51.5   54.3 100.7  90.1 103.0
 *  31       aP          1.0     50.0   51.5   54.3  79.3  90.1  77.0
    34       mP        105.1     50.0   54.3   51.5 100.7 103.0  90.1
    35       mP        116.7     51.5   50.0   54.3  90.1 100.7 103.0

****** LATTICE SYMMETRY IMPLICATED BY SPACE GROUP SYMMETRY ******

BRAVAIS-            POSSIBLE SPACE-GROUPS FOR PROTEIN CRYSTALS
 TYPE                        [SPACE GROUP NUMBER,SYMBOL]
 aP       [1,P1]
 mP       [3,P2] [4,P2(1)]
```

Le Coefficient Matthews nous indique qu'il y aurait 2 molécules par unité asymetrique.

Il y a un trop grand écart de "quality of fit" entre P1 et P2, ce qui nous laisse penser qu'il s'agit d'une maille en P1.

Les informations sont contradictoires entre une unité asymétrique de type P1 et le fait qu'il y aurait 2 molécules par unité asymétrique. Sans compter que les cristaux de type P1 sont rares.

Les deux informations sur les différents jeux de données récoltées nous font tous arriver au même résultat.

L'explication de ces résultats est que nos cristaux ont poussé de façon non homogène, créant ainsi de l'anisotropie.

Vu en coupe schématique de mon crystal

Vu en coupe schématique d'un crystal sans anisotropie

Conclusion

Les premiers essais de cristallographie ne sont pas concluants, mais le passage à une protéine plus courte nous a permis d'avoir de plus gros cristaux plus vite. L'objectif maintenant sera de cribler les meilleures conditions de cristallogenèse.

1. Siddell,S.G., Walker,P.J., Lefkowitz,E.J., Mushegian,A.R., Adams,M.J., Dutilh,B.E., Gorbalenya,A.E., Harrach,B, Harrison,R.L., Junglen,S. et al. (2019) Additional changes to taxonomy ratified in a special vote by the International Committee on Taxonomy of Viruses (October 2018). Arch. Virol., 164, 943–946.
2. Saberi,A., Gulyaeva,A.A., Brubacher,J.L., Newmark,P.A. and Gorbalenya,A.E. (2018) A planarian nidovirus expands the limits of RNA genome size. PLoS Pathog., 14, e1007314.
3. François Ferron, Humberto J. Debat, Ashleigh Shannon, Etienne Decroly et Bruno Canard (2020) A N7-guanine RNA cap methyltransferase signature-sequence as a genetic marker of large genome, non-mammalian Tobaniviridae.
4. Etienne Decroly, François Ferron, Julien Lescar et Bruno Canard (2012) Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA.