

Sujet de stage Semestre 4 - Master 2^{ème} année

IBMP | 2023-2024

Titre/Title

Français : Étude des facteurs d'import nucléaire et de recrutement nécessaires pour la répression des transposons par l'ARN polymérase IV

English : Study of nuclear import and recruitment factors necessary for the repression of transposons by RNA polymerase IV

Contacts

Responsable du projet :

NOM Prénom : MICHEL Fabrice

Tél : 03 67 15 53 42

Courrier-E : fabrice.michel@ibmp-cnrs.unistra.fr

Responsable de l'équipe :

NOM Prénom : BLEVINS Todd

Tél : 03 67 15 53 28

Courrier-E : todd.blevins@ibmp-cnrs.unistra.fr

<https://www.ibmp.cnrs.fr/equipes/biogenese-et-mode-daction-des-petits-arn/>

Description du projet | *Project Description*

Français :

La protection de l'intégrité du génome est nécessaire pour la survie des organismes. En effet, le génome contient l'information génétique nécessaire pour la propagation et la fonction cellulaire, mais il est aussi menacé par des séquences endogènes mobiles appelées éléments transposables (TE). La voie de RNA directed DNA methylation inhibe l'expression des TE chez les cellules de plantes, limitant ainsi des mutations délétères. L'ARN polymérase IV (Pol IV) initie cette voie en transcrivant des TE dans le noyau. Les ARN non codants résultants sont reconnus par RDR2 (une ARN polymérase ARN-dépendante) qui forme des ARN double brin, qui sont coupés en petits ARN interférents (siARN) de 24 nucléotides. Ces siARN guident la méthylation de l'ADN vers les TE dans l'ensemble du génome, et cette inactivation transcriptionnelle peut s'étendre aux gènes adjacents. Ainsi, les TE sont une composante majeure des génomes, et leur activité participe au remodelage des génomes au cours de l'évolution. L'équilibre entre stabilité et diversification du génome est donc régulé par l'enzyme Pol IV.

Pol IV est recrutée à la chromatine par les protéines CLSY1,2,3,4 chez Arabidopsis. Le/la stagiaire étudiera comment CLSY1 et Pol IV coordonnent la répression des TE. CLSY1 forme un complexe protéique avec Pol IV. Notre équipe a découvert et modélisé la structure du domaine d'interaction CLSY1-Pol IV en utilisant une combinaison de données génétiques, d'AlphaFold2 et de Cryo-EM (Ferrafiat et al. 2019 ; Ryman, Felgines et al. 2023 *in prep*). L'import nucléaire de Pol IV dépend de la protéine CLSY1, mais nous ne savons pas comment ce processus régule la répression des TE. Lors de ce stage, plusieurs approches seront utilisées : (i) la microscopie confocale sera employée pour détecter l'expression de CLSY1 d'Arabidopsis, soit sous sa forme fonctionnelle, soit mutante NLS ; (ii) ces complexes protéiques seront caractérisés par gel-filtration (size exclusion chromatography) pour identifier des séquences importantes dans l'assemblage de CLSY1 et Pol IV; et (iii) les plantes exprimant ces protéines seront utilisées pour des expériences d'IP-MS afin d'analyser la composition du complexe CLSY1-Pol IV. Enfin, la quantification de l'activité des TE viendra compléter ces études sur la régulation de Pol IV. Le projet permettra *in fine* de mieux comprendre comment Pol IV, ses sous-unités spécialisées et certains facteurs associés, ont évolué pour agir spécifiquement sur la transcription des TE.



English :

The protection of genome integrity is necessary for the survival of organisms. The genome contains the genetic information necessary for cell propagation and function, but it is also threatened by mobile endogenous sequences called transposable elements (TEs). The RNA-directed DNA methylation pathway silences TE expression in plant cells, thereby limiting deleterious mutations. RNA polymerase IV (Pol IV) initiates this pathway by transcribing TEs in the nucleus. The resulting non-coding RNAs are recognized by RDR2 (an RNA-dependent RNA polymerase) that synthesizes double-stranded RNAs, which are cut into small interfering RNAs (siRNAs) of 24 nucleotides. These siRNAs then guide DNA methylation to TEs throughout the genome. This transcriptional inactivation can also extend to adjacent genes. TEs are a major component of plant genomes, and their activity participates in the remodeling of genomes during evolution; the balance between genome stability and diversification is thus regulated by the enzyme Pol IV.

Pol IV is recruited to chromatin by the CLSY1,2,3,4 proteins in Arabidopsis. In this project, the M2 intern will study how CLSY1 and Pol IV coordinate TE repression. CLSY1 forms a protein complex with Pol IV. Our team discovered and modeled the structure of the CLSY1-Pol IV interaction domain using a combination of molecular genetic data, AlphaFold2 and Cryo-EM (Ferrafiat et al. 2019; Rymen, Felgines et al. 2023 *in prep*). Pol IV nuclear import depends on the CLSY1 protein, but we do not yet know how this process regulates TE repression. During this internship, several approaches will be used: (i) confocal microscopy will be used to detect the expression of CLSY1 from Arabidopsis, either in its functional form or in an NLS mutant; (ii) these protein complexes will be characterized by size exclusion chromatography to identify amino acid sequences important for the assembly of CLSY1 and Pol IV; and (iii) plants expressing these proteins will be used for IP-MS experiments to analyze the composition of the CLSY1-Pol IV complex. Finally, the quantification of TE activity will complete these studies on the regulation of Pol IV. The project will provide a better understanding of how Pol IV, its specialized subunits and certain associated factors have evolved to specifically repress TEs and protect genome integrity.

Methodologies (keywords): protein purification, size exclusion chromatography, confocal microscopy, co-immunoprecipitation, mass spectrometry

References (maximum 3):

Rymen B, Ferrafiat L, Blevins T (2020). Non-coding RNA polymerases that silence transposable elements and reprogram gene expression in plants. *Transcription* 11(3-4):172-191. doi:10.1080/21541264.2020.1825906

Böhrer M, Rymen B, Himber C, Gerbaud A, Pflieger D, Laudencia-Chingcuanco D, Cartwright A, Vogel J, Sibout R, Blevins T (2020). Integrated Genome-Scale Analysis and Northern Blot Detection of Retrotransposon siRNAs Across Plant Species. *Methods Mol Biol.* 2166: 387-411. doi:10.1007/978-1-0716-0712-1_23.

Ferrafiat L, Pflieger D, Singh J, Thieme M, Böhrer M, Himber C, Gerbaud A, Bucher E, Pikaard CS, Blevins T (2019). The NRPD1 N-terminus contains a Pol IV-specific motif that is critical for genome surveillance in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.* 47(17):9037-9052. doi:10.1093/nar/gkz618.

Illustration (1 photo / schema, small format)

Parcours de Master (cochez le ou les parcours souhaités) :

Master « Sciences du Vivant », Faculté des Sciences de la Vie, Université de Strasbourg

- 1- Biologie et génétique moléculaire : ✓
- 2- Microbiologie : ✓
- 3- Plantes, biologie moléculaire et biotechnologies : ✓
- 4- Plantes, environnement et génie écologique :
- 5- Plantes, molécules bioactives et valorisation :
- 6- Virologie : ✓
- 7- Autres masters équivalents en France ou à l'étranger : ✓