

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

IBMP | 2023-2024

Titre/Title

Français : Rôle de la phosphorylation dans la régulation de l'activité d'une protéine impliquée dans la biogénèse du ribosome du chloroplaste chez la plante Arabidopsis.

English : Role of phosphorylation in the regulation of the in vivo activity of an RNA binding protein involved in ribosome biogenesis in the chloroplasts of Arabidopsis plants

Contacts

Responsable du projet :

HAMMANI Kamel
Tél: (0)3 67 15 52 81
Courrier-E : kamel.hammani@ibmp-
cnrs.unistra.fr

Responsable de l'équipe :

HAMMANI Kamel
Tél :
Courrier-E :
Lien page web de l'équipe
<http://www.ibmp.cnrs.fr/equipes/adaptation-genetique-du-chloroplaste/>

Description du projet (20 lignes max) | **Project Description** (20 lines max.)

Français :

Le chloroplaste est l'organite essentiel à la photosynthèse et à de nombreuses voies métaboliques fondamentales à la productivité des plantes et à leur adaptation aux stress biotiques ou abiotiques. Le chloroplaste a une origine endosymbiotique bactérienne et possède un génome qui lui est propre. Nous avons identifié au laboratoire un gène nucléaire codant une protéine de liaison à l'ARN importée dans les chloroplastes et qui facilite l'assemblage du ribosome chloroplastique et la traduction chez la plante Arabidopsis et tentons de comprendre le rôle de la phosphorylation de cette protéine dans la régulation de son activité in vivo. Des expériences de co-immunoprécipitation ont permis d'établir que la protéine se lie à l'ARN ribosomique 16S dans le chloroplaste et interagit avec des protéines de la petite sous-unité 30S du ribosome chloroplastique pour faciliter l'assemblage du ribosome 70S fonctionnel. De plus, des expériences de fusion de la protéine à la GFP ont révélé que cette protéine était localisée dans un sous-compartiment particulier des chloroplastes, le nucléoïde. De manière intéressante, les expériences de co-IP de la protéine couplées à la spectrométrie de masse ont révélé la présence de deux acides-aminés phosphorylés dans sa région N-terminale et un crible double hybride chez la levure a permis d'identifier une kinase chloroplastique interagissant physiquement avec notre protéine d'intérêt. Le but du projet de master sera de comprendre l'importance des sites de phosphorylation de notre protéine d'intérêt dans la régulation de son activité in vivo. Pour cela, nous disposons au laboratoire de lignées d'Arabidopsis exprimant dans un fond mutant pour le gène d'intérêt différentes versions de la protéine mutée ponctuellement au niveau des sites de phosphorylation et étiquetées (4xMyc et GFP). L'étudiant pourra étudier l'impact de ces mutations sur les fonctions de la protéine in vivo à savoir : sa sous-localisation cellulaire par microscopie confocale, ses capacités à interagir avec des partenaires protéiques ou ARN par co-immunoprécipitation ou encore, exprimer et purifier la kinase recombinante afin de confirmer son activité de phosphorylation in vitro.

English :



The chloroplast is an essential organelle that is the house of photosynthesis as well as many other metabolic pathways that are important for plant fitness and adaptation to biotic and abiotic stresses. The chloroplast has a bacterial endosymbiotic origin and possesses his own genome. However, chloroplast gene expression steps and in particular translation require the participation of hundreds of RNA binding proteins (RBPs) that are encoded by the nuclear genome and imported into chloroplasts. Using reverse genetics and molecular phenotyping, our lab has identified a particular nuclear gene in Arabidopsis plants that encodes an RNA binding protein controlling chloroplast translation and ribosomal assembly and, the aim of this project is to understand the role of phosphorylation in the regulation of the protein activity in vivo. We showed by co-immunoprecipitations that the protein binds to the 16S chloroplast ribosomal RNA in vivo and interacts with proteins of the small subunit (30S) of the chloroplast ribosome to facilitate the assembly of the functional 70S ribosome. In addition, GFP protein fusion experiments demonstrated that the RNA binding protein localizes in vivo in a particular sub-compartment of the chloroplasts important for gene expression, the nucleoid. Intriguingly, the co-immunoprecipitation of the protein coupled to mass spectrometry analysis revealed the existence of two phosphorylated amino acids in the protein sequence in an N-terminal region. A yeast two hybrid screen has identified a chloroplastic kinase as an interactor of this RNA binding protein. The project aims to investigate the importance of phosphorylation in the regulation of the in vivo activity of this protein. To this end, we have in the lab several transgenic Arabidopsis lines in a RBP gene mutant background expressing different phosphomutant versions of the RNA binding protein. The master trainee will study either the effect of these mutations on the in vivo protein functions looking at: its subcellular localization by confocal microscopy and its ability to interact with protein or RNA partners in chloroplasts by co-immunoprecipitation or he will express and purify the recombinant kinase to confirm its in vitro phosphorylation activity.

Méthodologies (mots clés) :

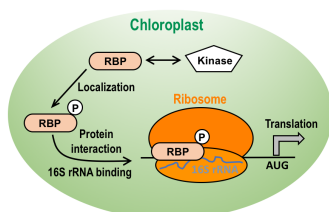
Fusion GFP, Microscopie confocale, Co-immunoprécipitation, Spectrométrie de masse, protéine recombinante

Références (maximum 3) :

Méteignier LV, Ghandour R, Zimmerman A, Kuhn L, Meurer J, Zoschke R, Hammani K (2021) Arabidopsis mTERF9 protein promotes chloroplast ribosomal assembly and translation by establishing ribonucleoprotein interactions in vivo. *Nucleic Acids Res* 49(2): 1114-1132.

Méteignier L-V, Ghandour R, Meierhoff K, Zimmerman A, Chicher J, Baumberger N, Alioua A, Meurer J, Zoschke R and Hammani K (2020) The Arabidopsis mTERF-repeat MDA1 protein plays a dual function in transcription and stabilization of specific chloroplast transcripts within the *psbE* and *ndhH* operons. *New Phytol* 227, 1376-13912

Illustration (1 photo ou 1 schéma, petit 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 : X
- 2- Microbiologie : X
- 3- Plantes, biologie moléculaire et biotechnologies : X
- 4- Plantes, environnement et génie écologique :

5- Plantes, molécules bioactives et valorisation :

6- Virologie :

7- Autres masters équivalents en France ou à l'étranger : X