

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

IBMP | 2023-2024

Titre/Title

Français : Expression, purification et reconstitution d'un complexe de ribonucléases pour résolution de structure en cryo-EM

English : Expression, purification and assembly of a ribonuclease complex for cryo-EM structure resolution

Contacts

Responsable du projet :

NOM Prénom Gobert Anthony
Tél: 03 67 15 53 66
Courrier-E :
anthony.gobert@ibmp-cnrs.unistra.fr

Responsable de l'équipe :

NOM Prénom Giegé Philippe
Tél :
Courrier-E :
philippe.giege@ibmp-cnrs.unistra.fr
Lien page web de l'équipe
<http://www.ibmp-cnrs.fr/equipes/fonctions-des-proteines-ppr/>

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

Français :

Les cellules de plantes, comme toutes cellules eucaryotes, ont des mitochondries. Ces organites d'origine endosymbiotique (α -proteobactérie) sont importants dans le métabolisme énergétique de la cellule (production d'ATP). Ces organites ont leur propre génome mais il ne suffit pas pour produire le protéome entier. Une partie des protéines est importée du cytosol (gènes codés dans le noyau). La transcription mitochondriale n'est pas fortement contrôlée et le transcriptome primaire subit de nombreuses maturations. Des protéines de liaison à l'ARN spécifiques et des RNases participent aux processus post-transcriptionnels. Nous avons mis en évidence la présence d'un complexe de RNases permettant diverses maturations ou dégradations d'ARN. Ce complexe semble de par sa fonction très similaire aux dégradosomes à ARN bactériens mais ses composants sont différents. En effet, il n'y a pas de RNase E, ni RNase Y, ni RNase J localisées dans les mitochondries de plantes. De plus, il n'y a pas de dégradation 5'-3' connue dans les mitochondries de plantes. La fonction de certaines RNases de ce complexe est en cours d'étude dans le laboratoire par deux doctorants. La production d'une structure tridimensionnelle d'une de ces RNases est aussi en cours. La purification du complexe à partir de matériel végétal est difficile car son abondance est très faible. Une stratégie alternative est donc nécessaire.

L'objectif du projet de Master sera d'exprimer les différentes enzymes du complexe seules ou ensembles dans un extrait cellulaire de plante, purifier ces enzymes ou le complexe et reconstituer le complexe dans le premier cas. Le système d'expression en extrait cellulaire a déjà été utilisé avec succès pour la production/purification d'une des enzymes du complexe. L'étudiant utilisera le matériel de la plateforme d'expression des protéines de l'IBMP pour les procédures de purification (Akta pure) et en cas de succès dans la purification du complexe (ou seulement de chaque protéine) pourra produire des grilles de cryo-EM et participer à l'acquisition des données. Les résultats structuraux permettront de déterminer les sites d'interactions protéine-protéine, les orientations du site catalytique et, couplés aux données fonctionnelles, de définir un mode de fonctionnement du complexe.



English :

Plant cells, like all eukaryotic cells, have mitochondria. These organelles of endosymbiotic origin (α -proteobacteria) are important in the energy production by the cell (ATP). These organelles have their own genome but it is not enough to produce the entire proteome. Part of the proteins is imported from the cytosol (genes encoded in the nucleus). Mitochondrial transcription is not tightly controlled and the primary transcriptome undergoes many maturations. Specific RNA-binding proteins and RNases participate in post-transcriptional processes. We have demonstrated the presence of a complex of RNases allowing various maturations or degradations of RNA. This complex appears in function to be very similar to bacterial RNA degradosomes but its components are different. Indeed, there is no RNase E, nor RNase Y, nor RNase J located in the mitochondria of plants. Additionally, there is no known 5'-3' degradation in plant mitochondria. The function of some RNases of this complex is being studied in the laboratory by two doctoral students. The production of a three-dimensional structure of one of these RNases is also in progress. Purification of the complex from plant material is difficult because its abundance is very low. An alternative strategy is therefore necessary. The objective of the Master's project will be to express the different enzymes of the complex alone or together in a plant cell extract, to purify these enzymes or the complex and to reconstitute the complex in the first case. The cell extract expression system has already been used successfully for the production/purification of one of the enzymes of the complex. The student can use the material of the IBMP protein expression platform for the purification procedures (Aktapure) and in case of success in the purification of the complex (or only of each protein) will be able to produce grids for cryo-EM and participate in data acquisition. The structural results will make it possible to determine the sites of protein-protein interactions, the orientations of the catalytic site and, coupled with the functional data, to define a mode of operation of the complex.

Méthodologies (mots clés) :

Biochimie, purification de protéines

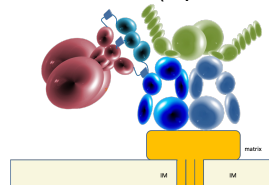
Références (maximum 3) :

Bouchoucha A, Waltz F, Bonnard G, et al. Determination of protein-only RNase P interactome in Arabidopsis mitochondria and chloroplasts identifies a complex between PRORP1 and another NYN domain nuclease. *Plant J.* 2019;100(3):549-561

Gobert A, Bruggeman M, Giegé P. Involvement of PIN-like domain nucleases in tRNA processing and translation regulation. *IUBMB Life.* 2019;71(8):1117-1125

Gobert A, Pinker F, Fuchsbaauer O, et al. Structural insights into protein-only RNase P complexed with tRNA. *Nat Commun.* 2013

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 :
- 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 :