



SUJET DE THESE

Ecole doctorale des sciences de la vie et de la santé de Strasbourg

Etude de facteurs associés au Nonsense-Mediated Decay chez *Arabidopsis*

Laboratoire d'accueil : Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du CNRS, IBMP UPR2357.

Début : Octobre 2016

Mots clés : Dégradation des ARN, NMD, endonucléase

Le Nonsense-Mediated Decay (NMD) est un mécanisme très conservé de contrôle de la qualité des ARN, couplé à la traduction. Il permet d'accélérer la dégradation d'ARNm pour lesquels la terminaison de la traduction a lieu précocement. Un des premiers rôles identifiés du NMD était d'éliminer les ARN contenant des codons stop prématurés (PTC), afin d'empêcher l'accumulation de protéines tronquées pouvant avoir une action délétère. Des études transcriptomiques ont démontré que le NMD régule également l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines fonctionnelles. Ainsi entre 3 et 10% du génome est dérégulé de façon directe ou indirecte lorsque le NMD est altéré dans différentes espèces. Chez les plantes, en dehors des protéines ayant un rôle très conservé au cours de l'évolution, incluant les protéines Up-frameshift (UPF1, 2 et 3) et SMG7, on connaît peu d'autres facteurs jouant un rôle dans le NMD. Afin de découvrir de tels facteurs, nous avons récemment utilisé une stratégie couplant immuno-purification et analyse en spectrométrie de masse (LC-MS/MS), pour identifier des partenaires protéiques de UPF1. Ces analyses ont été validées par l'identification de protéines clef du NMD. De plus nous avons aussi identifié dans ces purifications des facteurs impliqués dans les voies générales de dégradation des ARN, ainsi que plusieurs composants de fonctions inconnues.

Le but principal de cette thèse sera l'étude de facteurs associés au NMD chez *Arabidopsis*. Pour cela deux approches seront initiées. La première approche sera d'étudier la fonction de l'une des protéines de fonction inconnue qui co-purifie avec UPF1. Cette protéine possède un domaine de type NYN, prédit pour avoir une



activité endonucléase ainsi que deux domaines putatifs de liaison à l'ARN. Des expériences d'expression transitoire montrent que ce facteur tend à se localiser dans les Processing-bodies (P-bodies), ou à lieu la dégradation des ARN. Cette protéine pourrait-être un homologue fonctionnel de SMG6 connue pour son activité de clivage des cibles du NMD chez l'homme et la drosophile. Ce type d'activité n'a jamais été associé au NMD chez les plantes. La localisation subcellulaire de cette protéine sera validée par l'expression stable de versions étiquetées. Afin de déterminer son activité enzymatique, des versions sauvages et mutantes de la protéine seront produite, purifiées et mises en présence de substrats synthétiques. Nous utiliserons également des approches à haut débit de type genome-wide mapping of uncapped and cleaved transcripts (GMUCT) ou immuno-précipitation d'ARN afin d'identifier les substrats cellulaires de cette enzyme.

Dans une deuxième approche, l'étudiant en thèse sera impliqué dans l'étude de mutants issus d'un crible génétique basé sur la plante modèle *Arabidopsis* et le Virus X de la pomme de terre (PVX). Ce crible a notamment permis l'identification de mutants affectant le NMD. L'étudiant en thèse participera à l'identification des gènes mutés dans des lignées mutantes affectant positivement ou négativement l'accumulation de PVX, par une approche basée sur le resequençage de génome (Next Generation Mapping). Cette approche pourrait entre autre permettre l'identification de régulateurs positifs et/ou négatifs du NMD. L'ensemble de ces études permettra de mieux appréhender les mécanismes moléculaires impliqués dans le NMD chez les plantes.

Connaissances et compétences requises : Le candidat devra avoir des connaissances dans au moins l'un des domaines suivants: Génétique, Biologie végétale ou Biologie moléculaire. Il devra apprécier le travail en équipe et être motivé par l'étude de mécanismes biologiques fondamentaux.

Expertises qui seront acquises au cours de la formation :

Ce projet permettra à l'étudiant(e) d'acquérir une diversité de techniques incluant, clonage, séquençage; Analyses de protéines et immunoprécipitation; transgénèse stable et transitoire; northern blot; analyse bioinformatique de base.

Financement : Labex NetRNA

Contact : Les candidats devront envoyer un CV, les notes/classements de Master1/Master2 et une lettre de motivation à **Damien GARCIA**, Chargé de Recherche CNRS. **Tel :** +33 (0) 3 67 15 53 65, **email :** damien.garcia@ibmp-cnrs.unistra.fr.



Characterization of Nonsense-Mediated Decay associated factors in *Arabidopsis*

Laboratory: Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du CNRS, IBMP UPR2357.

Starting date : October 2016

Key words : RNA degradation, NMD, endonuclease

Nonsense-Mediated Decay (NMD) is a widely conserved RNA quality control mechanism coupled to translation, allowing to accelerate the decay of mRNA presenting aberrant features. One of the first identified functions of NMD was to specifically stimulate the degradation of mRNAs harboring premature termination codons (PTC), avoiding the accumulation of potentially harmful truncated proteins. Genome wide transcriptomic studies showed that beyond its quality control function, NMD also controls the level of many normal protein-coding mRNAs, as between 3 to 10% of total cellular mRNAs are affected when NMD is impaired in different species. In plants, beyond the most evolutionary conserved proteins involved in NMD, including the Up-frameshift (UPF1, 2 and 3) and SMG7, little is known about other factors regulating NMD. In order to identify such factors, we recently initiated a strategy coupling immuno-purification to mass spectrometry (LC-MS/MS), designed to identify protein partners of the Arabidopsis UPF1. These analyses were validated by the identification of some of the core components of NMD. In addition, we also identified in these purifications, proteins important for general RNA degradation and several other components with unknown functions in RNA decay.

The main goal of this PhD will be to characterize NMD associated factors in Arabidopsis. For this purpose, two approaches will be initiated. The first approach will be the detailed study of one of the factors identified associated with UPF1. This protein contains a NYN domain, predicted to have an endonuclease activity, adjacent to two predicted RNA binding domains. Transient expression assays suggest that this factor co-localize with UPF1 in Processing-bodies (P-bodies), where RNA degradation takes place. This endonuclease could be a functional homologue of SMG6, an endonuclease involved in the cleavage of NMD targets in Drosophila and Human. This kind of activity has never been described in plants, where a clear SMG6 homologue is missing. The subcellular localization of this factor will be validated by the stable expression of protein fusions with a fluorescent tag. In order to define its enzymatic activity, wild type and mutant versions of the protein in its nuclease



domain will be produced, purified and tested in the presence of synthetic substrates. We will also use high throughput strategies like genome-wide mapping of uncapped and cleaved transcripts (GMUCT) or RNA immuno-precipitation (RIP) in order to identify the endogenous targets of this enzyme.

In a second approach, the student will be involved in the study of mutants isolated in a genetic screen based on the model plant *Arabidopsis* and the Potatovirus X. This screen notably allowed the identification of mutants affecting NMD. The PhD student will be involved in the identification of genes mutated in a new series of mutants affecting positively or negatively viral accumulation, by an approach based on genome resequencing (Next Generation Mapping). This approach could allow the identification of either positive or negative regulators of NMD. Overall these studies will give us new insights into the factors and molecular mechanisms regulating NMD in plants.

Wished skills:

Candidates must hold a Master degree in biology. Some knowledge in one of the following areas, Genetics, Plant biology or Molecular biology is required.

Expertise that will be acquired during the training:

This project will allow the student to acquire a wide variety of techniques including cloning; sequencing; Protein analysis and immunoprecipitation; stable and transient plant transformation; basic bioinformatic analysis.

Funding: Labex NetRNA

Contact informations: Please send applications including, a CV, results and ranking in Master1/Master2 and a letter of motivation directly to **Damien Garcia**, Chargé de Recherche CNRS. **Email:** damien.garcia@ibmp-cnrs.unistra.fr. **Tel:** +33 (0) 3 67 15 53 65.