

Préparation de complexes RXR/RAR-origami d'ADN et caractérisation structurale par microscopie électronique

Encadrement

Albane le Maire (CRCN CNRS) – Izabella Tambones (Doctorante)

<http://www.cbs.cnrs.fr/index.php/fr/accueil-equipea5>

Gaëtan Bellot (CRCN INSERM) – Julie Finkel (Doctorante)

<https://integrativebiophysicsofmembranes.wordpress.com/2019/12/12/dna-nanotechnology/>

Contexte et description du projet

Le récepteur de l'acide rétinoïque (RAR) est un facteur de transcription appartenant à la famille des récepteurs nucléaires qui jouent de multiples rôles dans le développement et la différenciation des vertébrés. RAR se lie sous la forme d'hétérodimère avec le récepteur X du rétinoïde (RXR) à des séquences d'ADN spécifiques (éléments de réponse dépendant de l'acide rétinoïque, RARE). En l'absence de son ligand, RAR agit comme un répresseur transcriptionnel en recrutant des complexes corépresseurs au niveau de ses gènes cibles. **Cette répression constitutive est cruciale dans la reproduction, le développement et l'homéostasie des métazoaires. Cependant, ses déterminants moléculaires spécifiques restent obscurs.** En réponse à la liaison à l'acide rétinoïque (ATRA), RAR se dissocie des corépresseurs, lie les coactivateurs, induit l'expression des gènes cibles et favorise la différenciation des cellules myéloïdes immatures en granulocytes matures. Nous cherchons à décrire, à l'échelle moléculaire et atomique, les bases structurales de l'activité répressive de RAR. Grâce à un large éventail de méthodes structurales et de biophysique (cristallographie aux rayons X, résonance magnétique nucléaire (RMN), diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS), et cryo-microscopie électronique (cryoEM), smFRET, HDX-MS, anisotropie de fluorescence), nous cherchons à apporter de nouvelles connaissances sur la structure atomique et la dynamique de l'ensemble des complexes régulateurs impliquant RAR en complexe avec les corépresseurs (CoR) et liés à différents éléments de réponse de l'ADN. Le stage de Master s'inscrit dans ce projet.

Objectif du projet

L'objectif du projet de Master est de préparer un assemblage macromoléculaire comprenant la protéine RAR en hétérodimère avec RXR et en complexe avec le CoR et des nanostructures à base d'ADN appelées origami d'ADN. Les origamis d'ADN seront conçus pour présenter des séquences d'ADN spécifiques de cet hétérodimère. Ainsi différentes séquences d'ADN d'intérêt pourront être insérées dans l'origami d'ADN pour sélectionner les différents états du complexe RAR/RXR-CoR à visualiser. L'utilisation d'origami d'ADN permettra de positionner les protéines cibles à des positions définies dans l'espace dans l'objectif de faciliter la visualisation de ces particules en microscopie électronique (cryo-EM). Des échantillons cryo-EM du complexe RAR/RXR-CoR et origami d'ADN seront préparés et l'acquisition des données de cryo-EM se fera au laboratoire, en collaboration avec la plateforme de microscopie électronique.

Collaborations

Plateforme de microscopie électronique du CBS (J. Lai Kee Him et A. Ancelin, CBS).

Techniques utilisées pendant le stage

Purification de protéines, préparation et caractérisation biophysique de complexes multimoléculaires, préparation d'origamis d'ADN, microscopie électronique (cryo-EM)

Références

- Cordeiro TN, Sibille N, Germain P, Barthe P, Boulahtouf A, Allemand F, Bailly R, Vivat V, Ebel C, Barducci A, Bourguet W, [le Maire A#](#), Bernadó P. (2019) Interplay of protein disorder in retinoic acid receptor heterodimer and its corepressor regulates gene expression. **Structure**. pii: S0969 2126(19)30163-7. doi: 10.1016/j.str.2019.05.001.

- [le Maire A](#), Teyssier C, Erb C, Grimaldi M, Alvarez S, de Lera A, Balaguer P, Gronemeyer H, Royer C, Germain P, Bourguet W. (2010) A unique secondary structure switch controls constitutive gene silencing by retinoic acid receptor. **Nature Structural and Molecular Biology**. 17(7):801-7.

- Aissaoui N, Lai-Kee-Him J, Mills A, Ropars V, Bron P, [Bellot G](#). Modular Imaging Scaffold for Single-Particle Electron Microscopy. (2021) **ACSnano** Mar 23;15(3):4186-4196.