

Proposition de stage de Master 2 (2026/27)

Analyse de la structure et des interactions de la région C-terminale intrinsèquement désordonnée de la protéine MED25 par RMN

Laboratoire : Institut de Chimie des Substances Naturelles (CNRS UPR 2301)

Adresse : CNRS de Gif-sur-Yvette, 1 avenue de la Terrasse, 91190 Gif-sur-Yvette

Équipe de recherche : Département Biologie et Chimie et Structurales et Analytiques

Responsable de stage : Dr Christina Sizun, directrice de recherche CNRS, HDR

Adresse électronique : christina.sizun@cnr.fr

Profil recherché : Etudiant.e avec une formation en biochimie ou en biologie structurale intéressé.e par des techniques et aspects biophysiques, notamment la RMN, ou étudiant.e avec une formation en chimie/physique intéressé.e par apprendre à travailler à la paillasse dans un laboratoire de biochimie. L'étudiant.e sera formé.e aux techniques utilisées.

Contexte. Le complexe multiprotéique du Médiateur est un co-activateur de l'ARN polymérase II au sein du complexe de pré-initiation de la transcription. Il forme un pont entre des séquences régulatrices reconnues par des facteurs de transcription (FT) et la machinerie basale de l'ARN polymérase localisée au niveau d'un promoteur. La sous-unité MED25 du médiateur contient deux domaines repliés : le domaine VWA qui ancre MED25 au Médiateur et le domaine ACID qui est reconnu par des FT via un domaine TAD. De plus MED25 contient une longue queue C-terminale de ~200 acides aminés prédite pour être désordonnée (MED25CT). Celle-ci contient un motif NR-box (LxxLL) reconnu par le récepteur de l'acide rétinoïque RAR et le récepteur de rétinoïdes RXR. Par ailleurs, une isoforme de MED25 contient un motif similaire, LxxLI. Celui-ci est prédit par AlphaFold pour se replier en hélice en complexe avec le domaine ACID de MED25, ce qui pourrait indiquer un mécanisme d'auto-inhibition de MED25. L'objectif général de ce projet est de caractériser la structure et le dynamique de MED25CT et de valider des motifs d'interaction avec des protéines partenaires.

Mots-clés : sous-unité 25 du Médiateur MED25, récepteur nucléaire, protéine intrinsèquement désordonnée, structures transitoires, interactions de protéines, RMN.

Objectifs et programme de travail. La résonance magnétique nucléaire (RMN) sera utilisée pour quantifier le désordre le long de la séquence à l'échelle du résidu. En particulier, nous cherchons à savoir si les motifs LxxLL/I se structurent transitoirement en l'absence de partenaire. Pour cela, le fragment protéique MED25CT sera produit sous forme recombinante dans *E. coli*, avec des marquages isotopiques à l'azote 15 et au carbone 13, puis purifié par des techniques de chromatographie liquide. Des spectres RMN multinucléaires 3D seront acquis pour déterminer les déplacements chimiques du squelette peptidique. Cette étude préalable est nécessaire pour analyser ensuite des interactions avec des protéines partenaires qui seront produites sans marquage isotopique. En raison du biais de composition en acides aminés, avec une proportion importante de prolines, et de la difficulté à produire le fragment pleine longueur, des fragments plus courts contenant les motifs LxxLL/I seront utilisés dans un premier temps.

Missions confiées au stagiaire :

- Production et purification de MED25CT ou de fragments plus courts sous forme de protéines recombinantes dans *E. coli* avec des marquages aux isotopes stables,
- Production de partenaires protéiques, notamment le domaine ACID de MED25 et/ou le domaine de liaison aux ligands des récepteurs RXRα et RARα sous forme apo et/ou holo,
- Analyse d'une protéine intrinsèquement désordonnée par résonance magnétique nucléaire.

Principales techniques utilisées : production et purification de protéine recombinante dans *E. coli*, chromatographie liquide, résonance magnétique nucléaire.

L'ICSN est entièrement équipé pour la production de protéines recombinantes et possède un parc de spectromètre RMN à haut champ pour des applications en biologie structurale.

Master 2 Internship Proposal (2026/27)

Analysis of the structure and interactions of the intrinsically disordered C-terminal region of the MED25 protein by NMR

Host Laboratory: Institut de Chimie des Substances Naturelles (CNRS UPR 2301)

Address: CNRS de Gif-sur-Yvette, 1 avenue de la Terrasse, 91190 Gif-sur-Yvette, France

Research Team: Department of Structural and Analytical Biology and Chemistry

Internship Supervisor: Dr. Christina Sizun, CNRS Research Director, HDR

Email: christina.sizun@cnrs.fr

Candidate Profile: We are seeking a Master 2 student with a background in biochemistry or structural biology, interested in biophysical techniques—particularly NMR— or a student with a background in chemistry/physics eager to learn wet-lab work in a biochemistry laboratory. The student will be trained in the required techniques.

Context. The Mediator complex is a co-activator of RNA polymerase II within the transcription pre-initiation complex. It acts as a bridge between regulatory sequences recognized by transcription factors (TFs) and the basal RNA polymerase machinery at gene promoters. The MED25 subunit of the Mediator contains two folded domains: the VWA domain, which anchors MED25 to the Mediator, and the ACID domain, which is recognized by TFs via a TAD domain. In addition, MED25 comprises a long C-terminal tail (~200 amino acids), predicted to be intrinsically disordered (MED25CT). This region contains an NR-box motif (LxxLL), recognized by the retinoic acid receptor (RAR) and the retinoid X receptor (RXR). An isoform of MED25 contains a similar motif, LxxLI. AlphaFold predicts this LxxLI motif to fold into an α -helix in complex with the ACID domain of MED25, suggesting a potential auto-inhibition mechanism for MED25. The overall objective of this project is to characterize the structure and dynamics of MED25CT and to validate its interaction motifs with partner proteins.

Keywords: Mediator MED25 subunit, nuclear receptor, intrinsically disordered protein, transient structures, protein-protein interactions, NMR.

Objectives and Work Program: Nuclear Magnetic Resonance (NMR) will be used to quantify disorder along the sequence at the residue level. In particular, we aim to determine whether the LxxLL/I motifs transiently adopt a structured conformation in the absence of a binding partner. To achieve this, the MED25CT protein fragment will be produced as a recombinant protein in *E. coli*, with isotopic labeling (^{15}N and ^{13}C), and purified using liquid chromatography. 3D multinuclear NMR spectra will be acquired to determine the chemical shifts of the protein backbone. This preliminary study will enable the analysis of interactions with unlabeled partner proteins. Due to the amino acid composition bias (high proline content) and the difficulty in producing the full-length fragment, shorter fragments containing the LxxLL/I motifs will be used initially.

Tasks Assigned to the Intern:

- Production and purification of MED25CT or shorter fragments as recombinant proteins in *E. coli* with stable isotope labeling.
- Production of protein partners, including the ACID domain of MED25 and/or the ligand-binding domains of RXR α and RAR α (in apo and/or holo forms).
- Structural analysis an intrinsically disordered protein by Nuclear Magnetic Resonance (NMR).

Main Techniques to be used: Production and purification of recombinant proteins in *E. coli*, liquid chromatography, Nuclear Magnetic Resonance (NMR).

The ICSN is fully equipped for recombinant protein production and hosts a high-field NMR spectrometer facility for applications in structural biology.