**Proposition de sujet de thèse**

**Campagne 2017 d’attribution des contrats doctoraux attribués à EDCSV**

**Directeur de thèse** (Supervisor), HDR rattaché à EDCSV: *HART, Darren, CNRS DR2 IBS, HDR Assimilé via EMBL (note : EDCSV 05/09/13)*

**Unité de Recherche**/Laboratory : *IBS, Weissenhorn, Winfried*

**Equipe de recherche**/Research team : *HART, Darren (darren.hart@ibs.fr)*

**Titre du projet de thèse**: *Ingénierie par évolution dirigée d'inhibiteurs du complexe de l'ARN-polymérase*

**Titre du projet de thèse**: *Protein engineering by directed evolution of inhibitors of the influenza RNA polymerase*

**Résumé** (en anglais): Précisez le contexte, les objectifs, les méthodes (500 mots maximum)

**Context.** Many host/pathogen functions are performed by multi-protein complexes. Artificially controlling these activities requires small molecules that target binding or catalytic sites. X-ray structures reveal these sites, but also the **protein:protein interaction** interfaces that, if blocked by competing molecules, may inhibit complex assembly and function. However, design of small molecule inhibitors of protein interactions is notoriously difficult. We will therefore use influenza polymerase structures to identify interacting **linear peptide regions** (20-30 aa) involved in domain-domain interactions. We will use filamentous **phage display** to screen large random libraries (≤108 variants), constructed by **genetic randomisation** of these 20-30 aa linear peptides. Affinity selections on immobilised enzyme domains (here PA) will identify **higher affinity mimics** of the original sequences that will be tested for inhibition of complex assembly both in vitro and in **cellular mini-replicon assays**.

**Objectives.** We will build on our previous results on individual polymerase domains. A protein engineering approach using random library methods, or *directed evolution*, combined with robotic screening, will be used to develop cell-permeable peptides that disrupt the complex in cell culture. Effects of this disruption on polymerase activity will be analysed.

**Methods.** We will use random mutagenesis and phage display technology. Proteins and complexes will be expressed recombinantly, purified and characterised using biophysical methods. Structural analyses will use NMR and X-ray crystallography. Cell-based assays will be done in collaboration with a partner.

**Mots-clés** (5 maximum) :

* Directed evolution, protein engineering, protein complexes, inhibitors
* Evolution dirigée, ingénierie des proteines, complexes, inhibiteurs

**Profil du candidat souhaité :**

Molecular biologist with interest in synthetic and structural biology

**Trois publications récentes du Directeur de thèse** (et du co-directeur, s’il y a lieu) :

Hart DJ, Waldo GS (2013) Library methods for structural biology of challenging proteins and their complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23:403–408.

Thierry E, Guilligay D, Kosinski J, Bock T, Gaudon S, Round A, Pflug A, Hengrung N, El Omari K, Baudin F, Hart DJ, Beck M, Cusack S (2016) Influenza Polymerase Can Adopt an Alternative Configuration Involving a Radical Repacking of PB2 Domains. Mol. Cell 61:125–137.

Delaforge E, Milles S, Bouvignies G, Bouvier D, Boivin S, Salvi N, Maurin D, Martel A, Round A, Lemke EA, Ringkjøbing Jensen M, Hart DJ\*, Blackledge M\* (2015) Large-Scale Conformational Dynamics Control H5N1 Influenza Polymerase PB2 Binding to Importin α. *J. Am. Chem. Soc.* 137:15122–15134.

**Docteurs encadrés par le Directeur de thèse** (et du co-directeur s’il y a lieu) **ayant soutenu leur thèse** (dans les 5 dernières années). Indiquer la date de soutenance, la durée de la thèse (en mois), les publications relatives au sujet de thèse et leur situation actuelle :

**Elise Delaforge ;** Date de soutenance : 4/12/16 ; La durée de la thèse (en mois) : 38

Delaforge E, Milles S, Bouvignies G, Bouvier D, Boivin S, Salvi N, Maurin D, Martel A, Round A, Lemke EA, Ringkjøbing Jensen M, Hart DJ, Blackledge M (2015) Large-Scale Conformational Dynamics Control H5N1 Influenza Polymerase PB2 Binding to Importin α. *J. Am. Chem. Soc.* 137:15122–15134.

Delaforge E, Milles S, Huang J, Bouvier D, Jensen MR, Sattler M, Hart DJ, Blackledge M (2016) Investigating the Role of Large-Scale Domain Dynamics in Protein-Protein Interactions. *Front. Mol. Biosci*. 3:54.

Situation actuelle : Postdoc CBS Montpellier

**Eva Geenen** (EMBL) ; Soutenance : 17/12/13 ; Durée : 35

Situation actuelle : Clinical Research Associate at Novartis

**Danielle Desravines** (EMBL) ; Soutenance : 03/12/10 ; Durée 48

Yumerefendi H, Desravines DC, Hart DJ (2011) Library-based methods for identification of soluble expression constructs. *Methods San Diego Calif* 55:38–43.

Desravines DC, Martin IS, Schneider R, Mas PJ, Aleksandrova N, Jensen MR, Blackledge M & Hart DJ (2016) Structural characterization of the HDAC7–SMRT interaction (submitted, under review)

Situation actuelle : Permanent EMBL

**Thèses en cours encadrées par le Directeur de** **thèse** (et du co-directeur s’il y a lieu, dupliquer le tableau) : 0

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Nom, Prénom du doctorant | Date de début de thèse | Type de financement | Indiquer, le cas échéant, s’il s’agit d’une co-direction, d’une co-tutelle,… |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |
|  |  |  |  |

**Nombre de chercheurs et enseignant-chercheurs titulaires d’une HDR dans l’équipe** :

1

**Nombre total de thèses en cours dans l’équipe :**

0