

Université de Montréal

Caractérisation du transport nucléocytoplasmique
de la protéine Staufen chez les mammifères

par

Catherine Martel

Programmes de biologie moléculaire
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
maître ès sciences
en biologie moléculaire

avril, 2003

© Catherine Martel, 2003



QH
506
U54
2003
v.013

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Caractérisation du transport nucléocytoplasmique
de la protéine Staufén chez les mammifères

Présenté par :
Catherine Martel

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr François Dragon, président-rapporteur
Dr Luc DesGroseillers, directeur de recherche
Dr Chantal Autexier, membre du jury

RESUME

De plus en plus d'évidences tendent à démontrer l'importance de la localisation d'ARNm dans l'accomplissement d'une multitude de processus cellulaires tels la plasticité synaptique, l'établissement des axes embryonnaires et la division asymétrique. Le transport efficace de l'ARNm de son site de transcription à son site de traduction nécessite la participation de nombreuses protéines. Or, un nombre croissant d'exemples démontre que certaines protéines impliquées dans la localisation d'ARN sont en mesure de transiter par le noyau. Ce mémoire a donc été entrepris dans le but de mieux comprendre la relation existant entre la maturation nucléaire des ARN et leur localisation subséquente dans le cytoplasme.

L'implication de la protéine Staufén dans le transport de l'ARNm a d'abord été caractérisé chez la drosophile où elle joue un rôle clé durant l'ovogenèse. Un homologue de Staufén chez les mammifères est également impliqué dans le transport cytoplasmique d'ARN. L'identification de signaux de localisation nucléaire dans la séquence de Staufén suggère son implication dans des événements nucléaires.

Nos travaux ont permis de confirmer la fonctionnalité du NLS bipartite de Staufén et de révéler l'existence d'un mécanisme de transport nucléocytoplasmique régulé. L'étude des déterminants impliqués dans la régulation du transport a permis d'identifier le domaine majeur de liaison à l'ARN de Staufén (dsRBD3) comme nécessaire à la modulation de l'importation. Un mécanisme de coopération impliquant le domaine dsRBD4 de Staufén a également pu être caractérisé. De plus, la localisation nucléolaire de certains mutants suggère un rôle spécifique de Staufén dans ce compartiment subnucléaire.

Mots clés: localisation d'ARN, transport nucléocytoplasmique, protéine liant l'ARN double-brin.

ABSTRACT

mRNA localization is an important mechanism allowing precise spatial and temporal expression of proteins. Many phenomena are based on transport and local anchoring of specific mRNA in cells like synaptic plasticity, axis formation during development and asymmetric cell division.

Transport of mRNA from its site of transcription to its site of translation requires the activity of several proteins. Increasing numbers of examples reveal that proteins involved in mRNA localization are able to transit to the nucleus. Thus, the aim of this study is to increase our understanding about the relationship between the nuclear processing of mRNA and its cytoplasmic localization.

The function of Staufen in mRNA localization was first characterized in *Drosophila* where it plays an essential role during oogenesis. A mammalian Staufen homologue is also implicated in cytoplasmic mRNA localization. Although its localization and function are cytoplasmic, the identification of a nuclear localization signal (NLS) in its sequence suggests that it may be also involved in nuclear events.

Our work clearly demonstrates the functionality of the Staufen's bipartite NLS and also reveals the existence of a putative nucleocytoplasmic shuttling mechanism. Staufen import activity seems to be modulated at least in part by a cytoplasmic retention mechanism. Analysis of determinants involved in the import regulation of Staufen enabled us to identify dsRBD3, the major RNA binding domain of Staufen, as necessary for this activity. Cooperation between dsRBD3 and dsRBD4 was also uncovered. The nucleolar localization of some mutants suggests a more specific role of Staufen in this subnuclear compartment. This study is a first step toward a better understanding of Staufen functions in the nucleus/nucleolus.

Keywords: mRNA localization, nucleocytoplasmic shuttling, double-stranded RNA binding domain.

TABLE DES MATIÈRES

Page de titre	i
Identification du jury	ii
Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	ix
Liste des sigles et abréviations	xi
Remerciements	xiv
Introduction	1
Introduction générale	1
Partie I : Localisation d'ARN	3
Avantages d'une localisation d'ARN	3
1) Économie énergétique	3
2) Contrôle spatio-temporel de l'activité protéique	3
3) Production localisée d'une concentration élevée de protéine	4
4) Traduction concertée modèle opéron	5
Processus impliquant une localisation d'ARNm	6
1) Division asymétrique	6
2) Motilité cellulaire	9
3) Établissement des axes embryonnaires	9
4) Plasticité synaptique	10
Mécanismes de localisation de l'ARN	11
1) Diffusion et ancrage	11
2) Stabilisation locale vs dégradation générale	12
3) Synthèse localisée / exportation nucléaire vectorielle	12
4) Transport actif	13

Composantes de la localisation	14
1) Éléments cis	14
2) Facteurs en trans	16
a. Liaison directe à l'ARN	17
i. Domaine RRM	17
ii. Domaine KH	18
iii. Domaine dsRBD	18
b. Exemples de complexes RNP	23
i. Localisation de l'ARNm oskar	23
ii. Localisation de l'ARNm Ash1	25
Partie II : Staufen	28
Staufen chez la drosophile	28
1) Description générale	28
2) Structure	29
3) Fonctions	30
a. Localisation de l'ARNm bicoïd	30
b. Localisation de l'ARNm oskar	37
c. Localisation de l'ARNm prospero	39
d. Établissement de la mémoire à long terme	40
Staufen chez les mammifères	41
1) Description générale et structure	41
2) mStaufen dans les neurones	44
3) Autres fonctions de mStaufen	49
a. mStaufen : composante du complexe télomérase	52
b. Interaction de mStaufen avec des composantes virales	55
4) mStau ⁱ	56
5) mStaufen2	56
Partie III : Noyau et transport nucléaire	59
Pore Nucléaire	59

Exportation et importation protéique	62
1) Eléments de transport en cis	63
2) Récepteurs de transport nucléaire	63
3) Gradient RanGTP	64
Mécanismes d'exportation de l'ARN	69
1) ARNm	69
2) Autres ARN	71
Nucléole	72
Relation entre transport nucléaire et localisation d'ARN	74
Modèle de localisation d'ARN	75
Hypothèse de travail	79
Résultats	80
<i>Article : Staufen is imported in the nucleus via a bipartite nuclear localization signal</i>	82
Abstract	83
Introduction	84
Experimental	86
Results	89
Discussion	94
Acknowledgements	99
References	100
Discussion	125
Mécanismes de régulation potentiels du transport nucléocytoplasmique de Staufen	126
Phosphorylation	126
Masquage du NLS	127
Rétention physique au cytoplasme	129

Conditions cellulaires influençant la localisation subcellulaire	129
Densité cellulaire	129
Cycle cellulaire	130
Mécanismes d'exportation potentiels	131
Rôles potentiels de Staufen dans le noyau	132
Reconnaissance et liaison d'ARNm à localiser	133
Implication de Staufen dans le complexe télomérique	133
Implication de Staufen dans la biogénèse du ribosome	136
Conclusion	139
Sources documentaires	I

LISTE DES TABLEAUX

Introduction

Tableau I : Karyophérines de la famille β	65
---	----

Résultats

Tableau I : Oligonucleotides primers used in PCR amplification to construct different Staufen mutants and/or fusion proteins	105
Tableau II : Oligonucleotides primers used in all around / Quickmut PCR amplification to construct different Staufen mutants	106

LISTE DES FIGURES

Introduction

Figure 1 : Exemples d'ARN localisés dans différents organismes et types cellulaires	7
Figure 2 : Domaines majeurs de liaison à l'ARN	19
Figure 3 : Image stéréo montrant les détails de l'interaction entre le dsRBD3 de Staufen et l'ARNdb	21
Figure 4 : Exemples de complexes RNP	26
Figure 5 : Rôles de Staufen dans la localisation des ARNm bicoid, oskar et prospero chez la drosophile	32
Figure 6 : Structure secondaire de la région 3'UTR de l'ARNm bicoïd (nucléotides 181-720)	34
Figure 7 : Structure et caractéristiques de la protéine mStaufen	42
Figure 8 : Distribution subcellulaire de mStaufen	45
Figure 9 : Photographie par microscopie électronique d'un granule RNP	50
Figure 10 : Structure secondaire de l'ARN hTR	53

Figure 11 :	Schéma du pore nucléaire	61
Figure 12 :	Importation et exportation protéique	67
Figure 13 :	Modèle du mécanisme localisation d'ARN	77

Résultats

Figure 1 :	Schematic representation of Staufen and Staufen mutants	107
Figure 2 :	Staufen contains a functional bipartite NLS	109
Figure 3 :	Mutations in the bipartite NLS abolish nuclear import	111
Figure 4:	The bipartite NLS is also functional in mammalian cells	113
Figure 5:	Subcellular localization of RNA-binding deficient Staufen mutants	115
Figure 6:	Deletion of dsRBD3 impairs Staufen MOI activity	117
Figure 7 :	dsRBD3 cooperates with dsRBD4 for Staufen MOI activity	119
Figure 8 :	dsRBD3 is involved in Staufen cytoplasmic retention	121
Figure 9 :	dsRBD3 cooperates with dsRBD4 for Staufen cytoplasmic retention	123

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

APC	: protéine adémateuse de la polyposis coli
ARE	: élément riche en nucléotides AU
ARN db	: ARN bicaténaire
ARN	: acide ribonucléoprotéique
ARNm	: ARN messenger
ARNr	: ARN ribosomique
ARNsn	: petit ARN nucléaire
ARNt	: ARN de transfert
bcd	: bicoïd
BLE	: élément de localisation de bicoïd
BRE	: élément de réponse à Bruno
CamKII α	: protéine kinase II dépendante du calcium/calmoduline sous unité α
CBC	: complexe de liaison du cap
CKII	: caséine kinase II
CTE	: élément de contrôle du transport
Ddlc	: chaîne lourde de la dynéine
dsRBD	: domaine de liaison à l'ARNdb
EJC	: complexe de la jonction exonique
EMSA	: essai de retardement sur gel
exu	: exuperantia
FMRP	: protéine du retard mental X fragile
GFP	: protéine fluorescente verte
GGLE	: élément de localisation aux granules germinales
gmc	: glial cell missing
GMC	: cellule du ganglion-mère
grk	: gurken
GTP	: guanosine triphosphate
GTPase	: protéine d'activation d'hydrolyse du GTP
hnRNP	: ribonucléoprotéine hétérogène nucléaire

hTERT	: transcriptase inverse de la télomérase humaine
hTR	: ARN de la télomérase humaine
Insc	: Inscuteable
kDa	: kiloDalton
KH	: homologie à la protéine hnRNP K
KHC	: chaîne lourde de la kinésine
MBP	: protéine basique de la myéline
MCLE	: élément de localisation au nuage mitochondrial
Mir	: Miranda
MLV	: virus de la leucémie humaine
MPMV	: virus simiesque Mason-Pfizer
NB	: neuroblaste
NES	: signal d'exportation nucléaire
NLS	: signal de localisation nucléaire
nm	: nanomètres
NoLD	: domaine de localisation nucléolaire
NPC	: complexe du pore nucléaire
NTF2	: facteur de transport nucléaire 2
NXT	: protéine d'exportation apparantée à NTF2
osk	: oskar
PKR	: protéine kinase dépendante de l'ARNdb
PPI	: protéine phosphatase-1
pros	: prospero
RanGAP	: protéine activatrice de l'activité GTPase de Ran
RanGEF	: facteur d'échange nucléotidique de Ran
RER	: réticulum endoplasmique rugueux
RNP	: complexe ribonucléoprotéique
RRM	: motif de reconnaissance à l'ARN
RT-PCR	: réaction de polymérisation en chaîne sur une transcription inverse
snRNP	: ribonucléoprotéine contenant des ARNsn
Sqd	: Squid

SRP	: protéine de reconnaissance du signal
SV40	: virus simiesque 40
swa	: swallow
TBD	: domaine de liaison à la tubuline
TRAP	: protocole d'amplification télomérique de séquences répétées
USER	: séquence de régulation non traduite
UTR	: région non-traduite
UV	: ultra-violet
VIH	: virus d'immunodéficience humain
Xlrpba	: protéine liant l'ARN de <i>Xenopus leavis</i>
ZBP	: protéine de liaison au code zip

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier les personnes suivantes pour leur aide directe ou indirecte dans la réalisation de ce mémoire.

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr. Luc DesGroseillers, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour la grande autonomie qu'il laisse à ses étudiants tout en étant toujours disponible pour discuter des expériences en cours ou à venir, pour sa vision positive de la recherche, pour sa bonne humeur quotidienne et surtout pour m'avoir toujours encouragé. Merci également à Thomas Duchaine pour m'avoir fait découvrir le monde merveilleux de Staufen.

Merci à tous mes collègues pour leur aide et leurs conseils et surtout pour avoir rendu le travail de labo aussi divertissant. Merci à George pour ses conseils diététiques et ses suggestions de menus tonifiants. Merci à Demian pour ces scènes de ménages quotidiennes avec George. Merci à Laurent pour la « collaboration du siècle », et pour son humour français. Merci à Karine pour avoir gonflé les rangs de la gent féminine du laboratoire. Et surtout, merci à Furax pour son amitié, son ironie mordante et pour m'avoir fourni des conseils scientifiques judicieux, mais encore plus pour m'avoir aidé à les oublier lors de ces nombreuses soirées, ô combien scientifiques, en compagnie de l'ineffable Dr. Moron et de son humour raffiné.

Merci à Louise Cournoyer pour son assistance technique essentielle en culture cellulaire. Merci au CRSNG pour son support financier.

J'aimerais également remercier mes parents qui m'ont toujours encouragé dans la poursuite de mes études. Merci à mon père Jacques pour sa curiosité, pour avoir été une source d'inspiration et, bien sûr, pour m'avoir transmis ses gènes scientifiques. Merci à mère Louise pour son amitié rafraîchissante et aussi pour rendre ma vie toujours plus colorée. Un gros merci à mon copain Mathieu pour m'avoir conseillé, encouragé, aidé et surtout supporté pendant la rédaction de ce mémoire.

INTRODUCTION

Introduction générale

Originellement, la cellule était définie comme un sac lipidique contenant un mélange hétéroclite de molécules dont les interactions aléatoires les unes avec les autres étaient régies par leur diffusion dans le cytoplasme. Cette représentation de plus en plus désuète est graduellement remplacée par un modèle dans lequel la cellule est subdivisée en de nombreuses microrégions subcellulaires ayant des fonctions spécifiques. Les interactions protéiques dans une telle cellule régionalisée ne seraient plus basées sur la diffusion et la rencontre aléatoire des molécules mais plutôt sur leur ciblage précis vers une région subcellulaire permettant leur interaction favorisée avec un sous-groupe de facteurs. L'existence d'un mécanisme de localisation dans l'établissement de la compartimentalisation de l'expression génique dans la cellule s'avère donc cruciale pour le maintien des fonctions cellulaires, principalement dans les cellules fortement polarisées. L'existence d'une machinerie de localisation cellulaire est également requise durant le développement de nombreux organismes. Deux mécanismes peuvent être envisagés pour permettre la régionalisation de l'expression génique : la localisation protéique et la localisation d'ARN. Bien que ces deux mécanismes soient quelques fois redondants, de plus en plus d'études démontrent que le transport d'ARN est un mécanisme général jouant un rôle clé dans de nombreux phénomènes cellulaires. Plusieurs avantages du transport des ARNm par rapport au transport protéique peuvent d'ailleurs être formulés.

PARTIE I : LOCALISATION D'ARN

Avantages d'une localisation d'ARN

1) Economie énergétique

Notons d'abord qu'une localisation d'ARNm représente une économie énergétique notable par rapport au transport des protéines. Ainsi, la localisation d'une seule molécule d'ARNm suffit à produire une multitude de copies de la protéine d'intérêt, protéines qui auraient chacune nécessité un transport protéique indépendant, beaucoup plus coûteux en énergie. De plus, le transport d'ARN s'effectue via la formation de complexes ribonucléoprotéiques (RNP) qui contiennent généralement plusieurs copies d'un même ARN (Ainger et al., 1993). Le transport d'un seul RNP permet donc la localisation simultanée de plusieurs copies de l'ARNm générant ultimement une quantité importante de protéine.

2) Contrôle spatio-temporel de l'activité protéique

La localisation d'ARN est généralement couplée à un contrôle traductionnel permettant une modulation spatio-temporelle très précise de l'expression génique. La localisation de l'ARN permet donc de restreindre l'activité d'une protéine à certaines régions cellulaires tout en prévenant une activité ectopique dans des régions où elle pourrait avoir des effets délétères. Un exemple illustrant bien cet avantage nous est fourni par la localisation de l'ARNm de la Myelin Basic Protein (MBP). La protéine MBP est impliquée dans le phénomène de compaction membranaire des feuillettes de myéline localisés dans les prolongements des oligodendrocytes (Trapp et al., 1987; Ainger et al., 1997). Ce processus est essentiel à la myélinisation efficace des axones des neurones par les oligodendrocytes. Compte tenu de son activité de compaction, la présence ectopique de la protéine MBP au niveau du corps cellulaire pourrait endommager grandement les structures membranaires s'y trouvant, tels le réticulum endoplasmique (RE), l'enveloppe nucléaire et l'appareil de Golgi. La répression de la traduction du transcrit MBP durant son transport du corps cellulaire vers les

compartiments de myéline de l'oligodendrocyte permet donc de limiter son activité aux régions subcellulaires où elle est requise. Un autre exemple illustrant l'avantage du contrôle spatio-temporel de l'expression protéique par localisation d'ARN est celui de la régionalisation des différents isoformes de l'actine. Deux types principaux de microfilaments d'actine sont retrouvés dans les ostéoblastes, les myoblastes et les neurones en croissance : les microfilaments périnucléaires et les microfilaments périphériques. En plus de leur localisation subcellulaire distincte, ces deux types de microfilaments sont caractérisés par la nature des sous-unités d'actine les composant. La localisation du transcrite de l'isoforme β de l'actine en périphérie des cellules permet la polymérisation de microfilaments contenant exclusivement cet isoforme de l'actine. En restreignant la production de l'isoforme β en périphérie, le processus de localisation d'ARNm garantit également l'intégrité des microfilaments périnucléaires obtenus par assemblage des isoformes α et γ de l'actine (Hill and Gunning 1993; Kislauskis et al., 1993; Bassell et al., 1998; Watanabe et al., 1998).

Le contrôle temporel de la traduction des ARNm localisés est souvent mis à profit pour permettre une synthèse rapide de protéines en réponse à des stimuli biochimiques. Cet avantage est clairement illustré par la localisation d'ARN dans les dendrites des neurones où une activité synaptique entraîne une synthèse locale des protéines impliquées dans la modulation de la force synaptique (Garner et al., 1988; Bruckenstein et al., 1990; Burgin et al., 1990; Kleiman et al., 1990). Considérant la distance entre le corps cellulaire et les régions distales des dendrites, la traduction d'ARNm pré-localisés permet une réponse beaucoup plus rapide que ce qui serait permis par transport protéique.

3) Production localisée d'une concentration élevée de protéine

En permettant l'expression ponctuelle d'une multitude de copies d'une protéine d'intérêt, le phénomène de localisation de l'ARNm permet la génération d'une concentration protéique très élevée, difficilement atteignable par le transport individuel des protéines. La spécification des structures de la tête chez la drosophile dépend de la localisation et de l'ancrage de l'ARNm bicoïd (*bcd*) au

niveau du pôle antérieur de l'ovocyte (Berleth et al., 1988). La forte concentration de protéine Bicoïd générée par traduction de ces ARNm permet d'activer la transcription de gènes impliqués dans le développement des structures les plus antérieures de l'embryon. Une mauvaise localisation ou un mauvais ancrage de l'ARNm bicoïd au niveau du pôle antérieur entraînent une diminution de la concentration de protéine Bicoïd à l'extrémité antérieure de l'œuf et produit des embryons dépourvus de tête.

La génération d'une forte concentration protéique est également un phénomène crucial pour l'obtention d'un gradient protéique. La traduction localisée couplée à la diffusion passive des protéines dans la cellule permet, en effet, d'obtenir une distribution décroissante de la concentration protéique à partir du site de traduction.

4) Traduction concertée : modèle « opéron »

Le mécanisme de localisation de l'ARN permet un contrôle de l'expression génique similaire au système des opérons procaryotiques. Chez les procaryotes, les gènes impliqués dans un même processus ou une même voie métabolique sont physiquement liés, ce qui favorise leur expression et leur régulation communes. Le caractère multi-fonctionnel de la majorité des protéines eucaryotes s'accorde toutefois mal avec un tel système puisque l'activité d'une même protéine est souvent requise dans des processus indépendants. En fait, les gènes impliqués dans des mécanismes communs sont souvent dispersés dans le génome eucaryote (Kenmochi et al., 1998; Uechi et al., 2001; Yoshihama et al., 2002) et ne sont donc pas régulés co-transcriptionnellement. Le recrutement, en un complexe RNP, d'ARNm métaboliquement reliés permet leur régulation traductionnelle concertée. La formation de complexes RNP récapitule donc les avantages des opérons procaryotes (Keene et Tenenbaum, 2002). La présence de séquences de régulation situées dans les portions non traduites de l'ARNm (séquences USER) permettrait son recrutement dans différents complexes. Ainsi, les ARNm possédant des séquences USER similaires peuvent être recrutés dans les mêmes complexes RNP et ainsi être localisés et traduits de façon concertée (Keene, 2001). L'ARNm

L'ARNm d'une protéine impliquée dans plusieurs processus distincts arborerait plusieurs séquences USER permettant son recrutement dans différents RNP indépendamment régulés.

Processus impliquant une localisation d'ARNm

Les avantages de la localisation d'ARNm décrits précédemment sont à la base de nombreux processus cellulaires essentiels au développement et au fonctionnement des organismes les plus divers (Figure 1).

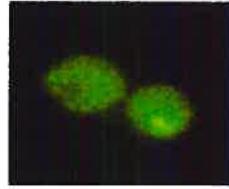
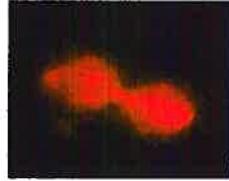
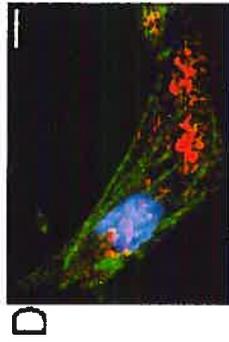
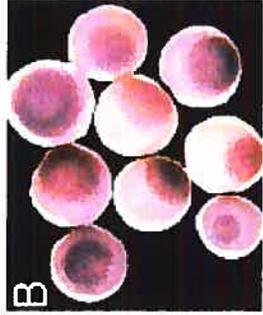
1) Division asymétrique

La division cellulaire asymétrique est un phénomène essentiel au développement embryonnaire puisqu'elle permet à une seule cellule de générer des lignées cellulaires ayant des destins différents. La localisation d'ARNm joue un rôle clé dans ce processus en permettant la ségrégation de déterminants dans une seule des deux cellules filles résultant d'une mitose cellulaire. Le changement de type sexuel chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* est basé sur le transport actif de l'ARNm Ash1 de la cellule mère en bourgeonnement vers la cellule fille (Chartrand et al., 2001 ; Bobola et al., 1996 ; Sil et Herskowitz, 1996). La production de la protéine Ash1p, à partir de l'ARNm Ash1, localisé bloque le processus de changement de type sexuel chez la cellule fille. Inversement, l'absence d'Ash1p dans la cellule mère permet l'accomplissement de ce changement de type sexuel. Les deux cellules ainsi produites possèdent donc des types sexuels opposés permettant leur conjugaison.

Un autre exemple est fourni lors de la division du précurseur neuroglioblastique chez la drosophile où la ségrégation de l'ARNm gmc dans une des deux cellules filles entraîne la spécification de la lignée gliale. La cellule fille n'ayant pas reçu l'ARNm gmc (glial cell missing) produit quant à elle la lignée neuronale (Akiyama-Oda et al., 1999; Bernardoni et al., 1999).

Figure 1 : Exemples d'ARN localisés dans différents organismes et types cellulaires. (A) Localisation de l'ARNm nanos au pôle postérieur de l'œuf de drosophile. (B) Localisation de l'ARNm fatVg au cortex végétal de l'ovocyte de xénope. (C) Localisation de l'ARNm Xpat au niveau du nuage mitochondrial de l'ovocyte de xénope. (D) Co-localisation de l'ARNm β -actine (rouge) avec la myosine (vert) au niveau du lamellipode de fibroblastes de poulet. (E) Localisation de l'ARNm Ash1 (rouge) et de la protéine Ash1 p (vert) dans la levure en division. (F) Localisation de l'ARNm β -actine (gauche) et de la protéine β -actine (droite) dans un cône de croissance neuronal.

Figure tirée de Kloc et al. (2002).



2) Motilité cellulaire

Le mécanisme de motilité cellulaire par lequel les cellules se déplacent sur une matrice extracellulaire est également basé sur la localisation d'ARNm. Le transport actif de l'ARNm β -actine au niveau de la périphérie des fibroblastes embryonnaires de poulet permet une forte production d'actine, essentielle à la polymérisation des microfilaments impliqués dans le mouvement de la membrane cellulaire (Lawrence and Singer, 1986). Le transport d'ARNm est donc essentiel à la migration de ces cellules (Kislauskis et al., 1994). La localisation de l'ARNm de l'actine est également observée dans les dendrites des neurones en croissance en réponse à un stimulus chimioattractant (Bassell et al., 1998; Zhang et al., 1999). Cette localisation serait impliquée dans la croissance dirigée des dendrites. Des expériences sur des cellules endothéliales en culture ont permis d'observer un recrutement actif d'ARNm au niveau de points d'adhésion focaux sous tension (Chicurel et al., 1998). Le transport d'ARNm serait donc non seulement important pour la motilité cellulaire, mais également pour l'immobilisation des cellules via l'établissement et la consolidation des sites d'attachement à la matrice extracellulaire.

3) Établissement des axes embryonnaires

L'établissement des axes embryonnaires au cours du développement chez la drosophile nécessite la localisation de plusieurs ARNm ainsi qu'un contrôle spatio-temporel étroit de leur traduction. Durant l'ovogenèse de la drosophile, une cellule du cyste parmi les 16 initialement présentes se développe en ovocyte alors que les 15 autres assument le rôle de cellules nourricières (Lin et Spradling, 1995). Ces cellules nourricières, étant transcriptionnellement actives, synthétisent des ARNm qui sont ensuite transportés et localisés en des régions spécifiques de l'ovocyte (van Eeden et St Johnston, 1999). L'ARNm *bcd* est ainsi localisé au niveau du pôle antérieur du futur embryon tandis que l'ARNm encodant la protéine Oskar (*osk*) est transporté jusqu'au pôle postérieur de l'ovocyte. La traduction de l'ARNm *bcd* à un stade précis de l'embryogenèse permet la

génération d'un gradient protéique du morphogène Bicoïd responsable, entre autres, de l'activation des gènes lacunaires impliqués dans le développement des structures antérieures (Rivera-Pomar et al., 1996). La traduction de l'ARNm *osk* permet la spécification des structures de l'abdomen et est nécessaire à la formation des futures cellules germinales (Lehman et Nusslein-Volhard, 1986; Ephrussi et al., 1991; Kim-Ha et al., 1991). Une mauvaise localisation et/ou une régulation traductionnelle déficiente de ces ARNm résultent en une spécification aberrante des axes embryonnaires qui s'avère généralement fatale pour l'embryon. Au moins 6 ARNm sont ainsi localisés dans l'ovocyte de la drosophile avant sa fécondation. La spécification des axes embryonnaires chez plusieurs autres organismes dépend également d'une localisation d'ARNm; chez le xénope plus de 9 ARNm localisés ont ainsi été impliqués dans l'embryogenèse.

4) Plasticité synaptique

Définie comme la capacité d'une synapse à modifier sa structure physique et moléculaire en réponse à un stimulus externe, la plasticité synaptique serait impliquée dans les phénomènes d'apprentissage et de mémoire. L'utilisation d'inhibiteurs traductionnels a permis de démontrer l'importance de la synthèse protéique *de novo* dans le remodelage de la synapse (Bailey et al., 1996; Kang et al., 1996; Mayford et al., 1996, Nguyen et Lichtman, 1996; Schuman, 1999). Considérant le nombre élevé de synapses dans un neurone, un mécanisme de ciblage précis de ces protéines doit exister pour restreindre la modification synaptique à la synapse stimulée. Deux mécanismes pourraient permettre d'atteindre cette spécificité. La stimulation d'une synapse pourrait produire un marquage permettant le recrutement de protéines synthétisées dans le soma. Alternativement, une localisation d'ARNm dans les dendrites pourrait permettre une traduction localisée au niveau des synapses activées résultant en la production de protéines directement au site d'intérêt. La présence de polysomes et de nombreux ARNm dans les régions post-synaptiques appuie fortement l'hypothèse du transport dendritique d'ARNm et de la traduction locale dans la modification des synapses. Alors que certains ARNm semblent être constitutivement présents

dans les dendrites, d'autres seraient transcrits et transportés à la synapse en réponse à une stimulation, c'est le cas notamment pour l'ARNm Arc. Dans les deux cas, la traduction de ces ARNm est limitée à la synapse stimulée. Les ARNm activement localisés dans les dendrites encodent des protéines cytoplasmiques, cytosquelettiques et membranaires ayant des fonctions plus ou moins bien définies dans le remodelage de la synapse.

Mécanismes de localisation de l'ARN

La description des processus impliquant une localisation d'ARNm soulève la question du moyen par lequel est obtenue cette localisation. Quatre mécanismes généraux permettent de générer une localisation d'ARN. Plusieurs de ces mécanismes peuvent coopérer pour permettre la localisation d'un même ARN.

1) Diffusion et ancrage

Comme son nom l'indique, ce mécanisme est basé sur la diffusion passive de l'ARN dans le milieu cellulaire où sa rencontre aléatoire avec un récepteur spécifique permet sa localisation au niveau d'une région subcellulaire. Le mécanisme de diffusion et d'ancrage serait impliqué dans la localisation de l'ARNm maternel nanos dans l'ovocyte de la drosophile (Wang et al., 1994). L'absence de dépendance au cytosquelette ainsi que la modulation de sa localisation finale en fonction de la localisation de son récepteur (la protéine Oskar) font partie des évidences supportant le mécanisme de diffusion et d'ancrage pour expliquer la localisation de l'ARNm nanos au pôle postérieur de l'ovocyte (Ephrussi et Lehmann, 1992; Theurkauf et al., 1992). L'existence d'un flot cytoplasmique dans l'ovocyte permettrait de faciliter la diffusion de l'ARNm nanos vers le pôle postérieur et ainsi d'augmenter l'efficacité de sa localisation (Gutzeit, 1986). La localisation des ARNm cyclinB1 et Xbub3 au niveau du faisceau mitotique, observée durant l'embryogenèse chez le xénope, semble également être obtenue par un mécanisme de diffusion et d'ancrage (Groisman et al., 2000).

2) Stabilisation locale vs dégradation générale

Le mécanisme de la stabilisation locale par rapport à la dégradation générale des ARNm est souvent observé en conjonction avec d'autres mécanismes de localisation. Ce processus repose sur la présence en cis d'éléments d'instabilité et de protection généralement situés dans la région 3' non traduite (UTR) de l'ARNm. Selon sa localisation dans la cellule, le transcrite est stabilisé ou rapidement dégradé suite à la liaison de différents facteurs sur ces éléments cis. Ultimement, l'ARNm est retrouvé uniquement dans la région contenant les facteurs de stabilisation. L'ARNm hsp83 chez la drosophile semble être localisé par ce mécanisme puisqu'une diminution drastique de sa concentration est observée dans tout l'ovocyte, hormis au niveau du pôle postérieur (Bashirullah et al., 1999). Les protéines du plasme polaire agiraient comme facteurs de stabilisation dans cette localisation d'ARN.

3) Synthèse localisée / exportation nucléaire vectorielle

La synthèse d'ARNm par une sous-population nucléaire constitue un autre moyen de produire une localisation. Ce mécanisme est bien illustré chez la drosophile par l'expression des gènes de segmentation (de la règle de polarité et lacunaires). La transcription de ces gènes s'effectue au stade de développement syncytium où l'ovocyte n'est encore qu'une seule grosse cellule contenant de nombreux noyaux localisés en périphérie. Puisque aucune membrane ne sépare encore les noyaux les uns des autres, la transcription des gènes de segmentation par différents sous-groupes de noyaux permet la localisation de transcrits à l'intérieur du syncytium. Similairement, au cours de l'innervation des fibres musculaires, la localisation de l'ARNm encodant la sous-unités δ du récepteur cholinergique est induite par une transcription limitée aux noyaux localisés à proximité de la jonction synaptique (Brenner et al., 1990; Simon et al., 1992). La synthèse localisée est quelquefois couplée à un mécanisme d'exportation nucléaire vectoriel par lequel l'ARNm transcrite est exporté préférentiellement d'un seul côté du noyau. Durant les stades précoces du développement de la drosophile, l'ARNm

gurken (grk), le seul ARNm transcrit dans le noyau de l'ovocyte, est majoritairement exporté par le côté apical du noyau (Neuman-Silberberg et Schupbach, 1993; Saunders et Cohen, 1999). Cette localisation vectorielle de l'ARNm grk s'avère essentielle pour la spécification de l'axe dorso-ventral de l'embryon.

4) Transport actif

Le mécanisme de localisation d'ARNm le plus utilisé demeure cependant celui du transport actif via le cytosquelette. Ce mécanisme implique un couplage entre l'ARNm, arborant des éléments de reconnaissance en cis, et une machinerie de transport, composée de nombreux facteurs protéiques en trans impliqués dans des interactions directes ou indirectes avec l'ARN. L'assemblage de ces facteurs entraîne la formation de gros complexes RNP contenant plusieurs copies de l'ARNm à localiser. En s'associant à différents moteurs moléculaires, ces RNP sont ensuite transportés dans la cellule. Deux réseaux cytosquelettiques sont utilisés pour effectuer ce transport. Les microfilaments d'actine sont généralement mis à profit pour permettre le transport d'ARN sur de courtes distances, tandis que les microtubules servent d'avantage lors du transport sur de longues distances. Ainsi, chez la levure, le transport de l'ARNm Ash1 à l'extrémité du bourgeon mitotique s'effectue grâce au réseau de microfilaments (Chartrand et al., 2001). Le réseau d'actine est également utilisé lors de la division du neuroblaste chez la drosophile pour le transport de l'ARNm prospero (pros) au pôle basal des cellules en division (Broadus et Dol, 1997; Broadus et al., 1998; Ikeshima-Kataoka et al., 1997; Shen et al., 1998). Tandis que la localisation de l'ARNm β -actine au niveau du lamellipode des fibroblastes en migration se fait grâce aux microfilaments, le réseau de microtubules permet la localisation de ce même ARNm dans les régions distales des neurones (Zhang et al., 2001a; Hill et Gunning, 1993; Kislauskis et al., 1993). Cet exemple reflète bien la spécialisation de chaque réseau cytosquelettique dans la localisation d'ARN. Une coopération entre les deux réseaux est également observée dans la localisation de certains transcrits. Ainsi alors que le transport de l'ARNm Vgl dans l'ovocyte de xénope dépend des

microtubules, son ancrage au pôle végétal se fait grâce aux microfilaments d'actine (Yisraeli et al., 1990; Kloc et Etkin, 1995).

Le premier exemple d'un transport actif d'ARNm a été identifié dans les oligodendrocytes pour la localisation de l'ARNm MBP (Ainger et al., 1993). L'injection d'ARNm couplés à des fluorophores dans des oligodendrocytes murins en culture a permis d'observer la formation de particules au niveau du corps cellulaire. La migration des ces particules vers les prolongements cellulaires, à une vitesse d'environ 12 $\mu\text{m}/\text{min}$, nécessite la présence d'un réseau de microtubules intacte. En effet, un traitement induisant une dépolymérisation des microtubules entraîne une perte de localisation de l'ARNm MBP (Carson et al., 1997). Des expériences de perte de fonction ont subséquemment permis de démontrer le rôle du moteur moléculaire kinésine I dans la localisation de l'ARNm MBP.

Le transport actif est également impliqué dans le processus d'ovogenèse chez la drosophile où il permet la localisation dans l'ovocyte des nombreux ARNm maternels originaires des cellules nourricières. Ce mécanisme permet, notamment, la localisation des ARNm *bcd* et *osk* impliqués dans l'établissement des axes embryonnaires.

Composantes de la localisation

Le phénomène de localisation d'ARN nécessite la participation de nombreuses protéines et co-facteurs dont l'ordre d'interaction et l'activité doivent être précisément orchestrés afin de produire une localisation d'ARN efficace. Deux éléments principaux entrent en jeu pour diriger efficacement cette localisation : les éléments cis et les facteurs trans.

1) Éléments cis

Généralement situés dans la portion 3'UTR des ARNm à localiser, les éléments cis contiennent toute l'information nécessaire à la localisation du

transcrit dans la cellule. L'analyse des différents éléments de localisation cis identifiés dans de nombreux ARNm localisés n'a pas permis d'identifier de séquences consensus impliquées dans ce phénomène. L'information de localisation n'est principalement pas fournie par la séquence linéaire des nucléotides, mais plutôt par la formation de structures secondaires et tertiaires dans l'ARN. La grande flexibilité de la molécule d'ARN favorise effectivement son repliement en structures tridimensionnelles plus ou moins complexes, notamment en tiges-boucles. La présence en 3'UTR de la majorité des éléments de localisation s'expliquerait en partie par la nécessité de former des tige-boucles stables qui, si elles étaient situées en 5'UTR ou dans la région codante, pourraient affecter la traduction des ARNm.

La structure de la région 3'UTR de l'ARNm *bcd* est parmi les mieux définies (Macdonald, 1990; Seeger et Kaufman., 1990). L'élément BLE (élément de localisation de bicoïd), nécessaire à la localisation du transcrit au niveau du pôle antérieur de l'ovocyte de drosophile, a pu être précisément circonscrit à une région contenant une tige-boucle. La destruction de la structure de cette région entraîne une perte de la localisation du transcrit, toutefois l'introduction de mutations complémentaires préservant la structure de la tige-boucle mais modifiant la séquence primaire n'affecte pas sa localisation (Macdonald et Ken, 1998). En plus du motif BLE, d'autres motifs structuraux présents dans le 3'UTR de l'ARNm *bcd* permettent la liaison du facteur Staufen, nécessaire à l'ancrage final du transcrit *bcd* au pôle antérieur. Les exemples précédents démontrent clairement l'importance de la structure par rapport à la séquence primaire pour la fonctionnalité des éléments cis. Toutefois, la séquence primaire peut jouer un rôle dans certains cas comme le démontrent des expériences sur l'ARNm K10 chez la drosophile (Serano et al., 1995). Des mutations de la séquence primaire, qui néanmoins permettent de conserver la structure en tige-boucle prédite dans le 3'UTR de cet ARN, empêchent la localisation efficace du transcrit.

Les informations de localisation sont rarement contenues dans une séquence ou structure unique. Elles sont généralement composées de plusieurs sous-éléments présentant une certaine redondance. Ainsi, bien que chaque sous-

élément soit en mesure de promouvoir une faible localisation, la présence combinée de tous les sous-éléments est nécessaire pour permettre une localisation maximale. Ce phénomène est bien illustré par la localisation de l'ARNm Vg1 chez le xénope au cours du développement. Une région de 360 nucléotides située en 3'UTR est suffisante et nécessaire à la localisation du transcrit Vg1. Toutefois, des expériences de délétion n'ont pas permis d'identifier de sous-éléments absolument nécessaires à la localisation. D'autres analyses suggèrent un modèle dans lequel la coopération entre 4 sous-éléments redondants permettrait une localisation efficace du transcrit (Mowry et Melton, 1992; Gautreau et al., 1997; Mowry et Cote, 1999; Yaniv et Ysraeli, 2001; Deshler et al., 1998).

Les éléments de localisation cis peuvent être divisés en deux catégories, soit les éléments généraux, permettant le recrutement de la machinerie de localisation, et les éléments spécifiques, qui permettent leur ciblage vers une région subcellulaire précise. La région 3'UTR de l'ARNm MBP contient un élément permettant son transport vers les prolongements de l'oligodendrocyte et un autre élément pour cibler spécifiquement cet ARN au compartiment de myéline (Ainger et al., 1997). Un autre exemple est fourni par le transport de l'ARNm Xcat2 au cours de l'ovogenèse chez le xénope. La région 3'UTR de cet ARNm contient l'élément général de localisation MCLE (élément de localisation au nuage mitochondrial) qui permet son transport vers une région contenant les principaux facteurs de localisation (nuage mitochondrial) (Zhou et King, 1996). La présence de l'élément GGLE (élément de localisation aux granules germinales) permet ensuite la localisation au niveau du plasme polaire. Il est important de noter que la présence des deux éléments s'avère essentielle à la localisation finale du transcrit; l'élément MCLE est requis pour obtenir la localisation grossière raffinée par l'élément GGLE (Kloc et al., 2001; Kloc et al., 2002; King et al., 1999).

2) Facteurs trans

Les éléments cis présents dans les ARNm à localiser permettent le recrutement d'une batterie de protéines dont l'association produit les complexes RNP. Ces facteurs sont essentiels à la régulation des différentes étapes de la

localisation du transcrit (transport, ancrage et contrôle de la traduction). De nombreux moteurs protéiques jouent également un rôle prépondérant dans le phénomène de transport actif et d'ancrage et sont fréquemment retrouvés en association avec les complexes RNP.

a. Liaison directe à l'ARN

La reconnaissance et la liaison des éléments cis par des protéines ayant la capacité de lier directement l'ARN constitue l'étape première et essentielle à la formation des complexes RNP. Trois classes principales de domaine de liaison à l'ARN sont retrouvées dans les facteurs trans liant l'ARN, soit les domaines RRM (RNA Recognition Motif), KH (K homology) et dsRBD (domaine de liaison à l'ARN double-brin) (Figure 2). En plus de ces trois principales classes de domaines d'autres petites régions sont également en mesure de lier l'ARN, dont les motifs ARM (Arginine-rich motif) et RGG (Kiledjan et Dreyfuss, 1992; Burd et Dreyfuss, 1994; Weiss et Narayana, 1998). Plusieurs copies d'un même domaine ainsi que des combinaisons de différents domaines sont souvent retrouvés dans les facteurs trans.

i. Domaine RRM

Le domaine RRM s'étend sur environ 90 à 100 acides aminés et est caractérisé par la présence de deux courtes séquences conservées (RNP1 et RNP2) et de plusieurs acides aminés hydrophobes (Swanson et al., 1987; Dreyfuss et al., 1988; Kenan et al., 1991). Ce domaine adopte une structure secondaire $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ où les quatre brins β forment un feuillet antiparallèle s'appuyant sur les 2 hélices α positionnées de manière perpendiculaire (Figure 2A) (Nagai et al., 1990; Hoffman et al., 1991; Wittekind et al., 1992). Les acides aminés les plus conservés sont localisés dans le feuillet β et constituent une surface générale d'interaction avec l'ARN simple-brin (Query et al., 1989; Görlach et al., 1992; Scherly et al., 1991). La spécificité de liaison caractéristique à chaque RRM serait médiée par les acides aminés moins conservés du domaine. Une coopération entre plusieurs domaines RRM d'une même protéine est souvent observée pour permettre une meilleure

spécificité et une liaison maximale à l'ARN (Burd et al., 1991; Caceres et Krainer, 1993; Burd et Dreyfuss, 1994). Ce domaine est fréquemment observé dans des protéines impliquées dans la modifications post-transcriptionnelle de l'ARN.

ii. Domaine KH

Le domaine KH a d'abord été identifié comme une séquence triplée dans la protéine hnRNP K (Siomi et al., 1993a; Gibson et al., 1993). Ce domaine a par la suite été retrouvé dans d'autres protéines, notamment dans la protéine Nova (Buckanovich et al., 1993), dans la protéine Vigilin (Castiglione et al., 1995) et dans la protéine FMRP (Siomi et al., 1993b). Mesurant entre 65 et 70 acides aminés, le domaine KH présente une structure secondaire $\beta\alpha\beta\beta\alpha$ (Figure 2B). Les trois brins β forment un feuillet antiparallèle qui s'appuie sur les trois hélices α . L'interaction avec l'ARN simple brin serait médiée par un acide aminé semi-conservatif chargé positivement. Aucune spécificité de séquence dans l'ARN lié n'est observée *in vitro* (Musco et al., 1996).

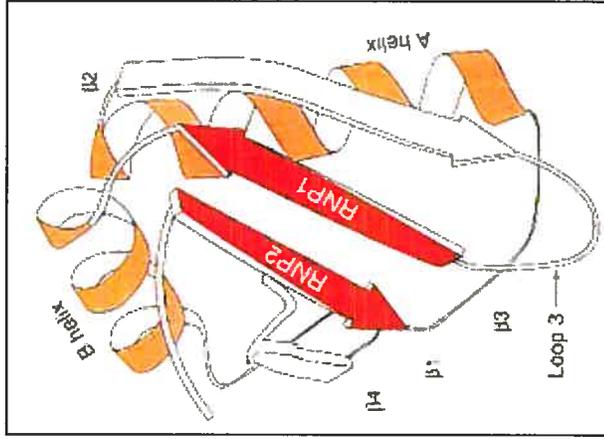
iii. Domaine dsRBD

Contrairement aux deux autres domaines, décrits précédemment, qui interagissent avec de l'ARN simple brin, le dsRBD se lie à des structures d'ARN bicaténaires (db). Ce type de domaine se retrouve dans une variété de protéines impliquées dans les phénomènes de modification, de maturation et de localisation de l'ARN, dont les protéines PKR, Staufen, RNaseIII, Tar RNA-binding protein et Xlrpba. Mesurant entre 65 et 70 acides aminés, ce domaine est riche en résidus basiques et hydrophobes. Topologiquement, ce domaine est constitué d'un motif $\alpha\beta\beta\beta\alpha$ où, comme pour les autres motifs liant l'ARN, le feuillet antiparallèle composé des trois brins β s'appuie sur les hélices α (Figure 2C) (Bycroft et al., 1995; Kharrat et al., 1995; Nanduri et al., 1998; Ramos et al., 2000). Tandis que les résidus hydrophobes sont essentiels pour maintenir la structure du dsRBD, les résidus basiques de trois régions du domaine sont impliqués dans l'interaction avec l'ARNdb. L'hélice α N-terminale serait impliquée dans des interactions avec le sillon majeur (Ryter et al., 1998) ou avec une boucle de l'ARN (Ramos et al.,

Figure 2 : Domaines majeurs de liaison à l'ARN

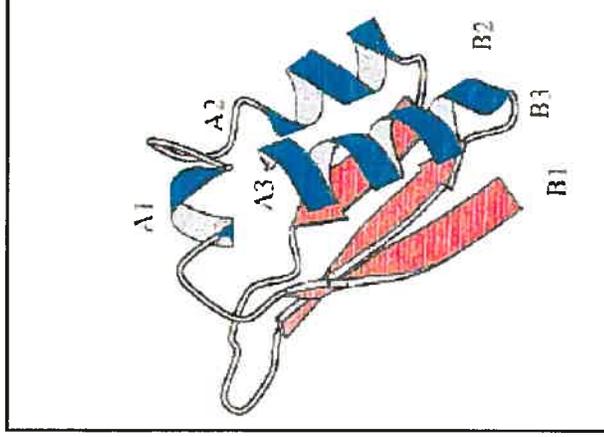
- A) Domaine RRM de la protéine U1 small nuclear ribonucleoprotein A. Figure tirée de Nagai et al. (1990).
- B) Domaine KH de la protéine Vigiline. Figure tirée de Adinolfi et al. (1999).
- C) Domaine dsRBD de la protéine Staufén. Figure tirée de Bycroft et al. (1995).

A



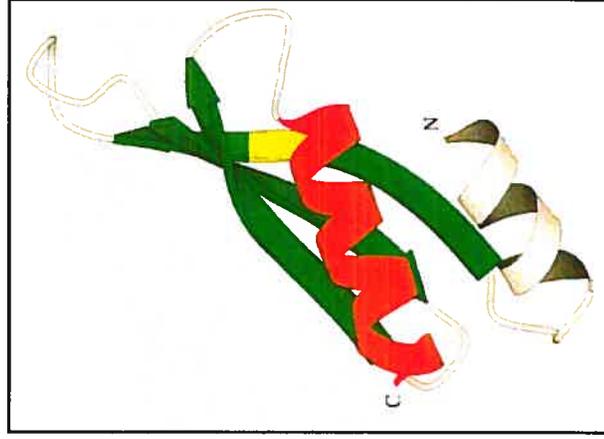
Domaine RRM

B



Domaine KH

C

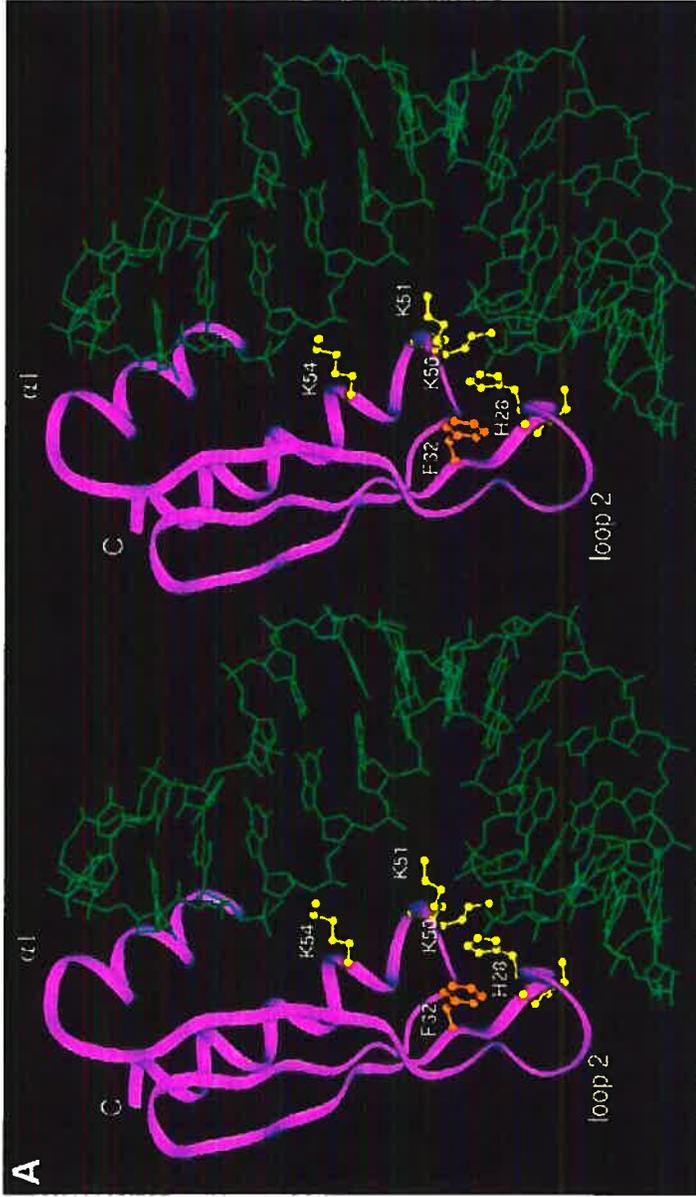


Domaine dsRBD

Figure 3 : Image stéréo montrant les détails de l'interaction entre le dsRBD3 de Staufen et l'ARNdb.

Les acides aminés critiques pour l'interaction avec l'ARNdb sont mis en évidence.

Figure tirée de Ramos et al. (2000).



2000). La boucle 2 reliant le premier et le deuxième brin β interagit avec des groupements 2'OH du sillon majeur de l'ARN; tandis que la boucle 4 située entre le troisième brin β et l'hélice α C-terminale interagit avec le squelette phosphodiester du sillon majeur adjacent (Figure 3). L'absence de spécificité du dsRBD *in vitro* peut s'expliquer par la nature de ces interactions qui ne visent pas principalement les bases azotées des nucléotides, spécifiques à chaque ARN, mais plutôt leurs groupements communs (Ramos et al., 2000). L'identité des ARN liés *in vivo* par les protéines contenant des dsRBD pourrait être déterminée par l'association avec d'autres partenaires protéiques.

On distingue deux types de dsRBD selon leur taux de conservation avec la séquence consensus. Le dsRBD de type A présente une séquence fortement conservée dans tout le domaine, tandis que le dsRBD de type B ne possède que le tiers C terminal conforme à la séquence consensus (St Johnston et al., 1992; Krovat et al., 1996). Cette divergence influence la capacité de liaison à l'ARN de ces deux types de dsRBD. Alors que les éléments nécessaires à la liaison efficace de l'ARNdb sont fortement conservés dans le dsRBD de type A, le dsRBD de type B ne possède que la boucle 4. Les dsRBD de type B ne sont donc pas en mesure de lier efficacement l'ARN (Ryter et Schultz, 1998).

b. Exemples de complexes RNP

Une description des facteurs trans impliqués dans les phénomènes de localisation les mieux caractérisés permettra d'illustrer de façon plus détaillée les mécanismes protéiques sous-jacents à une localisation d'ARNm efficace.

i. Localisation de l'ARNm oskar

La localisation et la traduction de l'ARNm osk au pôle postérieur de l'ovocyte de drosophile sont nécessaires à la spécification de la lignée germinale et des structures postérieures de l'embryon (Ephrussi et al., 1991; Kim-Ha et al., 1991). Transcrit dans les cellules nourricières, cet ARNm est d'abord localisé de façon uniforme dans l'œuf au début de l'ovogenèse. Une accumulation temporaire du transcrit au pôle antérieur est ensuite observée, l'ARNm osk est ensuite transporté vers le pôle postérieur de l'ovocyte où il est finalement ancré.

du transcrit au pôle antérieur est ensuite observée, l'ARNm *osk* est ensuite transporté vers le pôle postérieur de l'ovocyte où il est finalement ancré.

Plusieurs facteurs trans sont impliqués dans les mécanismes de transport et de contrôle traductionnel durant ces différentes étapes de localisation. Les protéines Bruno, Apontic et Bicaudal-C ont pu être impliquées directement dans le mécanisme de répression traductionnelle de l'ARNm *osk* (Figure 4A). Bruno, via ses domaines RRM, lie directement la région 3'UTR de l'ARNm *osk* au niveau de l'éléments cis BRE (Kim-Ha et al., 1995; Webster et al., 1997). Cette interaction permet la répression traductionnelle du transcrit *osk* par un mécanisme encore mal défini. La protéine Apontic semble également impliquée dans la répression traductionnelle de l'ARNm *osk* puisqu'une mutation de ce gène provoque des défauts dans la formation des structures antérieures, résultat de la présence ectopique d'Oskar à cet endroit (Gellon et al., 1997). Des expériences de double-hybride ont d'ailleurs permis de démontrer une interaction entre Bruno et Apontic (Lie et Macdonald, 1999). La perte d'expression de la protéine à domaine KH Bicaudal-C produit également un phénotype caractéristique de l'expression ectopique de la protéine Oskar (Saffman et al., 1998).

Le transport efficace de l'ARNm *osk* du pôle antérieur au pôle postérieur de l'ovocyte dépend de la protéine Staufén, une protéine contenant cinq domaines dsRBD. En l'absence de Staufén, l'ARNm *osk* demeure au pôle antérieur de l'ovocyte (Ferrandon et al., 1994; St Johnston et al., 1991). La protéine Staufén est également requise pour permettre l'activation traductionnelle de l'ARNm *osk* une fois localisé au pôle postérieur (Gunkel et al., 1998).

Un autre facteur trans liant l'ARNm *osk* est la protéine Orb. Les mutants *orb* présentent une perte de localisation et de traduction du transcrit *osk* au pôle postérieur (Chang et al., 1999). Le rôle exact de la protéine Orb dans le transport, l'ancrage ou l'activation traductionnelle de l'ARNm *osk* demeure toutefois mal défini. Les protéines Aubergine, p68 et p50 sont d'autres facteurs trans également impliqués dans la localisation et/ou le contrôle traductionnel de l'ARNm *osk* dans l'ovocyte (Wilson et al., 1996; Gunkel et al., 1998). Les produits des gènes *PKA*, *cappuccino*, *spire*, *par-1*, *chickadee* et *tropomyosin II* sont impliqués de façon

indirecte dans la localisation du transcrit *osk* de part leur effet sur le réseau de microtubules (Lasko, 1999). En effet, ces gènes sont nécessaires à l'intégrité du réseau de microtubules sur lequel la kinésine KHC transporte le complexe RNP contenant le transcrit *osk* du pôle antérieur au pôle postérieur (Palacios et St Johnston, 2002; Brendza et al., 2000).

ii. Localisation de l'ARNm *Ash1*

Le transport de l'ARNm *Ash1* chez la levure de la cellule mère au bourgeon mitotique est un phénomène essentiel à la conservation du type sexuel de la cellule fille. Un criblage génétique a permis l'identification de cinq gènes, baptisés *SHE1* à *SHE5*, dont l'expression est nécessaire au processus de localisation de l'ARNm *Ash1* (Long et al., 1997; Bertrand et al. 1998). Le moteur moléculaire Myo4p a été identifié comme étant le produit du gène *SHE1* (Jansen et al., 1996). L'implication de ce moteur moléculaire suggère que le transport de l'ARNm *Ash1* s'effectue sur le réseau d'actine plutôt que sur le réseau de microtubules. L'utilisation de drogues induisant une dépolymérisation spécifique des microfilaments, ainsi que l'analyse de différentes mutations affectant le réseau d'actine, ont permis de confirmer que le transport du transcrit *Ash1* s'effectue sur des câbles d'actine (Takizawa et al., 1997). Le complexe RNP *Ash1* contient également les protéines She2p et She3p (produit des gènes *SHE2* et *SHE3*, respectivement). La protéine She2p lie directement les éléments cis présents dans la séquence codante et la région 3'UTR de l'ARNm *Ash1* (Long et al., 2000). Le rôle de ce facteur de liaison à l'ARN serait limité à celui d'adaptateur permettant la liaison de l'ARNm *Ash1* au moteur Myo4p. Cette interaction n'est toutefois pas directe et requiert la présence de la protéine She3p (Takizawa et Vale, 2000). En interagissant directement avec les protéines Myo4p et She2p, la protéine She3p permet de faire le pont entre le moteur et le complexe RNP (Figure 4B) (Bohl et al., 2000). Les protéines She4p et She5p ne sont pas retrouvées dans le complexe RNP *Ash1*; leur importance pour la localisation du transcrit proviendrait de leur rôle dans le mécanisme de polymérisation des filaments d'actine (Beach et Bloom, 2001). Certaines évidences suggèrent également que She5p pourrait être importante pour l'ancrage du RNP *Ash1* correctement localisé.

Figure 4 : Exemples de complexes RNP

A) RNP impliqué dans le contrôle traductionnel de l'ARNm *osk*. (Haut) La traduction de l'ARNm *osk* non localisée est réprimée par l'action des protéines Bruno (Bru), Apontic (Apt), p50 et Bicaudal-C (Bic-C). (Bas) La traduction de l'ARNm *osk* est activée par l'action des protéines p68, Aubergine (Aub) et Staufén (Stau).

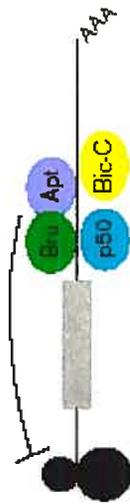
Figure tirée de Lipshitz et Smibert (2000).

B) RNP impliqué dans la localisation de l'ARNm *Ash1* chez la levure. She2p est représenté en rouge, She3p est représenté en noir et bleu et She1p est en gris.

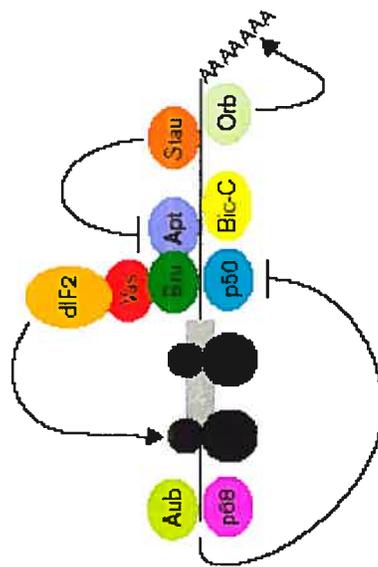
Figure tirée de Chartrand et al. (2001).

A

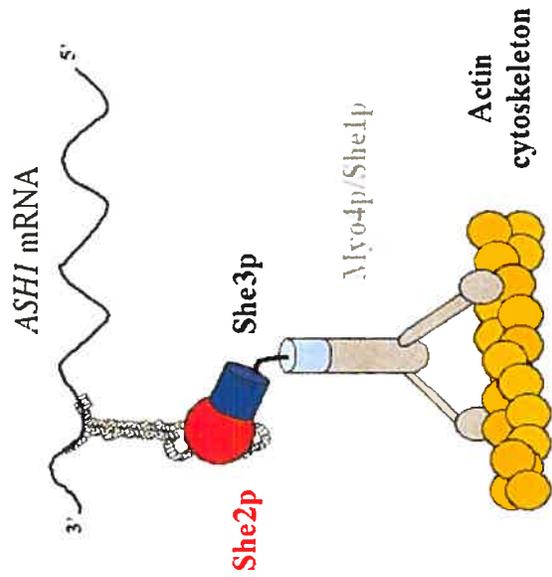
Non localisé



Localisé



B



PARTIE II : STAUFEN

Staufen chez la drosophile

1) Description générale

Le plan antéro-postérieur des différentes structures d'une drosophile est déterminé par l'expression régionalisée des gènes de segmentation (Ingham, 1988; Akam, 1987). La localisation des ARNm *bcd* et *osk* aux pôles antérieur et postérieur de l'ovocyte, respectivement, est nécessaire à l'activation des gènes de segmentation impliqués dans l'établissement des axes embryonnaires (Frigerio et al., 1986; St Johnston et al., 1989; Nüsslein-Volhard et al., 1987). Plusieurs gènes impliqués dans la localisation de ces transcrits dans l'ovocyte ont pu être identifiés par criblage génétique de mutants de drosophile produisant des embryons défectueux. Une perte d'activité du gène *staufen* produit des embryons dépourvus de cellules germinales, ayant une absence presque totale d'abdomen (structure postérieure) ainsi que des défauts de formation de la tête (St Johnston et al., 1991). Ce phénotype suggère que le produit du gène *staufen* est nécessaire à la localisation efficace des ARNm *osk* au pôle postérieur et *bcd* au pôle antérieur. En 1991, St Johnston et al. ont été les premiers à isoler et cloner le gène *staufen* dont le transcrit de 5.3 kb est fortement exprimé durant l'ovogenèse, l'embryogenèse et chez la mouche adulte. Le patron d'expression de la protéine *Staufen* dans les ovaires de drosophiles est en accord avec son rôle dans la spécification des axes embryonnaires. En effet, la protéine, qui s'accumule d'abord dans l'ovocyte présomptif (stades 3-4), est d'abord localisée temporairement au pôle antérieur de l'ovocyte (stade 8) puis transloquée au pôle postérieur (stades 8 à 10). Après la ponte de l'œuf, *Staufen* diffuse graduellement dans tout l'œuf. Une faible concentration de la protéine est également observée au pôle antérieur à cette étape. L'expression zygotique de *Staufen* dans le système nerveux est également détectée plus tard durant l'embryogenèse (St Johnston et al., 1991).

2) Structure

Le gène *staufen* encode une protéine de 1026 acides aminés ayant une masse moléculaire prévue de 110kDa. La masse moléculaire observée de *Staufen* se révèle toutefois supérieure à la prévision puisqu'une bande à 150 kDa, correspondant à *Staufen*, est détectée par buvardage de type Western (St Johnston et al., 1991). Cette bande est absente des ovaires de *Drosophila* ayant une mutation dans le gène *staufen*. *Staufen* est une protéine modulaire composée de cinq domaines de liaison à l'ARN dsRBD (St Johnston et al., 1992). Une comparaison des protéines *Staufen* de *Drosophila melanogaster*, *Drosophila virilis* et *Musca domestica* révèle une conservation de séquences plus importante entre les dsRBD équivalents des différents homologues qu'entre les dsRBD d'une même protéine (Micklem et al., 2000). Cette conservation évolutive indique l'importance de chaque dsRBD dans la fonction de *Staufen*.

Les deux types de dsRBD sont retrouvés dans la protéine *Staufen*. Les dsRBD 1,3 et 4 possèdent une séquence de type A tandis que le dsRBD5, ne possédant que le tier-C terminal de la séquence consensus des dsRBD, est du type B. Le dsRBD2 présente un cas particulier puisque sa séquence, bien que consensus, est séparée en deux par une insertion de 118 acides aminés contenant une région riche en proline. La capacité de liaison *in vitro* à l'ARNdb de chacun des dsRBD de *Staufen* analysée par buvardage de type North-Western n'est pas identique (Micklem et al., 2000). Le dsRBD3 est le domaine liant le plus fortement l'ARNdb. Les dsRBD 1 et 4 sont également en mesure de lier l'ARNdb, mais cette liaison est beaucoup plus faible que celle observée pour le dsRBD3. Aucune liaison à l'ARNdb n'est détectée pour les dsRBD2 et 5 *in vitro*. L'absence de liaison du dsRBD5 s'explique facilement par la nature même du domaine (type B) dans lequel les acides aminés nécessaires à l'interaction avec l'ARN ne sont pas conservés. L'absence de liaison du dsRBD2 serait due à la présence de l'insertion de 118 acides aminés. La modification de structure produite par cette insertion semble être responsable de la perte de liaison à l'ARNdb du dsRBD. En éliminant l'insertion, Micklem et al. (2000) ont toutefois démontré que le domaine est capable de lier l'ARNdb *in vitro* de façon similaire

au dsRBD3. La forte conservation évolutive de cette insertion chez les différentes espèces d'insectes mentionnées précédemment suggère qu'elle joue un rôle important dans le mécanisme d'action de Staufen.

Bien que la protéine Staufen contienne plusieurs dsRBD pouvant lier l'ARNdb *in vitro*, le principal domaine impliqué dans cette activité *in vivo* est le dsRBD3. En effet, les drosophiles exprimant une protéine Staufen mutée, dans laquelle l'activité de liaison à l'ARN du dsRBD3 est abolie, produisent des embryons ayant les mêmes défauts développementaux que ceux issus de souches n'exprimant pas Staufen (Ramos et al., 2000).

3) Fonctions

Grâce à sa capacité à lier l'ARNdb, la protéine Staufen joue un rôle clé dans de nombreux processus impliquant une localisation d'ARN. Une description détaillée des rôles et fonctions de Staufen dans ces différents processus permettra de mieux définir les caractéristiques de cette protéine (Figure 5).

a. Localisation de l'ARNm bicoïd

La localisation de l'ARNm bcd au pôle antérieur de l'ovocyte est un mécanisme qui s'effectue en plusieurs étapes. La première étape consiste en l'empaquetage du transcrit bcd en complexes RNP à l'intérieur des cellules nourricières suivi leur transport vers l'ovocyte. Dans l'ovocyte, un mécanisme de transport actif permet la localisation et l'ancrage des RNP au cortex antérieur. Ces premières étapes dépendent de l'activité des gènes *exuperentia* (*exu*) et *swallow* (*swa*). La protéine Exu, exprimée dans les cellules nourricières, est impliquée dans la localisation de l'ARNm bcd au niveau de structures cellulaires appelées corps éponges. Exu est également requis pour le transport subséquent du RNP bcd vers l'ovocyte. La protéine Swa est impliquée dans la localisation ovocytaire de l'ARNm bcd. Grâce à une association directe avec le moteur cytoplasmique Ddlc (dynein light chain-1) (Schnorrer et al., 2000), la protéine Swa permet le transport actif de l'ARNm bcd vers les extrémités négatives des microtubules situées au pôle antérieur de l'ovocyte.

La protéine Staufen est nécessaire à la fin de l'ovogenèse pour permettre l'ancrage cytoplasmique de l'ARNm *bcd* au pôle antérieur de l'œuf (Figure 5, D et E). Ainsi, malgré une localisation initialement correcte au niveau du cortex antérieur de l'ovocyte, une diffusion rapide du transcrit *bcd* est observée chez les embryons issus de mères n'exprimant pas Staufen (Figure 5F). La traduction subséquente de ces ARNm non ancrés produit un gradient antérieur beaucoup plus étendue de la protéine Bicoïd résultant en des structures antérieures défectives chez ces embryons (Ferrandon et al., 1994).

Le recrutement de Staufen au pôle antérieur de l'ovocyte dépend de la présence préalable de l'ARNm *bcd* à cet endroit. Conséquemment, les oeufs de drosophiles mutantes pour les gènes *exu* ou *swa* ne présentent pas d'accumulation de la protéine Staufen au pôle antérieur puisque l'ARNm *bcd* n'y est pas localisé. Cette interdépendance entre la liaison à l'ARNm et la localisation de Staufen est bien illustrée dans les ovocytes surexprimant l'ARNm *bcd* où l'augmentation de la quantité d'ARNm *bcd* retrouvée dans l'ovocyte se traduit par une augmentation équivalente de la quantité de Staufen localisée au pôle antérieur (Ferrandon et al., 1994).

Une région de 625 nucléotides dans le 3'UTR du transcrit *bcd* présente une structure secondaire complexe (Figure 6) contenant tous les éléments nécessaires aux différentes étapes de sa localisation (Macdonald, 1990; Macdonald et al., 1993). L'élément BLE permet l'accomplissement des étapes précoces de la localisation, mais n'est pas impliqué dans l'association avec la protéine Staufen et dans l'ancrage cytoplasmique du transcrit *bcd* au pôle antérieur de l'œuf. L'injection d'ARN dans des embryons précoces a permis d'identifier les régions du 3'UTR du transcrit *bcd* impliquées dans le recrutement de la protéine Staufen. La formation de particules, d'un diamètre allant jusqu'à 1 μm , est observée suite à l'injection d'un ARN correspondant à la région 3'UTR entière du transcrit *bcd* dans le cytoplasme postérieur de l'œuf. La formation de ces granules n'est pas observée lorsque cette expérience est effectuée avec des œufs de drosophiles n'exprimant pas Staufen, confirmant l'implication de Staufen dans ce phénomène. Comme la formation des ces particules est également observée dans les oeufs issus

Figure 5 : Rôles de Staufen dans la localisation des ARNm bicoid, oskar et prospero chez la drosophile.

(A–C) Staufen est requis pour la localisation postérieure de l'ARNm oskar. La protéine Staufen (**A**) localise au pôle postérieur de l'ovocyte avec l'ARNm oskar (**B**). (**C**) Dans les mutants n'exprimant pas Staufen, l'ARNm oskar demeure au pôle antérieur de l'ovocyte. (D et E) Staufen est requis pour l'ancrage de l'ARNm bicoid au pôle antérieur de l'œuf. La protéine Staufen (**D**) et l'ARNm bicoid (**E**) co-localisent au pôle antérieur de l'œuf dans les embryons sauvages. L'ARNm bicoid diffuse et forme un gradient dans les embryons issus de mères n'exprimant pas Staufen (**F**). (G–I) Staufen est requis pour la localisation basale de l'ARNm prospero au cours de la division asymétrique des neuroblastes. La protéine Staufen (vert) (**G**) co-localise au pôle basal de la cellule avec l'ARNm prospero (rouge) (**H**). (**I**) Dans les mutants Staufen, l'ARNm prospero (rouge) est mal localisé.

Figure tirée de St Johnston et al. (2001)

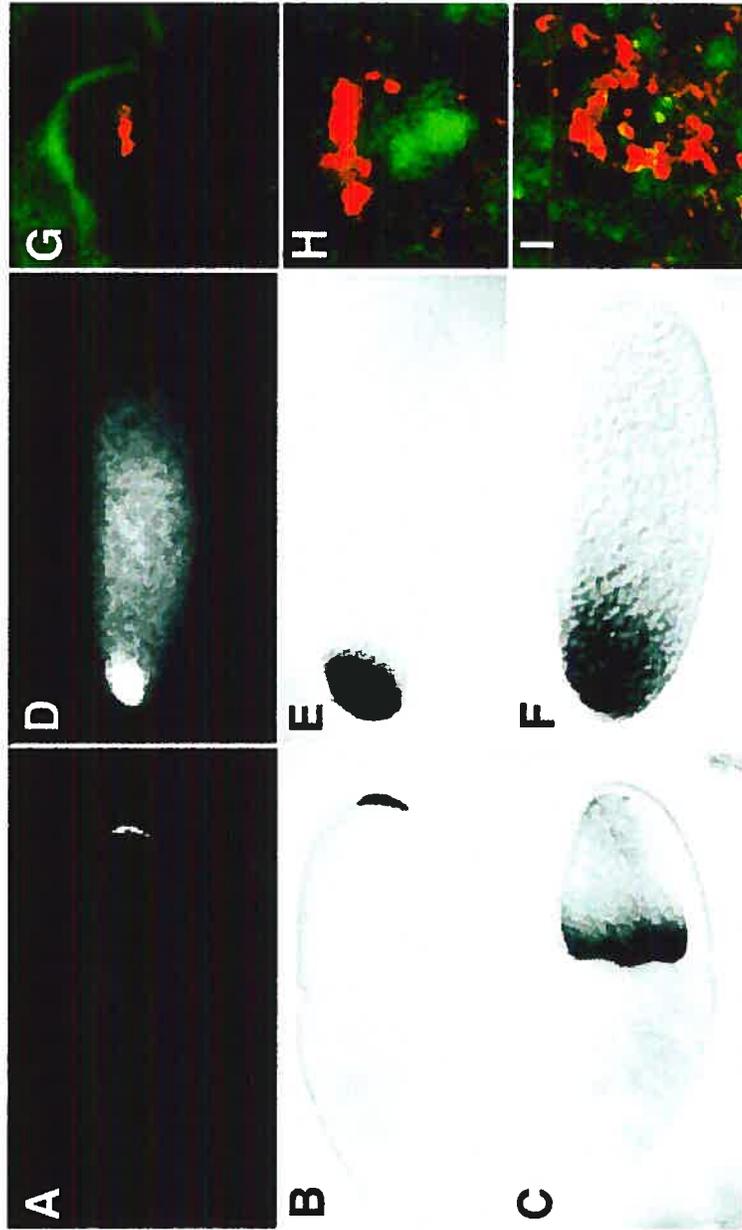
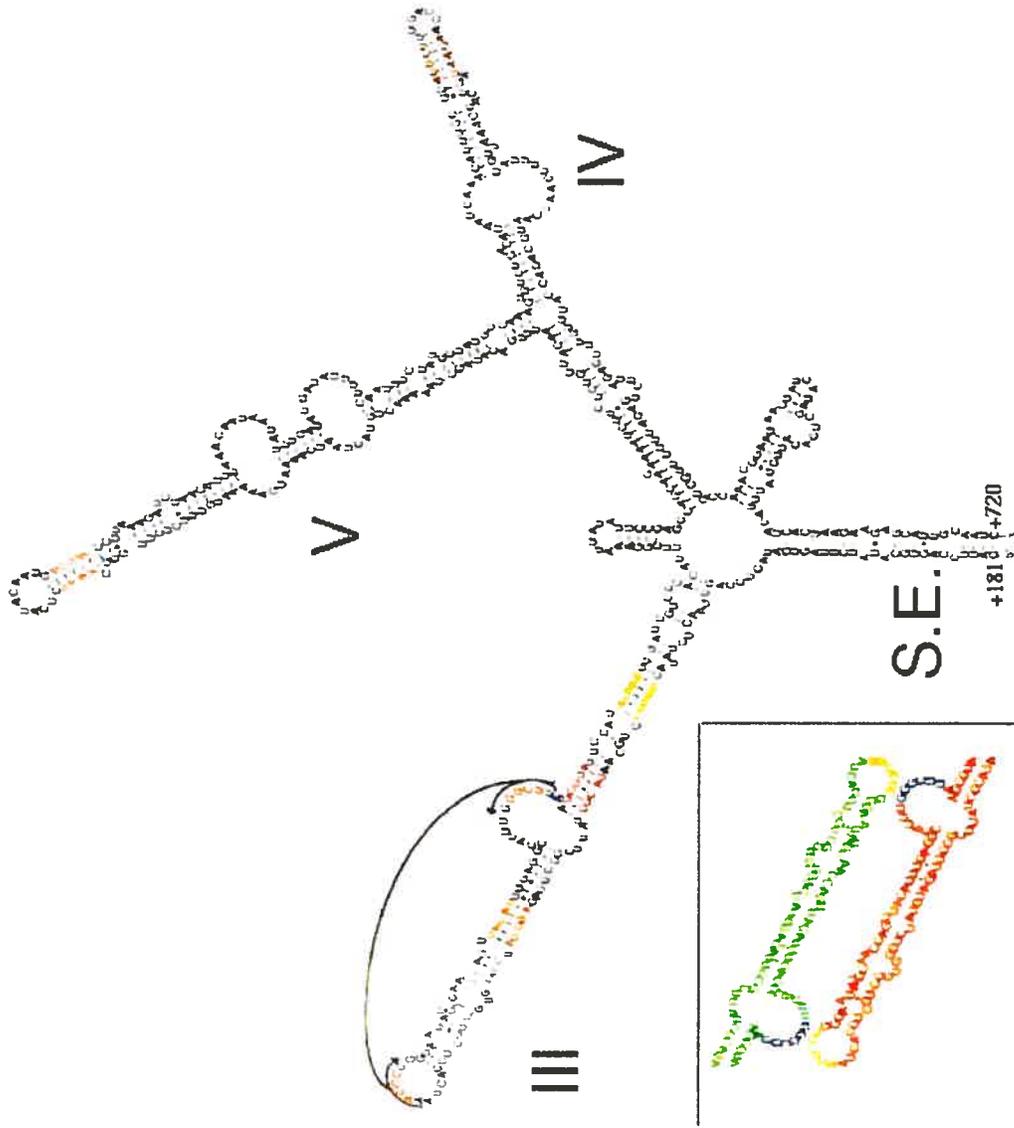


Figure 6 : Structure secondaire de la région 3'UTR de l'ARNm bicoïd (nucléotides 181-720).

Le site BLE est situé entre les nucléotides 453 et 505. Les sites de liaison de Staufen au niveau des bras III, IVb et Vb sont colorés en bleue. Les deux flèches interconnectées représentent les séquences complémentaires de l'hélice III permettant la dimérisation intermoléculaire de l'ARNm bicoïd. L'insert (coin inférieure gauche) montre un schéma de l'interaction de deux ARNm bicoïd via leur hélices III

Figure tirée de Ferrandon et al. (1997)



de mutants n'exprimant pas les gènes *exu* et *swa*, les étapes précoces du développement ne semblent pas requises pour cette l'association de Staufen à l'ARNm *bcd*. Toutefois, le transport actif de ces particules au pôle antérieur de l'ovocyte nécessite l'exposition préalable de l'ARNm *bcd* à un extrait cellulaire de cellules nourricières, contenant le facteur *Exu* (Cha et al., 2001). L'injection d'ARN ayant une séquence 3'UTR *bcd* mutée ou tronquée a permis l'identification des trois régions nécessaires à la formation des complexes Staufen-3'UTR *bcd*. Les régions s'étendant des nucléotides 211 à 360, 421 à 510 et 541 à 630 situés dans les tiges III, V et IV du 3'UTR *bcd*, respectivement, sont nécessaires au recrutement de Staufen (Ferrandon et al., 1994). La protéine Staufen reconnaît la structure secondaire de ces trois régions plutôt que leur séquence primaire puisque la mutation complémentaire des deux brins d'une même tige permet de conserver la capacité de liaison à Staufen (Ferrandon et al., 1997). L'oligomérisation de deux ou plusieurs molécules d'ARNm *bcd*, médiée par des interactions intermoléculaires entre deux boucles de la tige III, est également nécessaire à l'interaction de Staufen avec le 3'UTR *bcd* (Figure 6). Conséquemment, la formation de particules Staufen-3'UTR *bcd* n'a pas lieu lors de l'injection d'un ARN 3'UTR *bcd* muté dans une seule de ces boucles, mais est observée lors de la co-injection simultanée de deux ARN 3'UTR *bcd* complémentaires.

Le dispersement des régions de liaison à Staufen dans le 3'UTR de *bcd* suggère que plusieurs dsRBD puissent être impliqués dans cette interaction. La spécificité de reconnaissance de Staufen serait ainsi modulée par correspondance entre les structures tridimensionnelles adoptées par les dsRBD de Staufen et celles adoptées par le 3'UTR *bcd*. Alternativement, l'association à d'autres facteurs protéiques présents dans l'œuf de même que l'éventualité d'une oligomérisation de Staufen sont d'autres mécanismes susceptibles qui pourraient réguler son interaction avec l'ARNm *bcd*. Il est important de noter que, bien que les résultats précédents s'accordent avec un modèle dans lequel Staufen lie directement l'ARNm *bcd*, aucune expérience n'a encore permis de confirmer cette interaction *in vivo*.

Le réseau de microtubules semble requis pour la formation des particules Staufen-ARNm *bcd*, puisque la co-injection simultanée du 3'UTR *bcd* et d'une drogue induisant une dépolymérisation des microtubules (colcemide) empêche la formation des particules. L'association aux microtubules, probablement via le recrutement d'un moteur moléculaire, serait donc nécessaire pour stabiliser la formation des complexes Staufen-ARNm *bcd*.

b. Localisation de l'ARNm *oskar*

Le mécanisme de la localisation de l'ARNm *osk* au pôle postérieur ayant déjà été décrit précédemment, cette section décrira de façon plus détaillée l'implication de Staufen dans ce processus.

Plusieurs évidences indiquent que Staufen est impliqué dans le transport de l'ARNm *osk* du pôle antérieur au pôle postérieur de l'ovocyte. Premièrement, l'ARNm *osk* demeure associé au pôle antérieur des ovocytes issus de femelles n'exprimant pas la protéine Staufen (Figure 5C). Ensuite, la localisation de Staufen, au pôle antérieur puis au pôle postérieur de l'ovocyte, durant l'ovogenèse coïncide parfaitement avec celle du transcrit *osk* (Figure 5, A et B) (St Johnston et al., 1991). De plus, dans les ovocytes issus de femelles n'exprimant pas le transcrit *osk*, aucune localisation de Staufen n'est observée. Par contre, l'expression de quatre fois plus d'ARNm *osk* provoque la localisation de quatre fois plus de protéines Staufen au pôle postérieur (Ferrandon et al., 1994). Cette dernière observation indique que Staufen doit interagir avec l'ARNm *osk* pour être correctement localisé.

Au moins deux dsRBD de Staufen sont nécessaires à la localisation correcte de l'ARNm *osk* au pôle postérieur. Une perte de l'activité de liaison à l'ARNdb du dsRBD3 bloque cette localisation, probablement en empêchant la liaison de Staufen sur les éléments cis de l'ARNm *osk* (Ramos et al., 2000). Le dsRBD2 semble également jouer un rôle clé dans la localisation, puisqu'une délétion de son insertion de 118 acides aminés empêche également la localisation postérieure de l'ARNm *osk* (Micklethorp et al., 2000). Cette perte de localisation ne semble pas être le résultat d'une perte d'interaction entre Staufen et l'ARNm *osk* puisque la

protéine contenant le dsRBD2 tronqué se localise efficacement au pôle antérieur, un processus nécessitant sa liaison à l'ARNm *osk*. Un modèle intéressant suggère que le recrutement de Staufen sur l'ARNm *osk*, médié par la forte activité de liaison à l'ARNdb du dsRBD3, forcerait la liaison subséquente du dsRBD2 à l'ARN. Cette liaison provoquerait une réorganisation de la structure tri-dimensionnelle du domaine, résultant en l'exposition cytoplasmique de l'insertion qui pourrait alors recruter la machinerie de transport. Le dsRBD2 agirait donc comme senseur de l'état de liaison de Staufen à l'ARN.

Le transport postérieur du complexe Staufen-ARNm *osk* est dépendant de la présence de microtubules (Clark et al., 1997; Pokrywka et Stephenson, 1995) et impliquerait notamment la kinésine KHC (Brendza et al., 2000). Toutefois, aucune preuve à ce jour ne permet de confirmer une interaction directe entre Staufen et ce moteur moléculaire. Plusieurs évidences suggèrent que le réseau de microfilaments d'actine est impliqué dans l'ancrage final du complexe Staufen-ARNm *osk* au pôle postérieur de l'ovocyte. Les protéines Dmoésine et Tropomyosine, impliquées dans la polymérisation du réseau d'actine, sont nécessaires à l'ancrage du complexe au pôle postérieur (Erdelyi et al., 1995; Polesello et al., 2002). Une diffusion rapide du complexe est aussi observée suite à l'injection, dans l'ovocyte, de drogues induisant une dépolymérisation des filaments d'actine (Lantz et al., 1999).

La protéine Staufen est également impliquée dans le contrôle traductionnel du transcrit *osk* de deux façons distinctes : comme dérépresseur et comme activateur de la traduction. Ces deux fonctions impliquent des domaines différents de la protéine. Le répresseur Bruno empêche la traduction des ARNm *osk* non localisés en se liant à l'élément cis BRE situé en 3'UTR. La traduction d'un ARNm *osk* ne contenant pas d'éléments BRE (BRE⁻), donc n'étant pas réprimé par Bruno, n'est toutefois pas observée dans les ovocytes issus de femelles n'exprimant pas Staufen (Kim-Ha et al., 1995). L'expression des ARNm *osk* BRE⁻ est toutefois observée dans les ovocytes sauvages, indiquant que la protéine Staufen est requise pour l'activation traductionnelle. Le rôle dérepressif de Staufen permet la traduction des ARNm *osk* correctement localisés au pôle

postérieur. La présence du dsRBD5 semble nécessaire à cette activité puisque sa délétion inhibe la traduction des ARNm *osk*, bien qu'elle n'ait aucun effet sur la liaison de Staufen à l'ARNm *osk*, ni sur le transport subséquent du complexe Staufen-ARNm *osk* au pôle postérieur (Micklem et al., 2000). La perte du dsRBD5 n'affecte toutefois pas la traduction des ARNm *osk* BRE⁻ indiquant qu'il s'agit d'une activité distincte de celle d'activateur traductionnel.

c. Localisation de l'ARNm *prospero*

En plus de son rôle durant l'ovogenèse et l'embryogenèse précoce, la protéine Staufen est également impliquée dans la localisation asymétrique du transcrit *pros* au cours de la neurogenèse (Figure 5, G-I). Les divisions asymétriques des précurseurs neuroblastiques (NB) permettent la production de cellules GMC (cellule du ganglion mère) qui se diviseront à nouveau pour former ultimement deux neurones. La localisation asymétrique des déterminants spécifiant la lignée GMC dans le NB permet leur ségrégation subséquente dans la plus petite des deux cellules filles obtenues lors de la mitose. Le recrutement initial de ces déterminants au pôle apical du NB, durant l'interphase, est nécessaire à leur transport subséquent au pôle basal, durant la mitose. Les déterminants spécifiant la lignée GMC sont les protéines Numb et Pros, produit des gènes du même nom. Un mécanisme de transport protéique permet la localisation des protéines Numb et Pros au pôle basale du NB pour leur ségrégation dans la cellule GMC. Une localisation simultanée de l'ARNm *pros* au pôle basal est également observée. Ce mécanisme n'est toutefois pas essentiel puisque la ségrégation de la protéine Pros est suffisante à la détermination de la lignée GMC. La localisation de l'ARNm *pros* agirait donc comme mécanisme d'appoint de la localisation protéique de Pros.

Trois gènes sont impliqués dans la localisation du transcrit *pros* : *staufen*, *inscuteable* et *miranda*. Des essais d'injection de la région 3'UTR de l'ARNm *pros* dans des embryons exprimant une protéine Staufen-GFP ont permis d'observer la formation de particules contenant Staufen (Schuldt et al., 1998), suggérant une liaison directe entre Staufen et l'ARNm *pros*. La perte de localisation de l'ARNm *pros* dans des neuroblastes n'exprimant pas Staufen

(Figure 5I) suggère que la liaison de Staufen à l'ARNm pros via son 3'UTR est nécessaire à la localisation subséquente du transcrit (Li et al., 1997). La protéine Inscuteable (Insc), localisée à la membrane apicale du NB agirait comme plateforme d'assemblage, permettant l'échafaudage des complexes de transport avant leur transit au pôle basal. Une interaction directe entre les domaines C-terminaux de Staufen et d'Insc a pu être caractérisée *in vitro* (Li et al., 1997). Staufen permettrait donc le recrutement de l'ARNm pros au pôle apical grâce à son interaction avec la protéine Insc. La protéine Miranda (Mir) interagit également de façon directe avec les protéines Insc et Staufen (Shen et al., 1998; Schuldt et al., 1998). En recrutant simultanément les protéines Mir et Staufen, Insc permettrait l'assemblage de complexes Mir-Staufen-ARNm pros. L'absence d'accumulation basale de Staufen, dans des neuroblastes n'exprimant pas Mir, démontre que Miranda est responsable de ce transport (Schuldt et al., 1998). Des expériences de double-hybride et de liaison *in vitro* ont permis de démontrer que le dsRBD5 de Staufen était responsable de l'interaction avec Mir. Conséquemment, une délétion du dsRBD5 empêche la localisation de Staufen dans le NB (Schuldt et al., 1998).

Alors que le réseau de microtubules est impliqué dans la localisation d'ARNm médiée par Staufen dans l'ovocyte, le réseau d'actine est responsable du transport du complexe Miranda-Staufen-ARNm pros au pôle basal du NB (Shen et al., 1998).

d. Établissement de la mémoire à long terme

Récemment, Dubnau et al (2003) ont révélé un rôle potentiel de Staufen dans le phénomène de formation de la mémoire olfactive chez la mouche adulte. En utilisant des puces à ADN, les chercheurs ont pu démontrer que la transcription du gène *staufen* était induite lors de la formation de la mémoire à long terme. L'utilisation d'une souche de mutants thermo-sensibles de Staufen a permis de confirmer l'importance de Staufen *in vivo* dans le processus de mémorisation.

Staufen chez les mammifères

1) Description générale et structure

La recherche de protéines impliquées dans les mécanismes de localisation d'ARN chez les mammifères a permis d'identifier des homologues de la protéine Staufen chez diverses espèces, notamment la souris et l'humain (Wickham et al., 1999; Marion et al., 1999). Une comparaison de la séquence protéique des protéines Staufen de mammifères (mStaufen) et de drosophile (DmStaufen) révèle que la structure et la position relative des dsRBD est conservées entre les deux espèces, sauf pour le dsRBD1 et la région N-terminale qui sont absents de mStaufen (Figure 7A). Une comparaison de la région localisée entre les dsRBD4 et dsRBD5 de la protéine mStaufen avec une banque protéique a permis d'identifier un nouveau domaine qui n'est pas retrouvé chez DmStaufen. Dû à sa forte similarité avec le domaine de liaison aux microtubules de la protéine MAP1B (Zauner et al., 1992), ce nouveau domaine fut baptisé TBD (domaine de liaison à la tubuline). Des expériences *in vitro* ont permis de vérifier la capacité d'interaction du domaine TBD avec la tubuline.

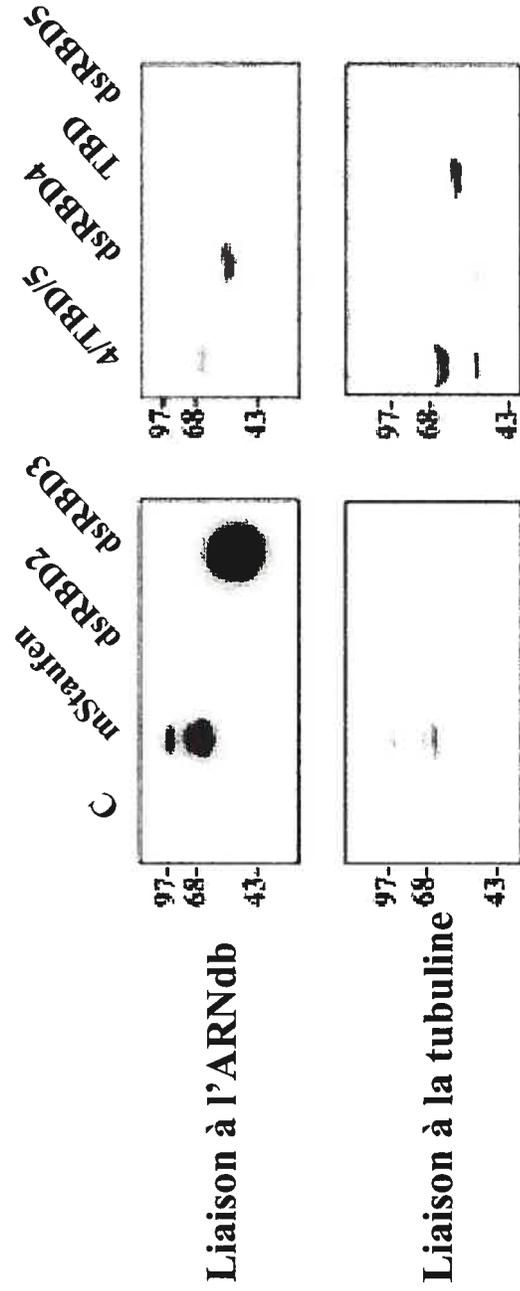
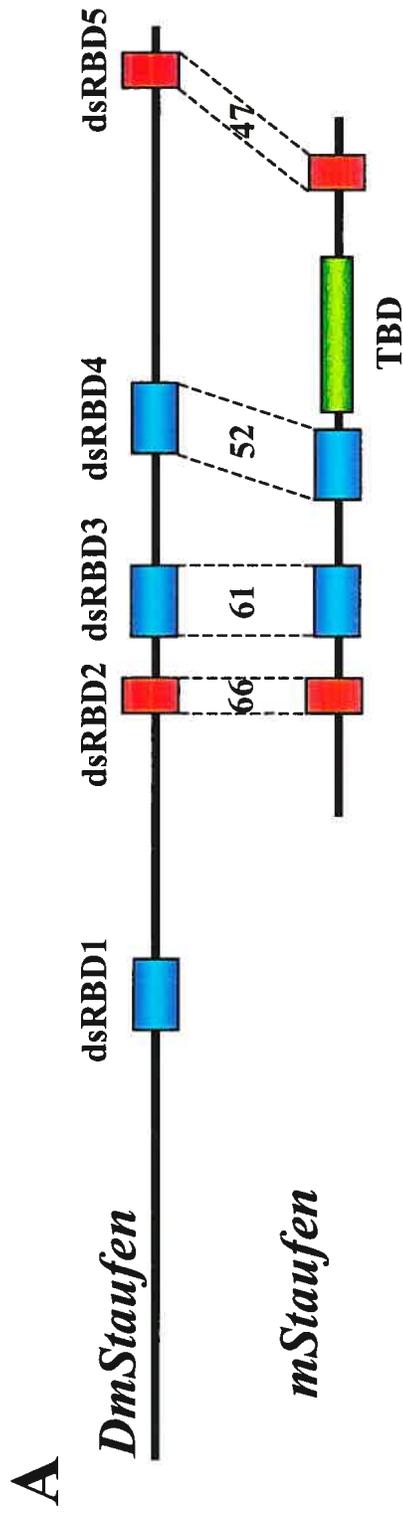
Comme pour la protéine de drosophile, mStaufen lie préférentiellement l'ARNdb, sans aucune spécificité de séquence *in vitro*. La capacité de liaison à l'ARNdb des différents dsRBD de la protéine mStaufen corrèle parfaitement avec celle observée pour les dsRBD de la protéine DmStaufen. Ainsi, les dsRBD 2 et dsRBD5 ne sont pas en mesure de lier l'ARNdb *in vitro*. Par contre, l'ARNdb est fortement lié par le dsRBD 3 et plus faiblement par le dsRBD4 (Figure 7B).

Un buvardage de type Western sur des extraits de cellules de mammifères (HEK, HeLa) permet d'observer deux isoformes majoritaires du gène staufen, ayant des masses moléculaires respectives de 55 et 63 kDa. Alors que les exons encodant l'isoforme court sont connus, l'épissage alternatif produisant l'isoforme de 63kDa n'a pas encore été caractérisé. Des hybridations de type Northern indiquent que le gène staufen est exprimé dans la majorité des tissus de mammifères, suggérant un rôle ubiquiste pour la protéine mStaufen.

Figure 7 : Structure et caractéristiques de la protéine mStaufen

A) Comparaison structurale des protéines Staufen de drosophile et de mammifère. Les boîtes bleues et rouges représentent les dsRBDs de type A et B, respectivement. La boîte verte représente la région similaire au domaine de liaison au microtubule de la protéine MAP1B (domaine TBD). Le pourcentage d'identité protéique entre les domaines de drosophile et de mammifère est indiqué. B) Capacité d'interaction avec l'ARNdb et avec la tubuline des différents domaines de mStaufen. Essai de liaison à l'ARN par North-Western (sonde : 3'UTR de bicoïd). Essai de liaison à la tubuline par Far-Western (sonde : tubuline)

Figure modifiée de Wickham et al. (1999)



La localisation subcellulaire de mStaufen est caractérisée par une distribution tubulo-vésiculaire concentrée autour du noyau et irradiant vers la périphérie. Cette localisation est conservée suite à un traitement au détergent, indiquant que mStaufen est fortement lié à des structures cytosquelettiques. L'utilisation d'anticorps dirigés contre des protéines spécifiques aux différents compartiments subcellulaires a permis d'observer une co-localisation entre la protéine mStaufen et les vésicules du réticulum endoplasmique rugueux (RER) (Figure 8A). Cette localisation sur le RER pourrait provenir de la capacité d'interaction de mStaufen avec les ribosomes. Cette interaction a d'abord été caractérisée par des expériences de sédimentation sur gradient de sucrose, dans lesquelles mStaufen et la protéine ribosomique L7a sont retrouvés dans les mêmes fractions (Figure 8B) (Luo et al., 2002). Une co-immunoprécipitation réciproque des ribosomes et de mStaufen est également observée. La protéine mStaufen semble être en mesure de se lier aux deux sous-unités ribosomiques (40S et 60S), puisqu'elle co-sédimente avec chacune d'elles lors de leur séparation sur gradient de saccharose. Deux régions de la protéine mStaufen, soit le dsRBD3 et la région dsRBD4-TBD, semblent être en mesure d'interagir indépendamment avec le ribosome. Alors que l'activité de liaison à l'ARN du dsRBD3 semble nécessaire à son interaction avec le ribosome, des interactions protéines-protéines seraient responsables de l'interaction du dsRBD4-TBD. La perte d'une seule de ces deux régions n'entraîne pas une dissociation complète de mStaufen avec le ribosome; toutefois, leur délétion simultanée abolit totalement cette interaction (Luo et al., 2002). L'interaction simultanée de mStaufen avec les ribosomes et l'ARNm pourrait permettre de réguler l'activité traductionnelle des ARNm durant leur transport. Bien que le rôle de mStaufen dans la traduction demeure spéculatif, il est appuyé par le rôle de dmStaufen dans la traduction des ARNm (Micklem et al., 2000).

2) mStaufen dans les neurones

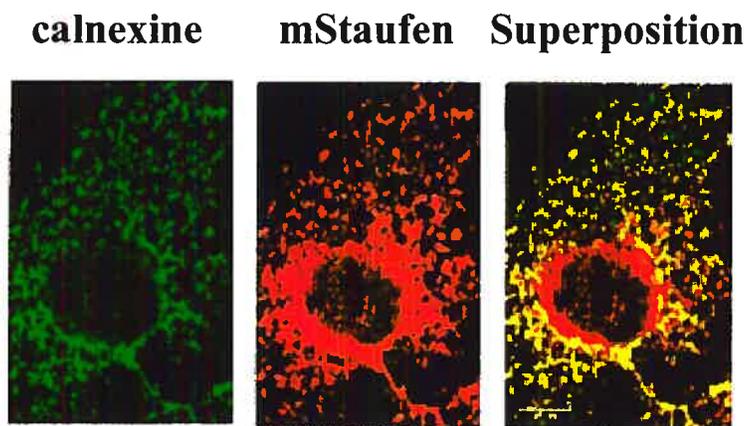
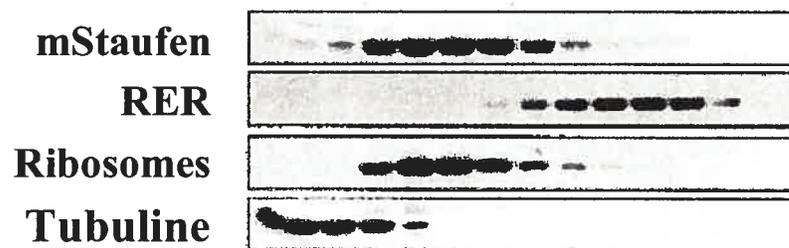
La détermination du rôle exact de Staufen chez les mammifères a été ralentie par l'absence d'ARN cible connu, dont la localisation et/ou la traduction dépendraient de l'activité de mStaufen. L'étude du comportement de mStaufen

Figure 8 : Distribution subcellulaire de mStaufen

A) Immunofluorescence montrant la co-localisation de mStaufen (rouge) avec le RER (marqueur : calnexine (vert)) par microscopie confocale. Figure tirée de Wickham et al (1999)

B) Co-sédimentation de mStaufen avec le marqueur ribosomique L7a dans les mêmes fractions d'un gradient de sucrose.

Figure tirée de Luo et al. (2002)

A**B**

dans les cellules hautement polarisées que sont les neurones a toutefois permis de lever le voile sur son rôle potentiel dans le transport dendritique d'ARN, un processus essentiel à la plasticité synaptique. La première évidence suggérant un rôle de mStaufen dans ce phénomène provient de la détection par immunofluorescence de la protéine mStaufen endogène dans des neurones hippocampaux de rats en culture. De façon intéressante, la protéine mStaufen est retrouvée, dans les dendrites et le corps cellulaire des neurones matures, dans des granules riches en ARN. La co-localisation des granules mStaufen sur les citernes du RER, dans les dendrites, a été observée par microscopie électronique et par co-immunofluorescence (Kiebler et al., 1999). La transfection de neurones en culture avec ADNc encodant la protéine de fusion mStaufen-GFP entraîne la formation de deux types d'agrégats contenant mStaufen et de l'ARN : (i) des granules de petit diamètre localisés principalement dans les dendrites et en périphérie du corps cellulaire, et (ii) des granules de plus gros diamètre concentrés dans le corps cellulaire, autour du noyau. L'observation de ces complexes par microscopie en temps réel indique que les gros granules sont plutôt stationnaires, tandis que les petits granules se déplacent à une vitesse moyenne d'environ 6.4 $\mu\text{m}/\text{seconde}$ dans les prolongements dendritiques (Köhrmann et al., 1999).

Des expériences de précipitation des granules neuronaux, effectuées par différents groupes, ont permis d'obtenir une meilleure caractérisation de ces complexes. L'ultracentrifugation de l'immunoprécipitat d'un homogénat de cerveau de rat, obtenu avec un anticorps contre mStaufen, a permis l'isolement de deux populations de complexes RNP. Une première population, plus dense, retrouvée dans le culot (P100) contient les complexes associés aux membranes intracellulaires et aux polysomes. La deuxième population, retrouvée dans le surnageant (S100), contient des complexes plus solubles, théoriquement non associés à des structures membranaires.

L'analyse de la fraction S100 par Mallardo et al (2003) a permis d'y distinguer deux types de complexes contenant la protéine mStaufen : de gros granules, possédant une masse moléculaire de plus de 2 MDa, qui co-sédimentent avec des marqueurs ribosomiques et du RER, et de petites particules, possédant

une masse moléculaire d'environ 650kDa, non associées aux ribosomes et au RER. Les petites particules co-sédimentent avec la tubuline et avec le moteur moléculaire kinésine KHC, suggérant que le réseau de microtubules est impliqué dans la migration dendritique de ces complexes. Un traitement de dépolymérisation des microtubules, administré à des neurones en culture, entraîne une diminution importante de la formation de particules ainsi qu'une perte de leur motilité (Köhrmann et al., 1999). L'identification de l'ARN BC1 et du transcrite CamKII α , deux ARN reconnus pour leur localisation dendritique, dans les particules mStaufen suggère fortement que ces complexes constituent des RNP en transit dans les dendrites (Mallardo et al., 2003).

L'analyse de la fraction P100 obtenue par ultracentrifugation d'un immunoprécipitat neuronal obtenu avec un anticorps dirigé contre la protéine Pura (Li et al., 2001), une protéine potentiellement impliquée dans le transport dendritique d'ARN, révèle la présence de gros complexes protéiques contenant, notamment, la protéine mStaufen et de l'ARN (Ohashi et al., 2002). Deux moteurs moléculaires sont également retrouvés dans ces complexes, soit la kinésine KHC et la myosine Va. De façon intéressante, l'association de la kinésine KHC au complexe est sensible au détergent, suggérant que ce moteur serait recruté au niveau du complexe par une interaction avec des structures membranaires, potentiellement des citernes du RER. L'interaction du complexe avec la myosin Va semble être plus directe puisqu'elle n'est pas perdue après un traitement au détergent. Ces observations suggèrent que le transport microtubule-dépendant de certains complexes contenant mStaufen serait médié par leur liaison sur des citernes du RER en transit vers les dendrites. La présence de la myosin Va pourrait être importante pour l'ancrage des complexes dans les régions péri-synaptiques, riches en actine (Matus, 1999; Huntley et al., 2002).

La présence de mStaufen dans un complexe très dense isolé de neurones de rat en culture a également été décrite par Krichevsky et Kosik (2001). La visualisation de ce complexe par microscopie électronique révèle sa structure granulaire compacte, constituée d'un enchevêtrement serré de ribosomes (Figure 9A). L'absence de facteurs d'élongation dans ces complexes suggère qu'ils ne sont

pas traductionnellement actifs. De façon intéressante, la dépolarisation neuronale provoque un relâchement de la structure du complexe, caractérisé par un déroulement des polysomes (Figure 9B). Cette dépolarisation se traduit également par une augmentation de la traduction de certains ARN présents dans ce complexe, dont l'ARNm CaMKII α . De plus, des expériences de RT-PCR ont permis d'observer qu'une dépolarisation provoquait une diminution de ces ARNm dans les complexes traductionnellement silencieux concomitante à leur augmentation dans les polysomes. Ces observations suggèrent qu'une dépolarisation neuronale induit le recrutement et la traduction d'ARNm séquestrés dans les complexes mStaufen.

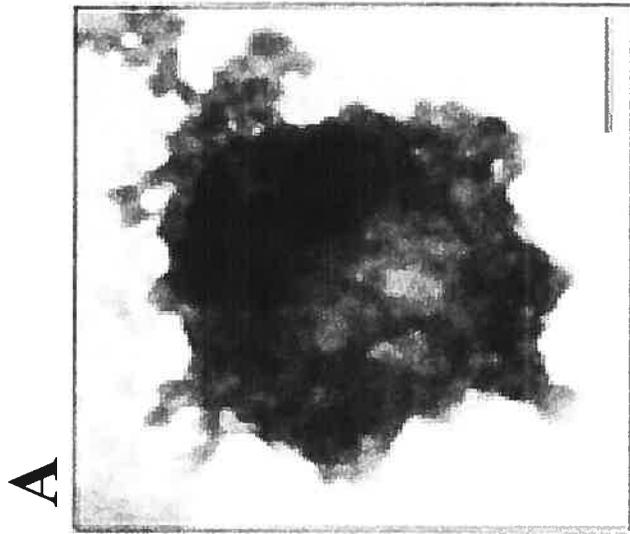
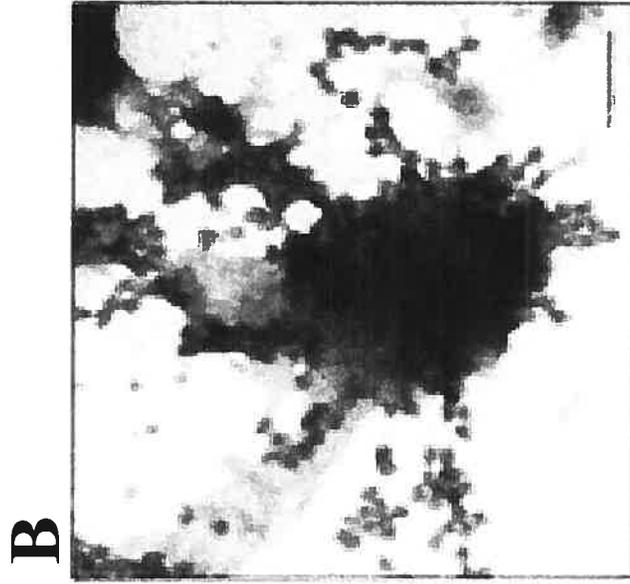
Des expériences de double-hybride sur une banque d'ADNc de cerveau de rat ont permis d'identifier un partenaire protéique de mStaufen : la protéine phosphatase-1 (PP1). Cette interaction semble être le résultat de la liaison de PP1 sur un site consensus) situé en C-terminal du dsRBD3 de mStaufen (Aggen et al., 2000). Des expériences de co-immunoprécipitation et de co-localisation de mStaufen et PP1 ont permis de déterminer que cette interaction avait lieu dans les granules dendritiques (Monshausen et al., 2002). Cette interaction suggère que certaines fonctions de mStaufen pourraient être régulées par un mécanisme de phosphorylation. Alternativement, mStaufen pourrait recruter PP1 dans les RNP afin de réguler la phosphorylation de d'autres partenaires du complexe. La signification biologique de cette interaction dans le processus de transport dendritique d'ARNm demeure donc hypothétique.

Les évidences présentées ci-dessus indiquent clairement que mStaufen est impliqué dans le mécanisme de localisation dendritique d'ARN. Toutefois, la relation exacte entre les différents complexes contenant mStaufen, de même que de nombreux autres points obscurs, doivent être résolus pour pouvoir comprendre les détails de ce mécanisme.

3) Autres fonctions de mStaufen

En plus de son rôle significatif dans la localisation dendritique d'ARN, diverses études ont permis d'associer mStaufen à d'autres fonctions cellulaires.

Figure 9 : Photographie par microscopie électronique d'un granule RNP dense
Granules isolés (A) de neurones non traités et (B) de neurones dépolarisés par une exposition au KCl. Les granules obtenus de neurones non traités apparaissent comme des amas très denses de ribosomes. Les granules obtenus de neurones dépolarisés sont moins compactes et présentent des chaînes de ribosomes s'échappant du granule.
Figure tirée de Krichevsky et al. (2001)



Une description des ces interactions permettra de dresser un portrait plus complet des rôles potentiels de mStaufen chez les mammifères.

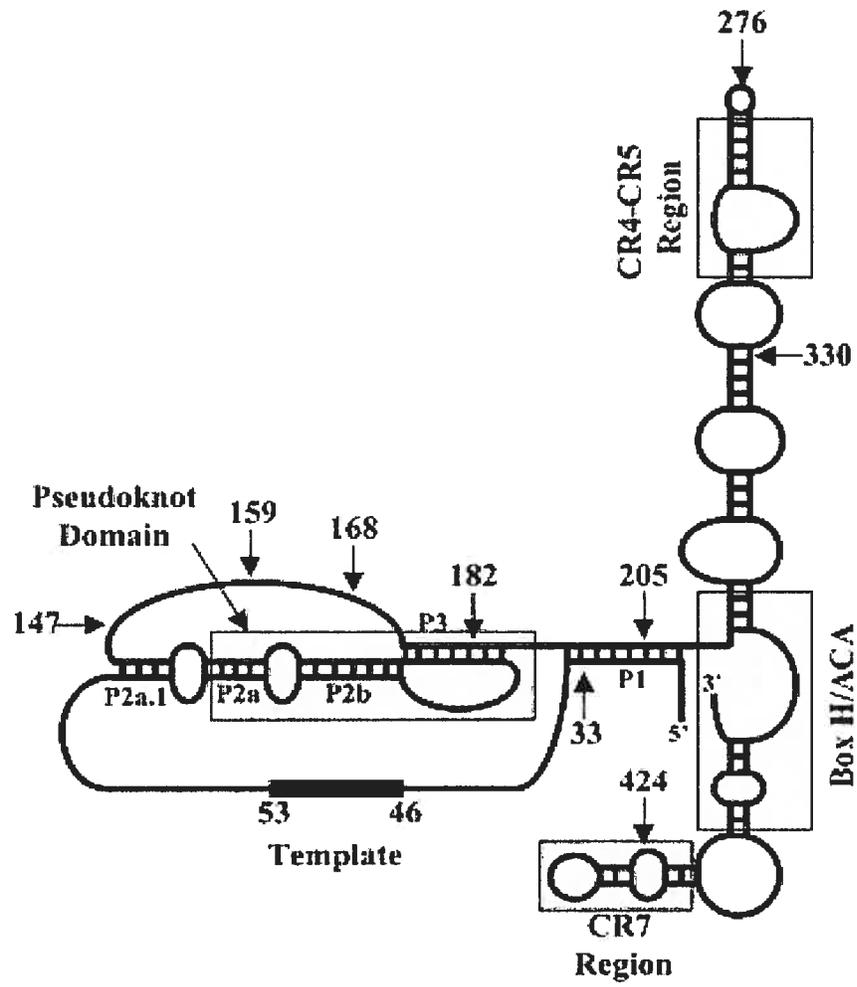
a. mStaufen : composante du complexe télomérase

La télomérase est une enzyme de type transcriptase inverse impliquée dans la conservation de l'intégrité des télomères (Nugent et Lundblad, 1998). Elle est composée d'un ensemble de protéines et d'un ARN de 390 à 450 nucléotides, essentiel à l'activité du complexe (Blasco et al., 1995; Feng et al., 1995). Dans le but d'identifier les protéines associées au complexe RNP télomérique, dont la masse moléculaire totale varie entre 500 et 1500 kDa (Nakayama et al., 1997; Schnapp et al., 1998), des expériences de triple-hybride utilisant comme appât l'ARN de la télomérase humaine (hTR) ont été effectuées. Un des clones positifs de cet essai s'est avéré être la protéine mStaufen (Le et al., 2000). Des expériences de co-immunoprécipitation et de réticulation aux UV ont permis de confirmer la pertinence de cette interaction *in vivo* (Le et al., 2000; Bachand et al., 2001). La validité de cette interaction est également supportée par la localisation de mStaufen et hTR dans le nucléole (Mitchell et al., 1999; Narayanan et al., 1999; Marion et al., 1999; Le et al. 2000). L'ARN hTR possède une structure secondaire complexe présentant de nombreuses structures en tige-boucle pouvant potentiellement être liées par des protéines de liaison à l'ARN (Figure 10). Des expériences EMSA (electrophoretic mobility shift assay) ont permis d'identifier les régions de l'ARN hTR nécessaires à sa liaison par le complexe de la télomérase purifié (contenant notamment la protéine mStaufen) (Bachand et al., 2001). Alors que la présence d'un pseudo nœud et d'une boîte H/ACA n'est pas essentielle à la liaison de la télomérase, une délétion du domaine conservé CR4-CR5 empêche l'interaction de l'ARN hTR avec le complexe (Mitchell et Collins, 2000; Bachand et Autexier, 2001). L'identité du facteur protéique responsable de la liaison du complexe télomérase à l'ARN hTR n'a toutefois pas été déterminée. Bien qu'une interaction entre Staufen et l'ARN hTR ait initialement été démontré pour la région 64 à 222, la possibilité que mStaufen puisse également interagir avec le domaine CR4-CR5 est supportée par la présence de structures secondaires

Figure 10 : Structure secondaire de l'ARN hTR.

Les éléments structuraux conservés chez les vertébrés, incluant le pseudo-nœud, la région CR4-CR5, la boîte H/ACA et la région CR7, sont identifiés en gris.

Figure tirée de Bachand et Autexier (2001)



extensives dans cette région. Le rôle exact de l'association de mStaufen avec l'ARN hTR et la télomérase demeure cependant très spéculatif; sa localisation nucléolaire suggère que mStaufen puisse être impliqué dans le processus de biogenèse de ce RNP.

b. Interaction de mStaufen avec des composantes virales

L'interaction de la protéine mStaufen avec des composantes virales suggère qu'elle pourrait avoir un rôle à jouer dans les nombreux processus impliqués dans le cycle de réplication virale. L'utilisation de la protéine NS1 du virus de l'influenza (Yewdell et Garcia-Sastre, 2002) comme appât dans un essai de double-hybride a permis de révéler son interaction avec mStaufen (Falcon et al., 1999). L'immunoprécipitation de la protéine mStaufen, endogène ou transfectée, par un anticorps dirigé contre la protéine NS1 a permis de confirmer cette interaction *in vivo*. L'accumulation nucléolaire de mStaufen et NS1 est également observée, dans des cellules HeLa, lors de leur surexpression respective. L'observation d'une co-sédimentation de mStaufen et NS1 avec les polysomes dans des cellules infectées par le virus de l'influenza suggère que cette interaction pourrait être impliquée dans la traduction de l'ARNm viral; le rôle reconnu de NS1 dans la stimulation traductionnelle virale supporte davantage cette hypothèse (de la Luna et al., 1995; Enami et al., 1994).

L'identification de la protéine mStaufen dans les particules virales de nombreux virus à ARN (VIH, VML) et son absence des virus à ADN (Epsteinn-Barr, herpes virus) suggèrent qu'elle puisse jouer un rôle spécifique dans la biologie des virus à ARN. L'activité de liaison à l'ARNdb du dsRBD3 de mStaufen est clairement impliquée dans ce rôle puisqu'une mutation la détruisant abolit sa co-immunoprécipitation avec l'ARN du VIH et empêche son encapsidation dans les virions. Une étroite relation entre le taux d'ARN génomique viral incorporé dans chaque virion et la quantité de mStaufen présent dans la cellule a également été observée, suggérant que mStaufen est impliqué dans la sélection des molécules d'ARN génomique destinées à l'encapsidation (Mouland et al., 2000).

4) mStauⁱ

L'analyse des ADNc du gène *staufen* de souris a permis d'identifier un nouveau transcrit contenant une insertion de 18 nucléotides dans la région encodant le dsRBD3 (Duchaîne et al., 2000). Ce transcrit, résultant d'un épissage alternatif, produit un isoforme, baptisé mStauⁱ, dans lequel le premier brin β du dsRBD3 contient 6 acides aminés supplémentaires. Cette insertion provoquerait une modification importante de la structure du dsRBD3 dans laquelle ce brin β serait converti en hélice α . Cette modification de structure provoque une perte de liaison à l'ARNdb du dsRBD 3 et une diminution importante de cette activité dans le contexte de la protéine pleine longueur *in vitro*. La surexpression de cet isoforme se caractérise par la formation de gros agrégats de protéines dont la distribution cytoplasmique est résistante au détergent (Triton-X 100), indiquant une association à des structures cytosquelettiques. Des expériences de co-immunoprécipitation ont démontré la présence simultanée des isoformes mStaufen et mStauⁱ dans les mêmes complexes protéiques. La distribution subcellulaire de mStauⁱ semble être modulée par son interaction avec la protéine mStaufen puisqu'une co-expression de ces deux isoformes entraîne une redistribution de mStauⁱ dans des structures tubulo-vésiculaires périnucléaires, correspondant au RER. De façon intéressante, les complexes composés par les isoformes mStaufen et mStauⁱ démontrent une capacité de liaison à l'ARNdb *in vitro* très diminuée. Cette modulation de l'activité de liaison à l'ARNdb de mStaufen par mStauⁱ suggère que cet isoforme puisse jouer un rôle régulateur dans le transport des RNP par mStaufen (Duchaîne et al., 2000).

5) mStaufen2

Un deuxième gène encodant un homologue de la protéine *Staufen* de drosophile a été identifié chez les mammifères (Duchaîne et al., 2002). La comparaison des séquences et la position relative des dsRBD présents dans mStaufen2 révèlent sa forte homologie avec les protéines mStaufen et DmStaufen. Toutefois, contrairement à mStaufen, qui ne possède pas le dsRBD1, la protéine mStaufen2 contient les dsRBD 1, 2, 3 et 4. Par contre, la séquence du

dsRBD5 est absente de la protéine (Buchner et al., 1999). Le domaine TBD semble cependant conservé. L'activité de liaison à l'ARNdb de mStaufen2 comme celle de mStaufen semble médiée principalement par le dsRBD3 qui lie fortement l'ARNdb *in vitro*. De façon surprenante, le dsRBD1 de mStaufen2 n'est pas en mesure de lier l'ARNdb *in vitro*, contrairement au domaine équivalent chez Staufen de drosophile.

Le gène *staufen2* est surtout exprimé dans le cerveau et le cœur bien qu'une faible expression soit détectable dans d'autres tissus. mStaufen2 aurait donc un rôle moins général que mStaufen. Trois isoformes de mStaufen2, ayant des masses moléculaires de 52, 59 et 62 kDa, sont détectés dans le cerveau. L'isoforme de 62 kDa est caractérisé par la présence complète du dsRBD1 en N-terminal, alors que l'isoforme de 59 kDa n'en possède que la moitié C-terminale. L'isoforme de 52 kDa possède la même région N-terminale tronquée que l'isoforme de 59kDa, mais présente une portion C-terminale plus courte (Buchner et al., 1999). Une interaction entre les protéines mStaufen2⁵² et mStaufen2⁵⁹ avec les ribosomes a également été caractérisée par des expériences de co-sédimentation et de co-immunoprécipitation; l'isoforme mStaufen2⁶² ne semble pas être en mesure d'interagir avec les ribosomes.

La localisation somato-dendritique de mStaufen2 dans les neurones de rat est similaire à celle de mStaufen. Le réseau de microtubules est également impliqué dans la localisation dendritique de mStaufen2, comme le démontrent des expériences de co-localisation (Duchaîne et al., 2002) et de dépolymérisation pharmacologique des microtubules (Tang et al., 2001). Les protéines mStaufen et mStaufen2 ne sont toutefois pas retrouvées dans les mêmes particules dendritiques, suggérant leur participation à des mécanismes de localisation distincts (Duchaîne et al., 2002). La délétion du domaine TBD de mStaufen 2 provoque son accumulation dans le corps des neurones en culture, reflétant l'importance de ce domaine dans le transport dendritique (Tang et al., 2001). La surexpression de cette protéine mStaufen2 tronquée provoque une diminution significative de la quantité d'ARN retrouvée dans les dendrites, ainsi qu'une augmentation équivalente d'ARN dans le corps cellulaire. De plus, la

surexpression de la protéine mStaufen2 sauvage cause une augmentation de la quantité d'ARN dans les dendrites (Tang et al., 2001). Cette corrélation entre la présence de mStaufen2 et l'augmentation de la quantité d'ARN à cet endroit suggère fortement que Staufen2 est impliquée dans le transport dendritique d'ARN.

PARTIE III : NOYAU ET TRANSPORT NUCLEAIRE

Le processus de localisation de l'ARN peut être subdivisé en plusieurs étapes nécessitant chacune l'implication de nombreuses protéines et co-facteurs, dont l'activité spatio-temporelle est finement régulée. L'étape première et primordiale à toute localisation d'ARN est son identification comme cargo à localiser. Le recrutement de protéines liant directement l'ARN au niveau des éléments cis du transcrit est essentiel à l'échafaudage des complexes RNP de localisation; ces protéines agissent donc comme marqueurs des ARN à localiser. L'identité du compartiment subcellulaire dans lequel a lieu ce marquage demeure cependant controversée. Certains ARNm sont reconnus dans le noyau par des facteurs trans qui, dans certain cas, les escortent jusqu'à leur destination finale. Cette notion de reconnaissance nucléaire implique l'existence d'un mécanisme de transport nucléocytoplasmique par lequel les protéines liant l'ARN peuvent être alternativement importées et exportées du noyau. Les lois régissant ces deux processus permettent une régulation de la localisation subcellulaire des protéines navettes et, conséquemment, influencent le transport des ARNm à localier. Conséquemment, une description détaillée des mécanismes d'importation et d'exportation nucléaire des protéines et des différentes catégories d'ARN permettra de mieux cibler le rôle joué par le transport nucléocytoplasmique dans la localisation d'ARN.

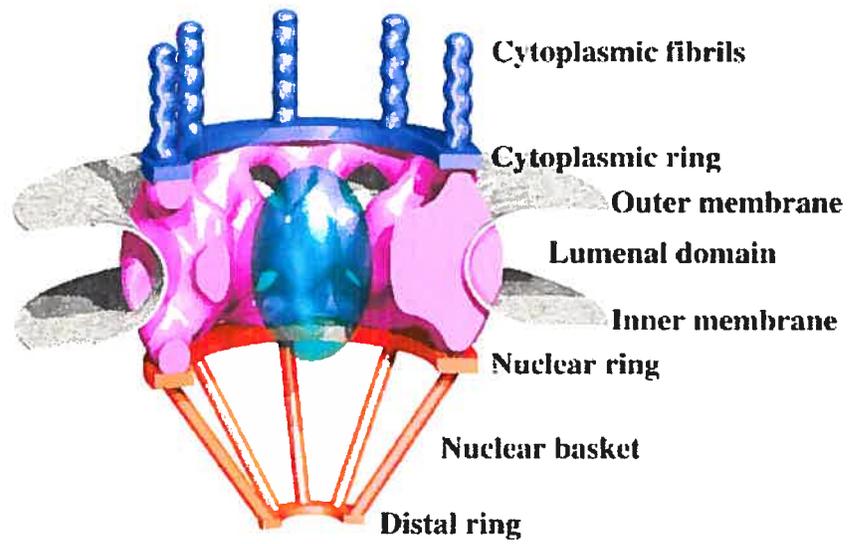
Pore nucléaire

Le transport actif des macromolécules à travers la double barrière membranaire délimitant le noyau est possible grâce à la présence de canaux protéiques la traversant, nommés complexes du pore nucléaire (NPC). Les NPC permettent un transport bidirectionnel (importation et exportation) des macromolécules, et leur nombre élevé (environ 4000 NPC par noyau chez l'humain) assure des échanges rapides et importants entre noyau et cytoplasme. Ayant une masse moléculaire d'environ 125 MDa chez les vertébrés, le NPC présente une structure en trois parties (Figure 11). Le domaine central traversant

Figure 11 : Schéma du pore nucléaire.

Vue transversale d'un NPC montrant la structure octogonale caractéristique du domaine central du pore (rose) et les anneaux cytoplasmique et nucléaire (violet et orangé, respectivement) avec leur fibrilles.

Figure tirée de Hinshaw et al. (1992).



la membrane nucléaire est composée d'une répétition de huit complexes protéiques identiques symétriquement disposés en une structure octogonale. Le domaine central est encadré par un anneau cytoplasmique et un anneau nucléaire, localisés de part et d'autre de la membrane nucléaire. L'anneau cytoplasmique est caractérisé par la présence de huit fibrilles s'étendant sur une distance de 50 nm dans le cytoplasme. L'anneau nucléaire présente une structure en forme de panier où huit fibrilles, s'étendant sur une distance de 100 nm dans le nucléoplasme, sont reliées entre elles par un anneau terminal d'un diamètre de 30 à 50 nm (Stoffler et al., 1999). Des analyses protéomiques ont permis d'identifier les nombreuses protéines, appelées nucléoporines, présentes dans un NPC. Bien que le NPC soit formé d'environ 1000 polypeptides, seulement 30 à 50 protéines différentes le composent. Ces nucléoporines sont généralement présentes en plusieurs copies dans le NPC et peuvent être localisées de façon symétrique ou non dans les différentes parties du pore. Bien que la plupart des nucléoporines semblent être stationnaires, certaines sont mobiles. Le motif FG, composé de répétitions de résidus phénylalanines et glycines, est fréquemment retrouvé dans les nucléoporines et permettrait l'établissement d'interactions hydrophobes dynamiques entre ces dernières et les récepteurs de transport. En absence d'interaction avec un transporteur, le diamètre du canal aqueux du NPC est d'environ 9 nm. Cette ouverture permet la diffusion passive de molécules ayant une taille inférieure ou égale à 40 kDa. La liaison d'un transporteur aux nucléoporines entraîne toutefois l'ouverture du canal NPC, jusqu'à un diamètre de 25 nm, permettant ainsi le transport de macromolécules d'une taille beaucoup plus importante, de même qu'un transport plus efficace des petites molécules (Zasloff, 1983; Breeuwer et Goldfarb, 1990).

Exportation et importation protéique

Afin de traverser le pore nucléaire, les protéines doivent être reconnues comme cargo. Cette reconnaissance repose sur l'interaction entre des transporteurs spécifiques et des signaux de localisation en cis.

1) Éléments de transport cis

Les signaux en cis peuvent être divisés en deux grandes catégories, soit les signaux de localisation nucléaire (NLS), permettant un transport des protéines du cytoplasme au noyau, et les signaux d'exportation nucléaire (NES), permettant un transport en sens inverse (du noyau vers le cytoplasme). Le premier NLS fut identifié dans l'antigène grand T du virus simiesque 40 (SV40). Ce signal, subséquemment baptisé NLS simple ou classique, est caractérisé par une suite de 7 acides aminés majoritairement basiques (Kalderon et al., 1984). Le NLS bipartite, initialement identifié dans la protéine nucléaire nucléoplasmine, est caractérisé par la présence de deux régions riches en résidus basiques séparées par 10 à 12 résidus de nature variable (Robbins et al., 1991). Plusieurs types de NLS ont également été caractérisés dans diverses protéines, toutefois l'importante variabilité de leur séquence rend difficile l'identification d'une séquence consensus (Hall et al., 1990; Makkerh et al., 1996).

Le NES classique est composé d'une dizaine de résidus hydrophobes, généralement des leucines, et est retrouvé dans de nombreuses protéines transitant par le noyau (Fischer et al., 1995; Stutz et Rosbash, 1994; Wen et al., 1995). Toutes les protéines capables d'être exportées du noyau ne possèdent pourtant pas ce type NES classique, indiquant l'existence d'autres signaux d'exportation dont la séquence demeure encore mal définie.

La distinction entre signaux d'importation et d'exportation nucléaire n'est toutefois pas obligatoire puisque certains signaux médient à la fois l'importation et l'exportation d'une même protéine. C'est le cas notamment du signal M9, retrouvé dans la protéine hnRNPA1. Cette séquence de 38 acides aminés, située dans la portion C-terminale, de la protéine sert à la fois de signal d'importation et d'exportation (Michael et al., 1995; Siomi et Dreyfuss, 1995).

2) Récepteurs de transport nucléaire

Les éléments cis des protéines à transporter sont reconnus et liés de façon énergie-indépendante par des récepteurs de transport nucléaire, nommés

karyophérines, impliqués dans leur transit subséquent à travers le NPC. Les éléments cis sont généralement directement liés par un des membres de la famille des karyophérines β , aussi appelées importines ou exportines selon la nature du transport qu'elles effectuent. Les NLS basiques (simples et bipartites) représentent toutefois des exceptions puisque leur liaison par l'importine $\beta 1$ (aussi karyophérine $\beta 1$) nécessite la présence d'un adaptateur, l'importine α (Adam et Adam, 1994; Gorlich et al., 1994). La famille des karyophérines β compte une vingtaine de membres chez les mammifères qui sont impliqués dans le transport de nombreuses protéines et ARN (Tableau I) (Chook et Blobel, 2001). Ayant une masse moléculaire variant entre 90 et 130 kDa, les karyophérines β sont caractérisées par la présence d'un domaine C-terminal de liaison aux cargos et un domaine N-terminal de liaison à la protéine RanGTP. De plus, les karyophérines β ont la capacité d'interagir directement avec les motifs FG présents dans de nombreuses nucléoporines (Radu et al., 1995) ce qui leur permet de recruter le cargo au niveau du NPC. Le mécanisme exact par lequel ce complexe est ensuite transporté d'un côté à l'autre du pore, sur une distance d'environ 200 nm, demeure encore mal défini. Une hypothèse intéressante suggère que les interactions transitoires et successives des karyophérines avec les différentes nucléoporines tapissant le pore permettraient un transport vectoriel du complexe (Rout et al., 2000; Nachury et Weis, 1999). Une fois le transport à travers le pore effectué, une dissociation du complexe permet de libérer le cargo dans le compartiment atteint; la karyophérine est quant à elle recyclée vers le compartiment de départ pour permettre une seconde ronde de transport.

3) Gradient Ran GTP

La directionnalité du transport des complexes karyophérine-cargo est principalement contrôlée par la petite GTPase Ran, une protéine pouvant lier et hydrolyser le GTP. L'activité d'hydrolyse et d'échange nucléotidique endogène de Ran étant très faible (Melchior et Gerace, 1998; Moore, 1998), ces activités sont contrôlées par les co-facteurs RanGAP (protéine d'activation de l'activité GTPase) et RanGEF (facteur d'échange de guanine) permettant la stimulation des

Tableau I (Chook et Blobel., 2001)

Transport factors	Organism	Homologs*	Substrates	NLS/NES
Import				
Kap β 1-Kap α (Imp β -Imp α) [†]	Human	Kap α 5p-Kap α 0p	Proteins with basic NLS	"Classical" NLS
Kap β 1-snuRNP1	Human	ND	snRNPs U1, U2, U4, U5	UsnRNAm3G:kap
Kap β 1	Human	Kap α 5p	Cyclin B1, PTHP, etc	ND
Kap β 2 (transportin) [†]	Human	Kap104p	ImRNPA1, A2, T, TAP	M3 NLS
Kap β 3	Human	Kap121p	Ribosomal proteins	ND
Imp γ -Kap β 1 (RanBP7-Kap β 1) [†]	Human	Uhp2p	Histone H1	ND
Imp11	Human	Kap β 1-Kap α	Ub-M2	ND
Kap α 5p-Kap α 0p	Yeast	Kap β 1-Kap α	Proteins with basic NLS	"Classical" NLS
Kap104p	Yeast	Kap β 2	Mab2p, Hrp1p	RG-NLS
Kap121p	Yeast	Kap β 3	Pho4p, Spo12p, Yap1p, Pat1p	Mapped, but no sequence homology
Kap123p	Yeast	ND	Ribosomal proteins	ND
Kap108p (Sum1p) [†]	Yeast	ND	Ribosomal proteins, Lip1p	ND
Kap111p (Mtr10p) [†]	Yeast	ND	Np β 3p	RG-NLS
Kap114p (Hic4p) [†]	Yeast	ND	TBP, histones H2A, H2B	H2A ₁₋₆₀ , H2B ₁₋₃₃
Kap122p (Puf3p) [†]	Yeast	ND	TfIIa (Ioa1p, Ioa2p)	ND
Kap119p (Rmd5p) [†]	Yeast	ND	TfIIa, HOG1p	ND
Export				
Crm1 (exportin) [†]	Vertebrates	Kap124p	Proteins with leucine-rich NES	Leucine rich NES
CAS	Human	Kap105p	Kap α	ND
Exportin4	Human	Kap127p	IRNA	ND
Exportin4	Mouse	ND	eIF-5A	ND
Kap124p (Crm1p;Xpo1p) [†]	Yeast	Crm1	Proteins with leucine-rich NES	Leucine rich NES
Kap105p (Cas1p) [†]	Yeast	CAS	Kap α 0p	ND
Kap127p (Xos1p) [†]	Yeast	Exportin4	IRNA	ND
Biclin-cytosol transport				
Kap142p (Msn5p) [†]	Yeast	Exportin5	Import: Rpa complex	ND
			Export: Pho4p, Mig1p, Far1p	ND
Unknown function				
Kap120p (Uhp2p) [†]	Yeast	ND	ND	ND
RanBP8	Human	ND	ND	ND
RanBP16	Human	ND	ND	ND
RanBP17	Human	ND	ND	ND
Exportin5	Human	Msn5p	ND	ND

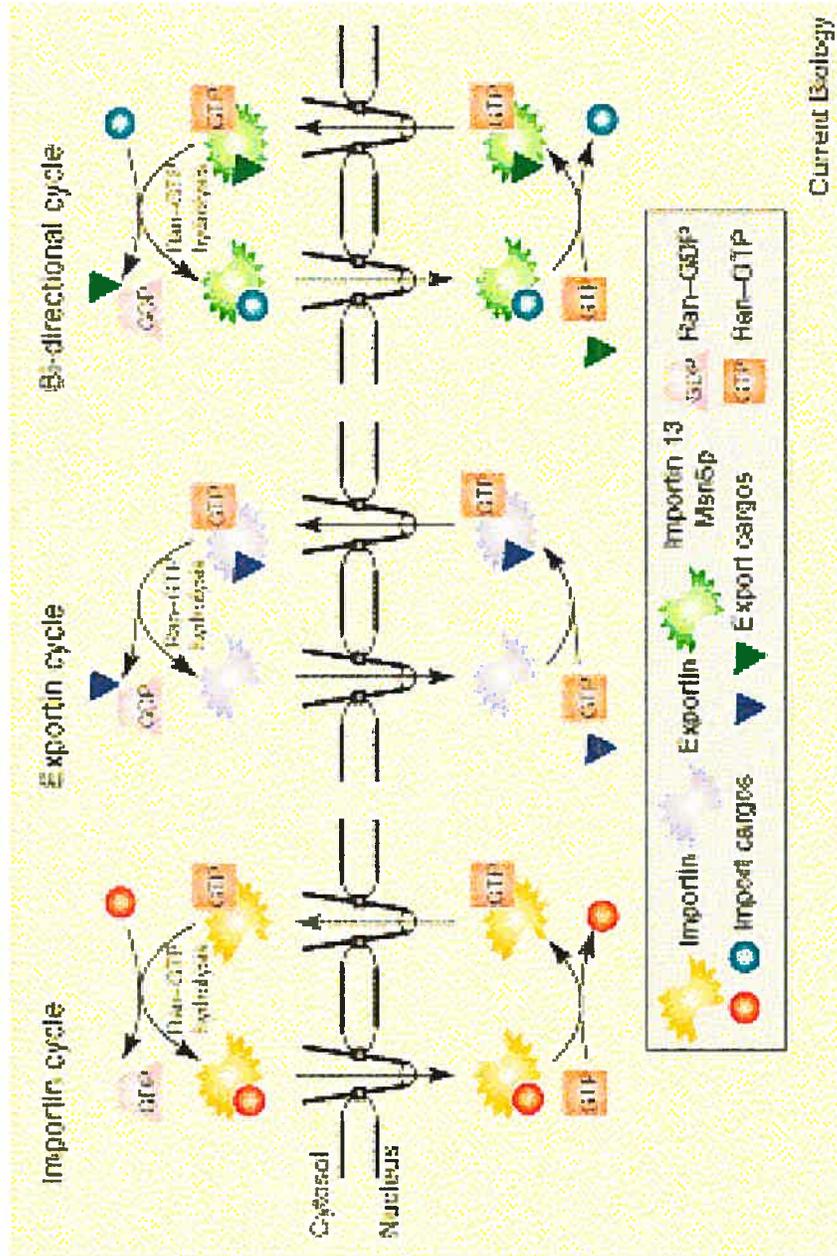
*Sequence, not functional, homologs. †Alternative name given in brackets. ND, not determined.

activités d'hydrolyse du GTP en GDP et d'échange d'une molécule de GDP pour une molécule de GTP, respectivement. La localisation subcellulaire de ces cofacteurs joue un rôle clé dans l'établissement de la distribution asymétrique de RanGTP, nécessaire à la directionnalité du transport à travers le NPC. La localisation cytoplasmique de RanGAP (Bischoff et al., 1995; Gorlich et al., 1996) permet l'obtention d'une concentration élevée de RanGDP dans le cytoplasme. La séquestration nucléaire de RanGEF, médiée par son association à la chromatine, favorise l'accumulation nucléaire de RanGTP (Ohtsubo et al., 1989). Les karyophérines β possèdent un site de liaison à la protéine RanGTP jouant le rôle d'un senseur, permettant d'identifier le compartiment subcellulaire dans lequel elles sont situées. Les karyophérines impliquées dans les mécanismes d'importation lient préférentiellement leur cargo lorsqu'elles ne sont pas liées par RanGTP, soit dans le cytoplasme. Leur transport subséquent à travers le NPC les amène dans le noyau où leur liaison à RanGTP entraîne une dissociation du complexe karyophérine-cargo (Figure 12). La karyophérine liée à RanGTP est ensuite réexportée vers le cytoplasme où la stimulation de l'hydrolyse du GTP par RanGAP permet sa libération et la rend disponible pour une nouvelle ronde d'importation (Rexach et Blobel, 1995; Gorlich et al., 1996; Izaurralde et Adam, 1998; Hieda et al., 1999). De façon inverse, les karyophérines impliquées dans l'exportation lient préférentiellement leur cargo lorsqu'elles sont associées à RanGTP, soit dans le noyau. Suite à leur transit par le NPC, l'hydrolyse du GTP dans le cytoplasme permet la dissociation du complexe trimérique Ran-karyophérine-cargo, donc le relâchement de la protéine transportée dans le cytoplasme (Figure 12) (Fornerod et al., 1997; Kutay et al., 1997; Arts et al., 1998). Une déplétion graduelle du pool nucléaire de Ran, résultant de l'exécution de nombreux cycles d'exportation, serait éventuellement observée sans la protéine NTF2. Cette protéine lie et transporte les protéines RanGDP du cytoplasme au noyau, permettant donc leur recyclage (Ribbeck et al., 1998; Smith et al., 1998). Cette réimportation permet de conserver une concentration élevée de Ran dans le noyau, une condition essentielle à l'accomplissement du transport nucléaire.

Figure 12 : Importation et exportation protéique.

Schéma résumant les cycles de transport médiés par les importines et les exportines contrôlés par le système RanGTP.

Figure tirée de Dasso (2002)



Mécanismes d'exportation de l'ARN

Les ARN ribosomiques (ARNr), les ARN de transfert (ARNt), les ARN messagers (ARNm) et les petits ARN nucléaires (ARNsn) utilisent tous des mécanismes distincts d'exportation nucléaire. Une description plus détaillée du phénomène de l'exportation des ARNm sera d'abord présentée, vu son implication dans le phénomène de transport cytoplasmique de l'ARNm. Un bref survol des mécanismes régissant l'exportation des autres types d'ARN sera subséquemment présenté.

1) ARNm

Le phénomène d'exportation de l'ARNm est beaucoup plus complexe que celui des protéines, car il met en jeu différents processus plus ou moins redondants. La complexité de cette exportation découle principalement d'un phénomène de régulation très strict garantissant que seul les ARNm correctement épissés puissent être exportés.

La karyophérine β CRM1 a été impliquée dans l'exportation de nombreux ARNm d'origine rétrovirale (Fornerod et al., 1997; Stade et al., 1997; Yang et al., 1999). Cette karyophérine, responsable de l'exportation des protéines arborant un NES leucine-riche, est recrutée au niveau des ARN viraux par une protéine virale liant l'ARN et possédant un NES reconnu par CRM1. Ce mécanisme a pour but de court-circuiter le système de surveillance des ARNm afin de permettre l'exportation efficace d'ARN viraux incomplètement épissés. Ce mécanisme n'est toutefois pas impliqué dans l'exportation de la majorité des ARNm cellulaires. En effet, la majorité des ARNm poly(A)⁺ est efficacement exportée vers le cytoplasme en présence de leptomycine B, une drogue inhibant spécifiquement l'exportation médiée par CRM1 (Fischer et al., 1995; Neville et Rosbash, 1999; Fornerod et al., 1997). L'exportation efficace d'une catégorie d'ARNm cellulaires semble toutefois dépendre de CRM1 : les ARNm contenant des éléments AREs. Ces éléments AREs sont retrouvés dans la portion 3'UTR de plusieurs ARNm encodant des protéines de signalisation cellulaire (Brennan et al., 2000). Des

expériences d'hybridation *in situ* ont permis de démontrer que ces transcrits s'accumulent au noyau suite à un traitement à la leptomycine B. Comme pour l'exportation des ARN viraux, des protéines adaptatrices arborant un NES classique permettent de recruter CRM1 sur les ARNm AREs. Les protéines hnRNP ont initialement été suggérées comme responsables du recrutement de CRM1 au niveau de ces ARNm; des analyses récentes semblent infirmer cette hypothèse (Michael et al., 1995; Nakielny et al., 1996; Huang et Lai, 2001)

Le mécanisme d'exportation de la majorité des ARNm cellulaires est indépendant à la fois des karyophérines et du gradient Ran (Clouse et al., 2001). Ce processus implique la protéine Tap et son co-facteur NXT (ou p15) qui sont en mesure de lier directement les nucléoporines pour permettre un transport à travers le NPC (Fribourg et al., 2001; Lévesque et al., 2001; Wiegand et al., 2002). Le rôle de la protéine Tap a d'abord été caractérisé chez la levure, où une accumulation nucléaire d'ARN poly(A)⁺ est observée dans une souche mutante thermo-inductible de la protéine Mex67p (homologue de Tap) (Segref et al., 1997). Le mécanisme d'action de Tap a initialement été étudié à l'aide d'expériences portant sur le rétrovirus MPMV. Contrairement à d'autres rétrovirus, MPMV n'encode pas de protéine adaptatrice permettant le recrutement de CRM1 au niveau des ARN incomplètement épissés. Ces ARN contiennent plutôt un élément de transport (CTE) en cis permettant leur exportation et ne nécessitant la participation d'aucune autre protéine virale, donc utilisant le système cellulaire d'exportation (Bray et al., 1994). L'injection d'une grande quantité d'ARN CTE dans le noyau d'un ovocyte de xénope provoque une accumulation nucléaire d'ARN poly(A)⁺, indiquant que le système d'exportation utilisé par l'ARN CTE est également responsable de l'exportation des transcrits cellulaires (Pasquinelli et al., 1997; Saavedra et al., 1997). Le facteur Tap a été subséquemment identifié comme responsable de l'exportation de l'ARN CTE et des ARNm cellulaires (Grüter et al., 1998). Puisque les ARNm cellulaires ne contiennent pas de séquence CTE, le recrutement de Tap sur l'ARNm serait médiés par des interactions protéiques avec la machinerie d'épissage. L'épissage efficace d'un intron entraîne la liaison d'un complexe protéique (EJC) près de la

nouvelle jonction exonique. L'interaction Tap avec la protéine Aly du complexe EJC permettrait son recrutement sur l'ARNm et l'exportation subséquente de ce dernier (Strässer et al., 2000; Rodrigues et al., 2001; Le Hir et al., 2001). Une relation intime entre épissage et exportation semble donc exister. Cependant, des ARNm sans intron, encodés par des ADNc, sont également en mesure d'être exportés de façon Tap-dépendante, indiquant l'existence d'un mécanisme alternatif de recrutement de ce facteur sur l'ARNm (Gatfield et Izauralde, 2002). Une étude récente suggère que Tap serait recruté de façon automatique sur des séquences d'ARN non structurées (Ohno et al., 2002).

Le mécanisme d'export Tap-dépendant semble constituer la voie principale d'exportation des ARNm; toutefois, l'existence de mécanismes alternatifs suggère que le transport de certains ARNm puisse être plus spécifiquement régulé. Cette régulation supplémentaire pourrait permettre de mieux contrôler la destinée de ces ARNm.

2) Autres ARN

L'exportation des ARNr, ARNt et ARNsn dépend du gradient Ran et de l'activité de karyophérines β spécifiques.

Les ARNt, transcrits par l'ARNpolymérase III, subissent de nombreuses modifications post-transcriptionnelles dont des changements de nucléotides, de l'épissage et des coupures aux extrémités 5' et 3' (DeRobertis et al., 1981). La karyophérine β exportin-t reconnaît directement et spécifiquement les ARNt matures et permet leur transport au cytoplasme. La liaison efficace de l'exportin-t sur les ARNt dépend de son association avec RanGTP et est sensible aux modifications post-transcriptionnelles subies par l'ARNt. Ainsi les ARNt possédant des extrémités 3' et 5' incorrectes et/ou n'arborant pas les bases modifiées sont très faiblement liés par l'exportin-t et conséquemment exportés (Arts et al., 1998; Lipowsky et al., 1999). Cette discrimination garantit que les ARNt exportés sont fonctionnels et matures.

Les ARNsn sont de petits ARN structuraux majoritairement transcrits par l'ARN polymérase II. Ils entrent dans la composition des snRNP, complexes

ribonucléoprotéiques impliqués dans l'épissage des ARNm. Bien que ces ARN jouent un rôle dans le noyau, leur association avec les composantes protéiques des snRNP a lieu dans le cytoplasme; les ARNsn doivent donc être exportés. Durant leur transcription, les ARNsn, comme les ARNm, acquièrent un cap 7-méthylguanosine. La liaison du complexe protéique de liaison du cap (CBC) permet de recruter le facteur PHAX qui interagit avec la karyophérine CRM1, responsable de l'exportation subséquente des ARNsn (Izaurralde et Mattaj, 1995; Ohno et al., 2002).

Les ARNr 28S, 5.8S et 5S s'associent avec une cinquantaine de protéines pour former la grosse sous-unité ribosomique 60S. La petite sous-unité 40S est, quant à elle, formée par l'assemblage de l'ARNr 18S avec 33 protéines ribosomiques (Venema et Tollervey, 1999). Les modifications post-transcriptionnelles des ARNr et leur assemblage en complexes RNP ont lieu dans le nucléole. L'exportation CRM1-dépendante de chaque sous-unité est ensuite médiée de façon indépendante (Moy et Silver, 2002; Hurt et al., 1999). Le recrutement de CRM1 au niveau de la sous-unités 60S dépend de son association avec la protéine non-ribosomique Nmd3 arborant un NES classique (Ho et al., 2000; Gadal et al., 2001). La protéine Nmd3 ne s'associant qu'à une étape tardive de la biogenèse de la sous-unité 60S, seul les particules ribosomiques matures sont efficacement exportées. Un processus similaire semble être responsable du recrutement de CRM1 au niveau de la sous-unité 40S (Moy et Silver, 2002). La protéine Nmd3 n'est toutefois pas impliquée dans ce processus puisqu'elle n'est pas en mesure d'interagir avec la petite sous-unité ribosomique. L'identité de la protéine adaptatrice responsable de l'exportation de cette sous-unité demeure donc inconnue.

Nucléole

Le nucléole est reconnu comme le site de biogenèse des ribosomes. Toutefois, la localisation nucléolaire de nombreuses protéines n'ayant *a priori* aucun rôle à jouer dans ce phénomène suggère son implication dans des processus cellulaires tels l'amortissement génique (gene silencing), la progression du cycle

cellulaire et la sénescence (Pederson, 1998; Cockell et Gasser, 1999; Garcia et Pillus, 1999). De façon intéressante, de plus en plus d'évidences indiquent que le nucléole est également le site d'assemblage de nombreux complexes RNP. Le RNP SRP (particule de reconnaissance du signal), qui permet le ciblage des protéines sécrétées et membranaires au RER, est composé d'un petit ARN associé à six protéines (Walter et Johnson, 1994). Après son injection dans le noyau de cellules de mammifères, l'ARN SRP se localise rapidement au nucléole avant d'être exporté vers le cytoplasme (Jacobson et Pederson, 1998). Des expériences d'hybridation *in situ* ont confirmées que l'ARN SRP endogène est également localisé au nucléole (Politz et al., 2000). La présence nucléolaire de trois protéines s'associant à l'ARN SRP suggère qu'une étape essentielle de l'assemblage de ce RNP a lieu dans le nucléole.

Un autre ARN impliqué dans un complexe RNP est retrouvé dans le nucléole, l'ARN hTR de la télomérase. Le rôle de cette localisation nucléolaire demeure obscure puisque peu de protéines de la télomérase co-localisent au nucléole. La présence de l'ARN hTR au nucléole pourrait favoriser l'accomplissement de modifications post-transcriptionnelles plutôt qu'un assemblage du RNP.

L'hypothèse d'un rôle du nucléole dans l'exportation d'ARNm existe depuis plusieurs années. La localisation nucléolaire du transcrit c-myc (Bond et Wold, 1993) et des protéines virales Rex et Rev, deux protéines impliquées dans l'exportation de l'ARN viral, appuie cette hypothèse (Siomi et al., 1988; Cullen et al., 1988; Kubota et al., 1989). La capacité de la protéine Rev à recruter la karyophérine CRM1 et deux nucléoporines (Nup98 et Nup 214) au nucléole (Zolotukhin et Felber, 1999) suggèrent que ce dernier agisse comme plate-forme permettant l'échafaudage de certains complexes d'exportation.

La caractérisation de nombreuses structures associées au nucléole, tel les corps spiralés (Spector, 1993; Malatesta et al., 1994; Gall et al., 1995) et le compartiment périnucléolaire, a permis d'y identifier des facteurs d'épissage et d'exportation, de même que de l'ARN poly(A)⁺ (Ghetti et al., 1992; Matera et al.,

1995). Ces structures pourraient jouer un rôle clé dans des phénomènes d'assemblage et d'exportation d'ARN médiés par le nucléole.

Relation entre transport nucléaire et localisation d'ARN

De plus en plus d'évidences indiquent que le processus de localisation d'ARN débute dans le noyau par la reconnaissance du transcrit et la formation d'un complexe RNP de transport. La liaison de facteurs trans permet d'identifier et dans certains cas d'escorter l'ARN vers sa destination finale. Les hnRNP sont des protéines liant l'ARN impliquées dans plusieurs processus nucléaires dont la régulation transcriptionnelle, l'entretien des télomères et l'épissage d'ARN. Bien que majoritairement localisés au noyau, plusieurs hnRNP transitent continuellement entre le noyau et le cytoplasme (Pinol-Roma et Dreyfuss, 1992). Ces hnRNP ont d'ailleurs été impliqués dans les processus de transport nucléocytoplasmique, la localisation, la traduction et la stabilité de certains ARNm (Dreyfuss et al., 2002). Notamment, la protéine hnRNPA2 est nécessaire à la localisation de l'ARNm MBP dans les oligodendrocytes. Cette protéine contient une séquence de localisation M9 qui lui permet d'être exportée au cytoplasme.

La protéine Squid (Sqd) de drosophile fait également partie de la famille des hnRNP effectuant un transport nucléocytoplasmique grâce à une séquence M9. Elle joue un rôle clé dans la localisation postérieure et antéro-dorsale du transcrit *grk* durant l'ovogenèse. Plusieurs évidences suggèrent qu'une interaction nucléaire entre Sqd et l'ARNm *grk* est nécessaire à l'exportation et à la localisation cytoplasmique du transcrit (Lall et al., 1999; Norvell et al., 1999).

Les protéines liant l'ARN de la famille ZBP (protéine liant le code zip) sont associées à différents aspects du métabolisme de l'ARN, dont la localisation, la stabilité et le contrôle traductionnel. La protéine de poulet ZBP1 est responsable de la localisation du transcrit de l'actine β dans les fibroblastes et les neurones (Ross et al., 1997; Zhang et al., 2001a), tandis que la protéine orthologue Vg1RBP permet la localisation de l'ARNm VegT lors de l'ovogenèse chez le xénope (Deshler et al., 1997; Kwon et al., 2002). Contrairement aux hnRNP, les protéines

de la famille ZBP sont majoritairement retrouvées dans le cytoplasme sous forme de granules associés au cytosquelette. La présence de signaux d'importation et d'exportation dans leur séquence suggère toutefois qu'elles transitent par le noyau. L'utilisation de l'inhibiteur d'exportation leptomycineB induit effectivement une accumulation nucléaire de ZBP1 dans les fibroblastes de poulet, confirmant l'existence d'un transport nucléo-cytoplasmique dépendant de la karyophérine CRM1 (Oleynikov et Singer, 2003). L'implication de la présence nucléaire de ZBP1 dans le recrutement et le transport de l'ARNm β -actine a été récemment démontrée. Une co-localisation entre l'ARNm β -actine à son site de transcription avec la protéine de fusion ZBP1-GFP a pu être observée dans les noyaux de fibroblastes (Oleynikov et Singer, 2003). Ce résultat démontre que ZBP1 s'associe de façon co-transcriptionnelle avec l'ARNm β -actine afin de médier sa localisation cytoplasmique.

Modèle de localisation d'ARN

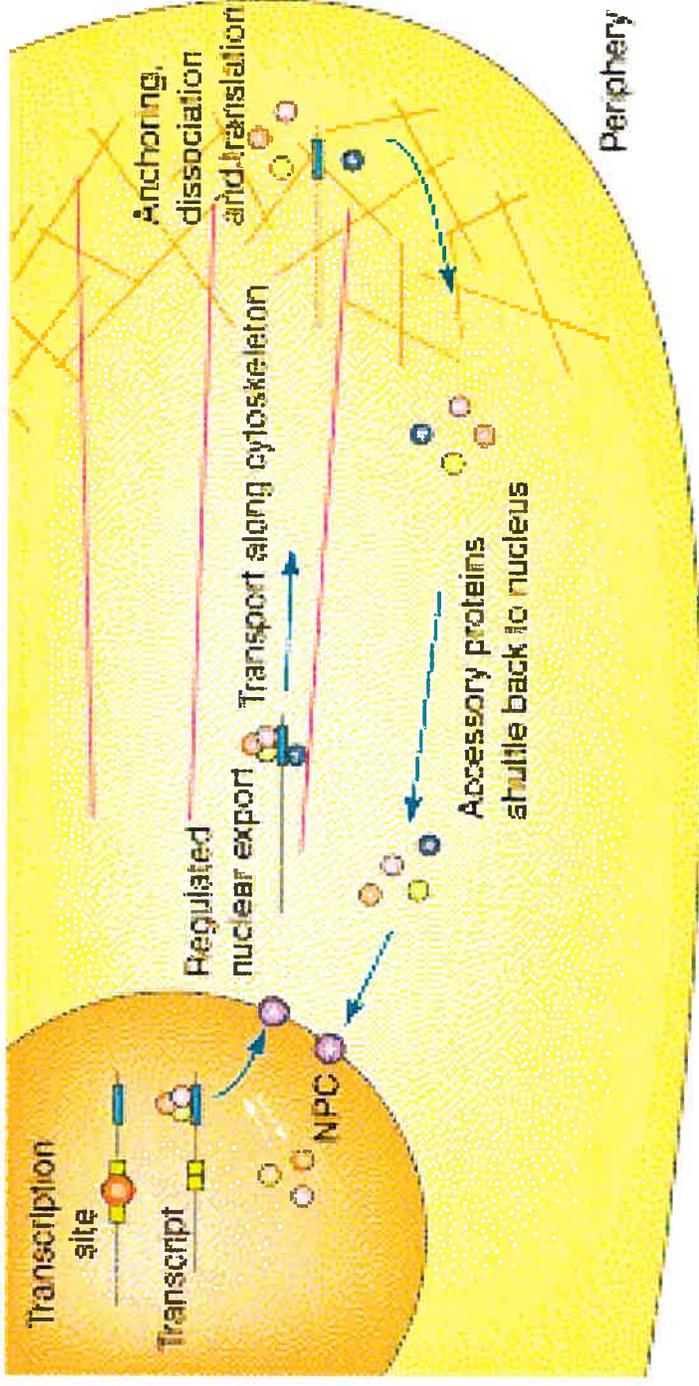
Les concepts et exemples présentés précédemment permettent de proposer un modèle englobant les étapes générales d'une localisation d'ARN (Figure 13). La première étape consiste en la reconnaissance du transcrit à localiser par la liaison de facteurs trans sur les éléments cis, généralement situés dans la portion 3'UTR du transcrit. Les évidences présentées ci-dessus suggèrent que cette identification se fasse dans le noyau de façon post- ou co-transcriptionnelle. La liaison de facteurs en trans permet ensuite l'échafaudage d'un complexe RNP contenant plusieurs protéines nécessaires au transport, à la stabilité et au contrôle traductionnel de l'ARN. Même si la formation d'un tel complexe débute probablement dans le noyau, certaines autres protéines sont nécessairement recrutées dans le cytoplasme. Un remodelage constant de la composition du complexe RNP permet, en effet, une meilleure modulation de son activité durant les différentes étapes de son transport. Le complexe RNP est recruté au niveau du cytosquelette grâce à son association à des moteurs cytoplasmiques ou à des structures elles-mêmes reliées à de tels moteurs. L'ARNm, traditionnellement

silencieux, est subséquemment transporté le long du réseau cytosquelettique dans le complexe RNP. Une fois arrivé à destination, le complexe RNP est ancré au cytosquelette à l'aide de protéines accessoires. La traduction du transcrit peut ensuite être déclenchée par différents signaux spatio-temporels permettant la production localisée de la protéine d'intérêt.

Figure 13 : Modèle du mécanisme de localisation d'ARN.

L'association de l'ARN avec différents facteurs protéiques dans le noyau permet la formation d'un complexe RNP de localisation. Suite à son passage à travers le pore nucléaire, le complexe s'associe à d'autres protéines, dont des moteurs moléculaires. Le complexe est alors recruté, transporté activement sur le réseau cytosquelettique et ancré à sa destination finale. L'activation de la traduction permet la production localisée de la protéine d'intérêt.

Figure tirée de Farina et Singer (2002).



HYPOTHÈSE DE TRAVAIL

L'hypothèse à l'origine de ce mémoire est basée sur la notion que le mécanisme de localisation de l'ARNm est un phénomène (i) hautement régulé (ii) dont le but est le transport efficace de l'ARNm, de son site de transcription à son site de traduction, (iii) impliquant la coopération et l'interaction synchronisée de nombreuses protéines et co-facteurs.

Considérant la multitude de destins possibles pour un transcrit dans la cellule : **le recrutement de l'ARNm dans les complexes RNP impliqués dans sa localisation cytoplasmique doit avoir lieu le plus rapidement possible après sa transcription afin d'assurer la spécificité et l'efficacité de son transport.**

La caractérisation d'un transit nucléocytoplasmique chez certaines protéines impliquées dans la localisation d'ARNm a permis d'envisager la possibilité que le recrutement de l'ARNm puisse avoir lieu dans le noyau.

Considérant l'implication de la protéine Staufen dans le processus de localisation d'ARNm chez les mammifères, la question à laquelle nous avons tenté de répondre plus spécifiquement au cours de ces travaux de maîtrise est la suivante : **dans quel compartiment subcellulaire Staufen recrute-t-il initialement l'ARN et de quelle façon cette interaction est-elle régulée ?**

RESULTATS

Note

Contribution des auteurs :

Toutes les constructions et expériences présentées dans cet article ont été réalisées par Catherine Martel sous la supervision du Dr. Luc DesGroseillers.

Article en préparation pour soumission à *Journal of Cell Science*

Staufen is imported into the nucleus via a bipartite nuclear localization signal

Catherine Martel and Luc DesGroseillers*

Department of Biochemistry, University of Montreal, P.O. Box 6128 Station Centre Ville,
Montreal, Canada H3C 3J7

*Correspondence should be addressed to:

Dr Luc DesGroseillers
Department of Biochemistry
University of Montreal
P.O. Box 6128, Station Centre Ville
Montreal, QC, Canada
H3C 3J7
Phone: 514-343-5802
Fax: 514-343-2210
Email: luc.desgroseillers@umontreal.ca

Running title: Nuclear import of Staufen

Abstract

Staufen is a dsRNA binding protein involved in mRNA localization both in *Drosophila* and mammals. Although Staufen was mostly described in the cytoplasm, recent studies suggest that it can transit through the nucleus/nucleolus in mammalian cells. Using a yeast import assay, we showed that Staufen can be actively imported in the nucleus and identified a bipartite nuclear localization signal (NLS) that is necessary and sufficient for nuclear import. When tested in mammalian cells, the NLS was also sufficient to import a reporter protein into the nucleus. We then analyzed the components that modulate Staufen nuclear import/export. We showed that the double-stranded RNA-binding domain 3 (dsRBD3) is a major determinant. When dsRBD3 was deleted from the full-length protein, mutated Staufen accumulated in the nucleus. Similarly, a point mutation in Staufen dsRBD3 caused Staufen accumulation in the nucleolus, suggesting that dsRBD3 is somehow involved in nuclear export. We also showed that domains involved in nuclear export are also responsible for Staufen retention in the cytoplasm, suggesting that regulation of the nuclear import pathway might be achieved by a cytoplasmic anchoring mechanism. The presence of Staufen in the nucleus and/or nucleolus suggests that it may be involved in the early selection of transported mRNA and/or the formation of specific RNP complexes.

Keywords: Nuclear import; bipartite NLS; Staufen; cytoplasmic retention;

Introduction

mRNA localization is an important mechanism allowing precise spatial and temporal expression of proteins. Many phenomena such as learning and memory, synaptic plasticity, axis formation, cell motility and asymmetric cell division were shown to depend on local transport and/or translation of specific mRNAs (Kloc et al., 2002; Palacios and St Johnston, 2001 for review). Models of mRNA localization involve several common steps including: (1) recognition and binding of target mRNA by specific subsets of RNA-binding proteins and associated cofactors to form mRNP particles; (2) active transport of translationally repressed mRNPs along the cytoskeletal network; (3) anchoring of the mRNPs at specific sites and (4) local translation of mRNAs following specific signals.

Recent evidences suggest that the initial steps of RNA recognition by specific proteins and RNP formation take place in the nucleus. In *Drosophila*, Sqd, a member of the hnRNP family is required for *grk* mRNA localization at the dorsal pole during oogenesis (Norvell et al., 1999). Sqd has been suggested to bind *grk* mRNA in the embryonic nucleus. In mammals, recognition of MBP mRNA by hnRNPA2 first occurs in the nucleus (Ainger et al., 1997; Hoek et al., 1998). MBP mRNA/hnRNPA2-containing complexes then exit the nucleus and localize to the myelin compartment of oligodendrocytes (Munro et al., 1999; Izaurralde et al., 1997). Similarly, the cytoplasmic RNA binding protein ZBP, which is involved in β -actin mRNA localization in chicken fibroblasts and neurons, was shown to shuttle through the nucleus by means of specific nuclear import and export signals and to bind β -actin mRNA at its transcription site (Ross et al., 1997; Zhang et al., 2001; Oleynikov and Singer 2003).

Staufen is a double-stranded RNA-binding protein that was first identified in *Drosophila* where it plays essential roles in mRNA localization (St Johnston et al., 1991; Broadus et al., 1998; Ephrussi et al., 1991; Kim-Ha et al., 1991; Li et al.,

1997). As its *Drosophila* homologue, mammalian Staufen is a modular protein composed of several double-stranded RNA-binding motifs (dsRBD) (St Johnston et al., 1992; Wickham et al., 1999; Kiebler et al., 1999). The major determinant for RNA-binding activity is dsRBD3, although a weak RNA binding activity is also associated with dsRBD4 (Wickham et al., 1999). Cosedimentation and colocalization experiments indicated that mammalian Staufen localizes to the rough endoplasmic reticulum and associates with ribosomes (Wickham et al. 1999, Marion et al. 1999). Direct interaction between Staufen and both ribosomal subunits was also demonstrated (Luo et al. 2002). This association is mediated by two molecular determinants, dsRBD3 and dsRBD4-TBD and likely involves both RNA-binding and protein-protein interaction.

Mammalian Staufen is thought to be involved in mRNA localization. In neurons, a Staufen-GFP fusion protein rapidly associates with RNA-containing granules (Kohrmann et al. 1999). These granules migrate along the microtubule network of dendrites at an average speed of 6,4 $\mu\text{m}/\text{sec}$. Biochemical characterization of Staufen-containing granules in neurons revealed an heterogeneous population of granules and particles associated with mRNA, ribosomes and/or other protein cofactors (Mallardo et al. 2003, Ohashi et al. 2002, Krichevsky and Kosik, 2001). However, the mechanism and the subcellular site of RNP assembly are still unknown. The presence of putative nuclear localization signals (NLS) in Staufen, its accumulation in nucleolus upon overexpression (Marion et al., 1999; Le et al., 2000) and its interaction with telomerase (Le et al., 2000; Bachand et al. 2001) suggest that Staufen may enter the nucleus where it might play a role in mRNA selection and/or RNP assembly.

In this study we show that the bipartite NLS is functional and identify the molecular determinants involved in the modulation of import (MOI). These determinants overlap with those involved in Staufen cytoplasmic retention suggesting that Staufen shuttling through the nucleus may be regulated by its cytoplasmic retention.

Experimental

Construction and molecular cloning of fusion proteins

pNIA-Staufen was obtained by PCR amplification of Staufen cDNA using the Vent DNA Polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA) and specific oligonucleotides (Table I). The resulting product was digested with BamHI and *SalI* restriction enzymes and cloned in the pNIA vector (Rhee et al, 2000) previously digested with the same enzymes. Mutants containing different regions of Staufen were cloned in pNIAE2 as followed: PCR amplification of each Staufen region (see Table I for oligonucleotide primer sequences and templates), phosphorylation of resulting products with T4 polynucleotide Kinase and cloning in *SmaI*-digested pNIAE2 (Rhee et al, 2000). Point mutations in the bipartite NLS of pNIA_hStau (pNIA-hSt mNLS1, mNLS2, mNLS3, mNLS4) were introduced by the Quickmut procedure (Stratagene) using specific oligonucleotides (Table II).

The virE2-GFP fusion protein was obtained by PCR amplification of virE2 from pNIAE2 using Vent DNA Polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA). The product was digested by *XmaI* and *BamHI* restriction enzymes and cloned in the GFP-Topaz vector (Packard) previously digested with the same enzymes. St, St Δ 2, St Δ 4, St Δ TBD and St Δ 5, St Δ 4/3F* mutants in virE2-GFP were obtained by digestion of the corresponding RSV-Staufen mutants (Luo et al, 2002) with *NotI-KpnI* or *NotI-HindIII* restriction enzymes and cloned in the GFP-virE2 vector previously digested with the same enzymes.

Staufen St Δ 3-virE2-GFP containing the bipartite NLS was obtained by all-around PCR amplification of pNIA_hSt using specific oligonucleotides (Table II); the PCR fragment was treated with *DpnI* (Roche Molecular Biochemicals, Laval, Quebec, Canada) and T4 PNK kinase (Pharmacia, Baie d'Urfé, Quebec, Canada) before being self-ligated.

RBD3-virE2-GFP, RBD3NLS*-virE2-GFP, NLS-virE2-GFP and NLS*-virE2-GFP were PCR amplified (see Table I for specific oligonucleotides and templates), digested with *KpnI* or *EcoRV* and *NotI* restriction enzymes and cloned in virE2-GFP vector pre-digested with the same enzymes.

Staufen's domains fused to GFP were obtained by PCR amplification (see Table I for specific oligonucleotides and templates) followed by digestion with the specified restriction enzymes (Table I) and cloning in GFP-Topaz digested with the same enzymes.

To obtain St/3*F-GFP and St/3*F/ Δ 4-GFP, RSV-hSt/3*F and RSV_hSt/3*F/ Δ 4 (Luo et al 2002), respectively, were digested with *NotI*. The resulting fragments were end-blunted with T4 DNA polymerase, further digested with *KpnI* and cloned in *SmaI-KpnI*-GFP_Topaz vector.

The St/3*K4-GFP mutant was produced in three steps: (i) lysine residues 153 and 154 of RSV-St were changed to alanine residues by Quickmut procedure (Stratagene). (ii) One mutated clone was PCR-amplified, digested with *EcoRV* enzyme and ligated in *EcoRV*-GFP-Topaz vector, creating St/3*K2-GFP. (iii) This construct was used as a template to replace histidine 131 and lysine 133 residues by alanine residues by the Quickmut procedure (see Table II for oligonucleotide sequences of each step).

Cell Culture and microscopy

COS7 cells were grown to 60-80% confluency on coverslip in Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin/streptomycin before transfection with Fugene transfection reagent (Roche). 2-4 μ g of plasmid DNA encoding each constructs were transfected in each assay. The cells were then fixed with 4% PFA 16-24 post-transfection and labelled with DAPI (300nM) before mounting on microscope slide. Fluorescence was visualized using Nikon TE2000U microscope.

Yeast assay

Saccharomyces cerevisiae strain L40 was used in all experiments as described (Rhee et al, 2000). Introduction of plasmid DNA in yeast was performed following the LiAc TRAF0 Method as described (Agatep et al 1998). For quantitation of growth, yeast were grown in tryptophan dropout minimal medium, harvested and diluted to an optical density of $A_{600} = 0.5$. Serial fivefold dilutions were prepared from the resulting culture and 5 μ l of each dilution was spotted on appropriate selective medium plates (tryptophan dropout or tryptophan/histidine dropout). The liquid β -galactosidase assay was performed as described (Miller 1972). Briefly, yeasts were grown in tryptophan dropout minimal medium until the cultures reach an optical density of $A_{600} = 0.5$. Cells were harvested, lysed and incubated for 15 min at 37°C with freshly made ONPG solution (4mg/ml). The resulting mix was analyzed in a spectrophotometer set at A_{420} . The units of β -galactosidase activity were calculated according to the formula $(A_{420} \times 1000) / (t \times V \times A_{600})$ where $t = 15$ minutes and V is the volume of culture in ml.

Northwestern and Western assays

COS7 cells were transfected with 2-4 μ g plasmid cDNA using the calcium phosphate precipitation technique and lysed 16 h post transfection as described (Wickham et al 1999). Cell extracts were immunoprecipitated using mouse monoclonal anti-Staufen antibody as described (Duchaîne et al, 2000). The resulting immunoprecipitate was separated by SDS-PAGE and analyzed by Northwestern assay using a [32 P] labelled bicoid 3'UTR RNA as a probe and by Western assay using rabbit anti-Staufen antibody (α L5) as described (Wickham et al 1999).

Results

Staufen contains a functional NLS

Although endogenous Staufen was shown to be mainly expressed in the cytoplasm in association with ribosomes and/or the RER (Marion et al., 1999; Wickham et al., 1999), overexpression of transfected Staufen lead to additional accumulation of the protein into the nucleolus (Marion et al., 1999; Le et al 2000). Consistently, computer analysis of Staufen sequence reveals the presence of two potential NLS, a bipartite NLS located at the end of dsRBD3 and a basic NLS located in dsRBD4 (Fig. 1). To determine whether the bipartite and/or basic NLS are functional, we used a yeast import assay (Rhee et al. 2000). This assay is based on the expression of a fusion protein containing a transcription factor lacking an import activity and a tested protein that carries a putative NLS (pNIA fusion). Additional fusion of virE2 to this protein further prevents passive diffusion of small proteins in the nucleus (pNIAE2 fusion). A functional NLS in the tested protein enables active nuclear import of the fusion protein which then activates transcription of two reporter genes: the *lacZ* gene encoding the β -galactosidase enzyme and the *HIS3* gene that enables growth of yeast on histidine deprived media.

We first fused Staufen to pNIA and tested whether Staufen's putative NLS allow import of the fusion protein in the nucleus. Figure 2 demonstrates that pNIA-Staufen induces significant reporter gene activation. This result clearly indicates that Staufen contains functional NLS that efficiently import the protein in the nucleus. To identify the functional NLS, we next tested the import ability of several Staufen regions fused to pNIAE2. Only the regions containing the bipartite NLS domain triggered activation of both reporter genes, suggesting that the bipartite NLS is necessary and sufficient for Staufen import activity (Fig. 2).

Characterization of the bipartite NLS

Typical bipartite NLS consensus sequences are composed of two stretches of basic amino acids separated by a spacer of 10-12 amino acids (Robbins et al 1991). To

confirm the implication of the bipartite NLS in mediating Staufen nuclear import, we inserted point mutations in the bipartite NLS in the context of pNIA-Staufen. When lysine¹⁷⁰ in the first stretch or the first three basic amino acids in the second stretch (lysine¹⁸¹, arginine¹⁸³, lysine¹⁸⁵) of the NLS were mutated to asparagine, β -galactosidase activity was reduced (Fig. 3). In contrast, mutations of lysine¹⁶⁹ in the first stretch and of the last two lysines in the second stretch (lysine¹⁸⁶, lysine¹⁸⁷) did not affect nuclear import activity. These results clearly demonstrate that the bipartite NLS is responsible for Staufen nuclear import.

The bipartite NLS is also functional in mammals

To determine whether the bipartite NLS also functions in mammals, we first created a virE2-GFP fusion protein that is not able to passively diffuse in the nucleus, therefore ensuring that any nuclear localization will be exclusively due to active import. While GFP alone was found randomly distributed in the nucleus and cytoplasm (Fig. 4A), virE2-GFP was strictly found in the cytoplasm (Fig. 4B). Fusion of Staufen's bipartite NLS to virE2-GFP caused import of the protein in the nucleus (Fig. 4C), indicating that Staufen's NLS is effective for nuclear import in mammalian cells. Consistently, mutations in the NLS restricted the localization of NLS*-virE2-GFP to the cytoplasm and prevented its accumulation in the nucleus (Fig. 4D).

MOI activity is CRM1 and transcription independent

The presence of a functional NLS in Staufen raises the question of why this protein is not normally found in the nucleus of mammalian cells. This discrepancy can be explained by the existence of a rapid nucleo-cytoplasmic shuttling mechanism and/or a strong retention of the protein in the cytoplasm. This phenomenon was globally referred to as the modulation of import (MOI) activity by others (Strehblow et al, 2002). Therefore, the subcellular localization of Staufen depends on the competition between the nuclear import mediated by the bipartite NLS and the MOI activity. Consequently, destruction of the MOI activity should result in nuclear accumulation of Staufen.

To uncover a putative nuclear shuttling mechanism, we first tried to block Staufen nuclear export with drugs. The CRM1 export receptor is central to the mechanism of export of several proteins (Formero et al 1997; Fukuda et al, 1997; Neville et al. 1997, Ossareh-Nazari et al, 1997). To determine whether Staufen is exported from the nucleus via this receptor, we treated Staufen-GFP-transfected cells with Leptomycin B, a specific inhibitor of CRM1-mediated export. In these conditions, Staufen-GFP did not accumulate in the nucleus (data not shown), indicating that Staufen export is not dependent on CRM1. This result is consistent with the absence of a classical NES in Staufen. We also inhibited transcription from RNA polymerases I, II and/or III with varying concentrations of actinomycin D or with DRB to test whether Staufen exits the nucleus via interaction with RNA. These treatments did not induce nuclear accumulation of Staufen (data not shown).

dsRBD3 but not RNA-binding activity can interfere with MOI activity

To determine whether RNA-binding activity is involved in MOI activity, we expressed two Staufen mutants that carry point mutations in dsRBD3 : St/3*F-GFP (F135A) and St/3*K4-GFP (H131A, K133A, K153A, K154A) . Both mutants showed impaired RNA-binding activity in vitro (Fig. 5A; Luo et al., 2002). However, while phe¹³⁵ was shown to be important for the structure of Drosophila Staufen dsRBD3, the mutations of the four amino acids his¹³¹, lys¹³³, lys¹⁵³ and lys¹⁵⁴ are not likely to alter the structure of the domain because these residues were shown to be exposed at the surface of the protein in order to directly contact the dsRNA (Ramos et al., 2000).

When expressed in COS cells, a fraction of St/3*F-GFP was found in nucleolus (Fig. 5B). Nevertheless, most of the proteins were still localized in the cytoplasm. Interestingly, this mutation did not simply cause random accumulation of the protein in the nucleus as a result of MOI impairment but rather specifically targeted the protein to the nucleolus, suggesting that the mutation impairs or slows down the kinetic of a normal shuttling mechanism. In contrast, the subcellular localization of the St/3*K4 mutant fused to GFP was strictly cytoplasmic (Fig. 5B). These results suggest that Staufen transits through the nucleus/nucleolus and

that dsRBD3 is involved in this activity. Although this mutation interferes with normal MOI activity, it does not completely abolish this activity. In addition, comparison of the localization of the two mutants suggests that the nucleolar localization of the St/3*F mutant is due to structural modification of dsRBD3 rather than to loss of its RNA binding activity.

dsRBD3 and dsRBD4 cooperate for MOI activity

To confirm that dsRBD3 has a role in MOI activity and to identify other domain(s) involved in this function, we first expressed a series of Staufen mutants, each with a deletion of a specific domain. These mutants were fused to virE2-GFP to prevent their passive diffusion in the nucleus. Mutations that impair MOI activity should cause accumulation of mutated proteins in the nucleus. As seen in figure 6C, deletion of dsRBD3 resulted in nuclear accumulation of the fusion protein. The nuclear distribution was specific since it was dependent on a functional NLS (data not shown). In contrast, deletion of any other Staufen domain did not change the cytoplasmic distribution of the mutated proteins (figure 6) indicating that dsRBD3 is necessary for Staufen MOI activity. To test whether dsRBD3 is sufficient to confer MOI activity, we fused dsRBD3 to virE2-GFP. This protein also slightly accumulated in the nucleus indicating that the domain alone is not sufficient for full MOI activity (Fig. 7A). The nuclear localization of dsRBD3 is dependent on the presence of the NLS (Fig. 7B). Full MOI activity was restored when dsRBD3 is fused to dsRBD4 (Fig. 7C). Consistently, mutation/deletion of both dsRBD3 and dsRBD4 from the full length protein lead to nuclear accumulation (Fig. 7D). These results support a cooperative mechanism between dsRBD3 and dsRBD4 for nuclear trafficking and/or cytoplasmic retention.

dsRBD3 and dsRBD4 cooperate for cytoplasmic retention and nucleolar trafficking

MOI activity is a result of nuclear export and cytoplasmic retention. Therefore, to understand the importance of each mechanism, we look if domains known to be involved in cytoplasmic retention overlap with those involved in MOI activity. To

this aim, we expressed each Staufen domain fused to GFP. As seen in figure 8, dsRBD3-GFP showed a typical tubulovesicular and perinuclear staining pattern as did Staufen (Wickham et al., 1999). However, this protein was not as tightly retained in the cytoplasm as was the wild-type protein since it is removed by Triton treatment (Luo et al., 2002). In contrast, all other domains fused to GFP showed a random distribution in both the cytoplasm and the nucleus as did GFP alone (Fig. 8). These results show that dsRBD3 is necessary for at least minimal cytoplasmic retention. Accordingly, when mutated, dsRBD3*F-GFP was randomly localized within the cell (Fig. 9A) and was lost upon Triton treatment (not shown). Interestingly, the cytoplasmic retention can be rescued by fusing dsRBD3*F to dsRBD4 (Fig. 9B). The localization of dsRBD3*F-dsRBD4-GFP is no longer sensitive to Triton (not shown). These observations suggest that although dsRBD3 alone is sufficient, cooperation with dsRBD4 is required to stabilize or strengthen interaction involved in cytoplasmic retention. Consistently, mutation of dsRBD3 coupled to deletion of dsRBD4 from full-length Staufen (St/3*F/ Δ 4) caused an almost exclusive localization of the protein in the nucleus (Fig. 9C). These results indicate that the determinants involved in MOI activity are also involved in cytoplasmic retention.

Interestingly, cytoplasmic retention of the mutants paralleled nucleolar distribution. Both dsRBD3-GFP (Fig. 8) and dsRBD3*F-dsRBD4-GFP (Fig. 9B) accumulated in the nucleolus whereas all other fusion proteins containing different wild-type or mutated Staufen domains were randomly distributed and does not accumulate in the nucleolus. Therefore, dsRBD3 seems to be the only domain able to interact with the nucleolus while dsRBD4 seems to strengthen this interaction. This specific interaction between dsRBD3 and the nucleolus once again argues for a specific trafficking of Staufen through the nucleus.

Discussion

mRNA localization is a dynamic process that involves the formation of ribonucleoprotein complexes that are continually modified through binding and/or release of protein partners. The molecular mechanisms responsible for regulating efficient transport and/or translation of RNPs are still unclear, especially the spatial and temporal organizations that govern specific interactions between several proteins and the transported RNA-protein complexes. Selection of mRNAs to be transported and initial assembly into ribonucleoprotein complexes are likely to occur in the nucleus. Staufen is a component of moving ribonucleoproteins complexes that is also associated in the cytoplasm with ribosomes and the rough endoplasmic reticulum. However, the subcellular compartment in which Staufen is initially recruited within RNPs is still not known. In this study, we provide evidence that Staufen can enter the nucleus where it might interact with RNPs. We identified a bipartite NLS at the C-terminal end of dsRBD3 which is sufficient to mediate nuclear import of reporter proteins. However, no typical NES was found and the putative determinant identified as necessary for the MOI are also involved in cytoplasmic retention. Although one mechanism does not exclude the other, our results suggest that the MOI activity acts more by interfering with import, through cytoplasmic retention, than by allowing rapid export. They also suggest that nuclear import is a regulated mechanism.

MOI activity: cytoplasmic retention vs nuclear transit

If Staufen contains a functional NLS and enters the nucleus, why has endogenous Staufen not been observed in the nucleus before. At least two pieces of information may explain this discrepancy. First, the bipartite NLS itself is relatively poorly functional as compared to the import activity of the SV40-type NLS. When fused to a reporter protein, Staufen NLS did not allow import of all the protein pool. Since the reporter protein itself is not normally retained in the cytoplasm nor exported from the nucleus, these results demonstrate that Staufen NLS is relatively weak. Second, Staufen carries molecular determinants that

strongly retained the protein in the cytoplasm and its association with the cytoskeleton is resistant to detergent, to EDTA and to relatively high concentrations of KCl (Wickham et al, 1999 and data not shown). Altogether, these observations suggest that export of Staufen from the nucleus is probably much more efficient than its import, explaining its almost exclusive presence in the cytoplasm. In addition, it is possible that only a fraction of the Staufen pool enters the nucleus and therefore that nuclear import is regulated.

Several lines of evidence also suggest that Staufen nevertheless shuttles through the nucleus. First, Staufen carries a functional NLS sufficient to import a foreign protein in the nucleus. Second, overexpression of the wild-type protein or modification of the structure of dsRBD3 both lead to Staufen accumulation into the nucleolus. Staufen overexpression may saturate the export pathway while dsRBD3 structural changes may impair interaction with component(s) of this pathway. Staufen specific localization in the nucleolus rather than random accumulation in the nucleus further argues in favour of a specific shuttling mechanism. Third, Staufen was shown to interact with telomerase RNA (Le et al, 2000, Bachand et al. 2001), documenting once again its presence in the nucleus/nucleolus.

The mechanism and the nature of the cofactors that allow Staufen export from the nucleus are not known. We tested two candidate molecules being able to play this role: mRNA and ribosomes. Unfortunately, Staufen did not accumulate in the nucleus upon inhibition of transcription, suggesting that Staufen export is not dependent of mRNA. However, this experiment did not completely rule out this hypothesis since several nuclear shuttling proteins known to depend on RNA binding to be exported are found to accumulate in the cytoplasm after actinomycin D treatments (Pinol-Roma and Dreyfuss, 1992; Michael et al, 1997). Similarly, Leptomycin B did not cause Staufen accumulation in the nucleus/nucleolus demonstrating that Staufen does not exit the nucleus along with ribosomes or more generally by the CRM1-dependent pathway. The nuclear export of Staufen might

however be dependent on the newly identified exportin-5 factor (Brownawell and Macara, 2002). This export factor was shown to mediate nuclear export of dsRBD-containing protein in a Ran-dependent but CRM1-independent way. Exportin-5/dsRBD interactions were broken upon addition of dsRNA reflecting that exportin-5 and dsRNA compete for binding dsRBD. Interestingly, a mutation in Staufen dsRBD3 that induces a partial misfolding of dsRBD3 causes Staufen accumulation in the nucleolus whereas mutations that inhibit RNA-binding activity but do not modify the structure of the domain does not. The former observation could reflect a reduced affinity of Staufen dsRBD3 for exportin-5 resulting in a slower nuclear export while the latter one is consistent with the fact that exportin-5 binds RNA-free dsRBD.

dsRBD cooperation

Our results highlight a novel role for Staufen dsRBD3. dsRBD3 seems to be the minimal domain required for MOI activity. Its deletion from the full-length protein causes the accumulation of the mutated protein in the nucleus and its expression in fusion with GFP generates a pattern of distribution similar to that of the wild-type protein. Nevertheless, fusion with dsRBD4 is necessary to overcome mutation in dsRBD3 and/or to gain full MOI activity. Since deletion of dsRBD4 alone from the full-length protein does not produce a noticeable phenotype, the role of this domain seems to be accessory rather than essential. Its role is likely to strengthen interactions between dsRBD3 and different cofactors. This cooperation between dsRBD3 and dsRBD4 was also documented for Staufen association with ribosomes (Luo et al., 2002). As shown for MOI activity, dsRBD3 was shown to be the major determinant involved in ribosome binding while dsRBD4 along with TBD played supporting role(s). This suggests that Staufen MOI activity may be acting mostly by cytoplasmic retention. Interestingly, the same domains also specifically interact with the nucleolus, suggesting that they are involved in a putative interaction with molecules that transit within the nucleolus. The requirement of dsRBD3-dsRBD4 for both ribosome association, cytoplasmic retention, MOI activity and nucleolar targeting suggests that these phenomenon

are linked together and probably highly regulated. Indeed, there is a clear parallel between cytoplasmic retention and nucleolar targeting. Whether these observations indicate that Staufen nucleolar trafficking is a first step toward cytoplasmic anchoring or not is still unknown.

A similar mechanism of cooperation between two dsRBD of human ADAR1, another member of the dsRBD family, has been described (Strehblow et al, 2002). In this case, one dsRBD interferes with nuclear localization of a reporter protein containing another dsRBD as an active NLS. However, the MOI activity of hsADAR requires the RNA-binding activity of both dsRBD that likely leads to masking of the NLS. This is not the case with Staufen since mutation affecting dsRBD3 RNA-binding activity does not destroy MOI activity. Furthermore, the cytoplasmic localization of the dsRBD3-dsRBD4-virE2-GFP fusion protein was not affected by a point mutation that destroys RNA-binding activity of both domains (data not shown).

Implication of Staufen in the nucle(ol)us

The presence of Staufen in the nucleus/nucleolus suggests several interesting roles for this RNA-binding protein in this subcellular compartment. First, transport into the nucleus may be necessary to select transported mRNAs and/or assemble competent RNP for mRNA transport. Many RNA-binding proteins involved in mRNA transport are known to shuttle between cytoplasm and nucleus to achieve their function. hnRNPA2, a mostly nuclear protein, bind to MBP mRNA in the nucleus before escorting it to its final destination in the myelin compartment of oligodendrocytes (Ainger et al 1997, Munro et al 1999, Izaurralde et al 1997). Similarly, ZBP a cytoplasmic protein enters the nucleus to select actin mRNA for transport (Ross et al 1997, Zhang et al 2001, Oleynikov and Singer 2003). Since Staufen is clearly implicated in RNA transport, its presence in the nuclear compartment might be important for the initial steps of RNA recognition and/or packaging of mRNP complexes. Second, nucleolus being the site of ribosome biogenesis, Staufen could have a role in this process. However, the characterized

determinants involve in Staufen's ribosomal association (RNA binding activity of dsRBD3 and combination of dsRBD4-TBD) do not seem to be required for its nucleolar localization since RBD3*F/RBD4-GFP construct is nucleolar (fig. 9B) whereas RBD4-TBD-GFP is not (our unpublished data). Third, recent studies have uncovered new functions associated with the nucleolus such as gene silencing, cell cycle progression, senescence, mRNA export and assembly of ribonucleoprotein (Pederson, 1998; Cockell and Gasser 1999; Garcia and Pillus, 1999). It is thus possible that Staufen plays additional role(s) in addition to mRNA transport and that a fraction of Staufen may be diverted into the nucleolus to fulfill these functions. An association between Staufen and hTR, the RNA component of the telomerase enzyme, and colocalization of Staufen with telomerase in the nucleolus are consistent with this hypothesis (Le et al. 2000, Bachand et al 2001). Further studies will be needed to determine the exact role of Staufen in the nucleus/nucleolus, the regulation of the import/export mechanisms and its relevance for Staufen-mediated mRNA transport and localization.

Acknowledgements

We thank XXX for technical assistance; Judith Kashul for editing the manuscript; Dr Vitaly Citovsky (New York, USA) for the yeast plasmids and strain. This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to LDG. CM was supported by an NSERC studentship.

Reference

- Ainger,K., Avossa,D., Diana,A.S., Barry,C., Barbarese,E., and Carson,J.H. (1997). Transport and localization elements in myelin basic protein mRNA. *J Cell Biol* 138, 1077-87.
- Bachand,F., Triki,I., and Autexier,C. (2001). Human telomerase RNA-protein interactions. *Nucleic Acids Res* 29, 3385-93.
- Broadus,J., Fuerstenberg,S., and Doe,C.Q. (1998). Staufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature* 391, 792-5.
- Brownawell,A.M. and Macara,I.G. (2002). Exportin-5, a novel karyopherin, mediates nuclear export of double- stranded RNA binding proteins. *J Cell Biol* 156, 53-64.
- Cockell,M.M. and Gasser,S.M. (1999). The nucleolus: nucleolar space for RENT. *Curr Biol* 9, 575-6.
- Duchaine,T., Wang,H.J., Luo,M., Steinberg,S.V., Nabi,I.R., and DesGroseillers,L. (2000). A novel murine Staufen isoform modulates the RNA content of Staufen complexes. *Mol Cell Biol* 20, 5592-601.
- Ephrussi,A., Dickinson,L.K., and Lehmann,R. (1991). Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell* 66, 37-50.
- Garcia,S.N. and Pillus,L. (1999). Net results of nucleolar dynamics. *Cell* 97, 825-8.
- Hoek,K.S., Kidd,G.J., Carson,J.H., and Smith,R. (1998). hnRNP A2 selectively binds the cytoplasmic transport sequence of myelin basic protein mRNA. *Biochemistry* 37, 7021-9.

Izaurralde,E., Kutay,U., von Kobbe,C., Mattaj,I.W., and Gorlich,D. (1997). The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *Embo J* 16, 6535-47.

Kiebler,M.A., Hemraj,I., Verkade,P., Kohrmann,M., Fortes,P., Marion,R.M., Ortin,J., and Dotti,C.G. (1999). The mammalian staufen protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J Neurosci* 19, 288-97.

Kim-Ha,J., Smith,J.L., and Macdonald,P.M. (1991). oskar mRNA is localized to the posterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Cell* 66, 23-35.

Kloc,M., Zearfoss,N.R., and Etkin,L.D. (2002). Mechanisms of subcellular mRNA localization. *Cell* 108, 533-44.

Kohrmann,M., Luo,M., Kaether,C., DesGroseillers,L., Dotti,C.G., and Kiebler,M.A. (1999). Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol Biol Cell* 10, 2945-53.

Krichevsky,A.M. and Kosik,K.S. (2001). Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation- dependent translation. *Neuron* 32, 683-96.

Le,S., Sternglanz,R., and Greider,C.W. (2000). Identification of two RNA-binding proteins associated with human telomerase RNA. *Mol Biol Cell* 11, 999-1010.

Li,P., Yang,X., Wasser,M., Cai,Y., and Chia,W. (1997). Inscuteable and Staufen mediate asymmetric localization and segregation of prospero RNA during *Drosophila* neuroblast cell divisions. *Cell* 90, 437-47.

Luo,M., Duchaine,T.F., and DesGroseillers,L. (2002). Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen- ribosome association. *Biochem J* 365, 817-24.

Mallardo,M., Deitinghoff,A., Muller,J., Goetze,B., Macchi,P., Peters,C., and Kiebler,M.A. (2003). Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2100-5.

Marion,R.M., Fortes,P., Beloso,A., Dotti,C., and Ortin,J. (1999). A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 19, 2212-9.

Michael,W.M., Eder,P.S., and Dreyfuss,G. (1997). The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *Embo J* 16, 3587-98.

Munro,T.P., Magee,R.J., Kidd,G.J., Carson,J.H., Barbarese,E., Smith,L.M., and Smith,R. (1999). Mutational analysis of a heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 response element for RNA trafficking. *J Biol Chem* 274, 34389-95.

Neville,M., Stutz,F., Lee,L., Davis,L.I., and Rosbash,M. (1997). The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. *Curr Biol* 7, 767-75.

Norvell,A., Kelley,R.L., Wehr,K., and Schupbach,T. (1999). Specific isoforms of squid, a *Drosophila* hnRNP, perform distinct roles in Gurken localization during oogenesis. *Genes Dev* 13, 864-76.

Ohashi,S., Koike,K., Omori,A., Ichinose,S., Ohara,S., Kobayashi,S., Sato,T.A., and Anzai,K. (2002). Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor. *J Biol Chem* 277, 37804-10.

Oleynikov,Y. and Singer,R.H. (2003). Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization. *Curr Biol* 13, 199-207.

Ossareh-Nazari,B., Bachelier,F., and Dargemont,C. (1997). Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export. *Science* 278, 141-4.

Palacios,I.M. and St Johnston,D.S. (2001). Getting the message across: the intracellular localization of mRNAs in higher eukaryotes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 569-614.

Pederson,T. (1998). The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res* 26, 3871-6.

Pinol-Roma,S. and Dreyfuss,G. (1992). Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature* 355, 730-2.

Ramos,A., Grunert,S., Adams,J., Micklem,D.R., Proctor,M.R., Freund,S., Bycroft,M., St Johnston,D., and Varani,G. (2000). RNA recognition by a Staufen double-stranded RNA-binding domain. *Embo J* 19, 997-1009.

Rhee,Y., Gurel,F., Gafni,Y., Dingwall,C., and Citovsky,V. (2000). A genetic system for detection of protein nuclear import and export. *Nat Biotechnol* 18, 433-7.

Robbins,J., Dilworth,S.M., Laskey,R.A., and Dingwall,C. (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64, 615-23.

Ross,A.F., Oleynikov,Y., Kislauskis,E.H., Taneja,K.L., and Singer,R.H. (1997). Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol Cell Biol* 17, 2158-65.

St Johnston,D., Beuchle,D., and Nusslein-Volhard,C. (1991). Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* 66, 51-63.

St Johnston,D., Brown,N.H., Gall,J.G., and Jantsch,M. (1992). A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10979-83.

Strehblow,A., Hallegger,M., and Jantsch,M.F. (2002). Nucleocytoplasmic Distribution of Human RNA-editing Enzyme ADAR1 Is Modulated by Double-stranded RNA-binding Domains, a Leucine-rich Export Signal, and a Putative Dimerization Domain. *Mol Biol Cell* *13*, 3822-35.

Wickham,L., Duchaine,T., Luo,M., Nabi,I.R., and DesGroseillers,L. (1999). Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* *19*, 2220-30.

Zhang,H.L., Eom,T., Oleynikov,Y., Shenoy,S.M., Liebelt,D.A., Dichtenberg,J.B., Singer,R.H., and Bassell,G.J. (2001). Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNP complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron* *31*, 261-75.

Table I

Oligonucleotide primers used in PCR amplification to construct different Staufen mutants and/or fusion proteins

Construct name	Template	Oligonucleotides sequences ^a	Restriction sites
pNIA-Staufen	RSV-hSt	5' AATTGGTACCTGCACTGTGCGTGAACTTGA 3' 5' TATAGTCGACGGCCAGAAAAGGT 3'	KpnI Sall
PNIAE2-Nterm	RSV-hSt	5' ACCAATGTATAAGCCTGTTGACCCTTAC 3' 5' TCAAGAACAGCTATGGCATTTC 3'	---
pNIAE2-NLS's	RSV-hSt	5' CGCCATAGCTGTTCTTGA 3' 5' TTTCCAACCTTCACCTG 3'	---
pNIAE2-NLSbipartite	RSV-hSt	5' CGCCATAGCTGTTCTTGA 3' 5' GGGCTTGTCTGTGGCTTACTATGGGTT 3'	---
pNIAE2-NLSbasic	RSV-hSt	5' GCCAGAGTACACGCTCCTCACAGAG 3' 5' TTTCCAACCTTCACCTG 3'	---
pNIAE2-Cterm	RSV-hSt	5' CACTGCAGAAGGAACGGGCACCAAC 3' 5' CACCTCCCACACACAGACATTGGTCC 3'	---
virE2-GFP	pNIAE2	5' AATTCCCGGGCGGCCG CCGAAGGCCGAAGGCAAT 3' 5' AATTGGATCCAGACTGTTTACGGTTGGGCC 3'	XmaI BamHI
NLS-virE2-GFP	pNIA-hSt	5' TATAGGTACCTAAGCCACCATGGAAGGTGAAGGGAAAAGCAAG 3' 5' TATATCTAGATTATCAGCGGCCGCGGCTTGTCTGTGGCTTGAC 3'	KpnI NotI
NLS*-virE2-GFP	pNIA-hSt mNLS4	5' TATAGGTACCTAAGCCACCATGGAAGGTGAAGGGAAAAGCAAG 3' 5' TATATCTAGATTATCAGCGGCCGCGGCTTGTCTGTGGCTTGAC 3'	KpnI NotI
RBD3-virE2-GFP	pNIA-hSt	5' TAGATATCGAATTCGCCGCCATGGGAAAATCTGAAATAAGT 3' 5' TATATCTAGATTATCAGCGGCCGCGGCTTGTCTGTGGCTTGAC 3'	EcoRV NotI
RBD3-NLS*-virE2-GFP	pNIA-hSt mNLS4	5' TAGATATCGAATTCGCCGCCATGGGAAAATCTGAAATAAGT 3' 5' TATATCTAGATTATCAGCGGCCGCGGCTTGTCTGTGGCTTGAC 3'	EcoRV NotI
RBD2-GFP	RSV-hSt	5' TAGATATCGAATTCGCCGCCATGGGATAACCATTTCCAG 3' 5' TATACTCGAGGATATCAGGATCCTCAA 3'	EcoRI EvoRV
RBD3-GFP	RSV-hSt	5' TAGATATCGAATTCGCCGCCATGGGAAAATCTGAAATAAGT 3' 5' TATATCTAGATTATCAGCGGCCGCGGCTTGTCTGTGGCTTGAC 3'	EcoRI ---
RBD3*F-GFP	RSV-hSu3*F	5' TAGATATCGAATTCGCCGCCATGGGAAAATCTGAAATAAGT 3' 5' TATATCTAGATTATCAGCGGCCGCGGCTTGTCTGTGGCTTGAC 3'	EcoRI ---
RBD4-GFP	RSV-hSt	5' TAGATATCGAATTCGCCGCCATGGGAAATCCGATTAGC 3' 5' TATACTCGAGGATATCAAGGATCTCCAG 3'	EcoRI EcoRV
TBD-GFP	RSV-hSt	5' TAGATATCCAATTGGCCGCCATGGGAAAACCCGCACT 3' 5' TATACTCGAGGATATCGGCAGTTACCGTGGC 3'	MunI EcoRV
RBD5-GFP	RSV-hSt	5' TAGATATCGAATTCGCCGCCATGGGACCCTCTGAGCAA 3' 5' TATACTCGAGGATATCGCACCTCCCACACAC 3'	EcoRI EcoRV
RBD3*F/RBD4-GFP	RSV-hSu3*F	5' TAGATATCGAATTCGCCGCCATGGGAAAATCTGAAATAAGT 3' 5' TATACTCGAGGATATCAAGGATCTCCAG 3'	EcoRI EcoRV

^a The restriction enzyme sequences are italicized in the sequences.

Table II

Oligonucleotide primers used in all around / QuickMut PCR amplification to construct different Staufen mutants

Construct name	Template	Oligonucleotides sequences ^{a,b}	Restriction sites
pNIA-hSt mNLS1	pNIA-hSt	5' CTTGAGGAGCTGAAGAAGTTACCGCCCCTGCCTG 3' 5'TGCAGGCAGGGGCGGTAAGTTCTTCAGCTCCTCAAGAACAGCTATGGC3'	--- ---
pNIA-hSt mNLS2	pNIA-hSt	5' GAGCTGAACAAGTTACCGCCCCTGCCTGCAGTTG 3' 5'TGCAGGCAGGGGCGGTAAGTTGTTTCAGCTCCTCAAGAACAGCTATGGC3'	--- ---
pNIA-hSt mNLS3	pNIA-hSt	5' CTATGGGTTTTGTATTGTTTTTGATTCTAGGC 3' 5'GTTGAACGAGTAAAGCCTAGAATCAAAAACAATACAAAACCCATAGTC3'	--- ---
pNIA-hSt mNLS4	pNIA-hSt	5' GTTTGTGTTTTCTTATTGATGCTAGGATTTACTCGTTCAAC 3' 5'GTTGAACGAGTAAATCCTAGCATCAATAAGAAAAACAAAACCC3'	--- ---
StΔ3-virE2-GFP	pNIA-hSt	5' GAGATTTTCTTCTTCGGATTCTCTTCC 3' 5' GCCGCCATAGCTGTTCTTGAGGAGCTG 3'	--- ---
St/3*K4-GFP	(i) RSV-hSt (ii) RSV- hSt/3*K2 (iii) hSt/3*K2- GFP	5' AGCGCGGCGATTTCAAAGAAAAATGCC 3' 5' AATCGCCGCGTTTTCCCTTACC 3' 5' TATATGATATCACCAATGTATAAGCCT 3' 5' TATACTCGAGGATATCGCACCTCCACACAC 3' 5' GTGGCCACCCGCCATGGCGAACTTTGTGACC 3' 5' GGTCACAAAGTTCGCCATGGCGGGTGGGCCAC 3'	EcoRV EcoRV

^aThe restriction enzyme sequences are italicized in the sequences.^bMutations are shown in bold in the sequence

Figure 1. Schematic representation of Staufen and Staufen mutants. Staufen and Staufen mutants used in this study are depicted. Grey and white boxes represent the major (dsRBD3) and minor (dsRBD4) RNA-binding domains, respectively, while black boxes represent regions with RNA-binding consensus sequence but lacking RNA-binding activity *in vitro*. The hatched box indicates the position of the region similar to the MAP1B microtubule-binding domain. The position of the bipartite (white diamond) and basic (black diamond) NLS is indicated. F: mutation F135A in dsRBD3. K4: mutations H131A, K133A, K153A and K154A in dsRBD3. *: mutation K181N, R183S, K185N in the bipartite NLS.

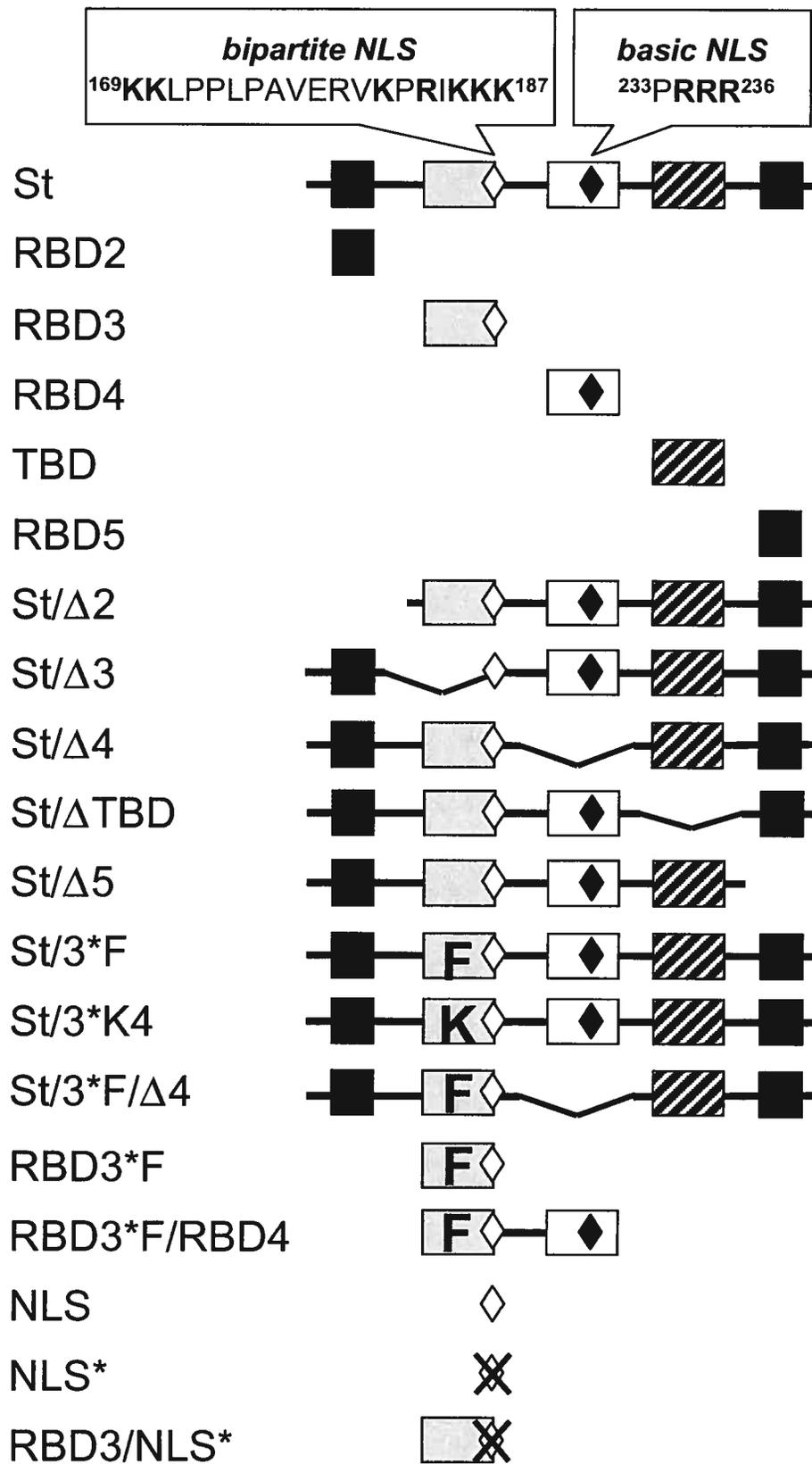


Figure 2. Staufen contains a functional bipartite NLS. Staufen and Staufen domains (**A**) were fused to the transcription factor LexA-Gal4 and to virE2 and expressed in yeast cells. The presence of a functional NLS in Staufen causes import of the fusion protein in the nucleus and activation of the *His* (**B**) and β -galactosidase (**C**) genes. (**B**) Selection assay by cell growth on minimal medium deficient for histidine (His⁻) or containing histidine (His⁺) (**C**) Quantitative β -galactosidase assay in liquid following cell growth in minimal medium. β -galactosidase activity is shown as a percentage of the maximal activity generated with the SV40-type NLS (pNEAE2) .

1: pNIA-hSt; 2: pNIAE2-Nterm; 3: pNIAE2-NLSs; 4: pNIAE2-NLSbasic; 5: pNIAE2-NLSbipartite; 6: pNIAE2-Cterm; 7: pNEAE2 (the LexA-Gal4-VirE2 protein fused to the SV40 NLS); 8: pNIAE2 (the LexA-Gal4-VirE2 fusion protein without NLS).

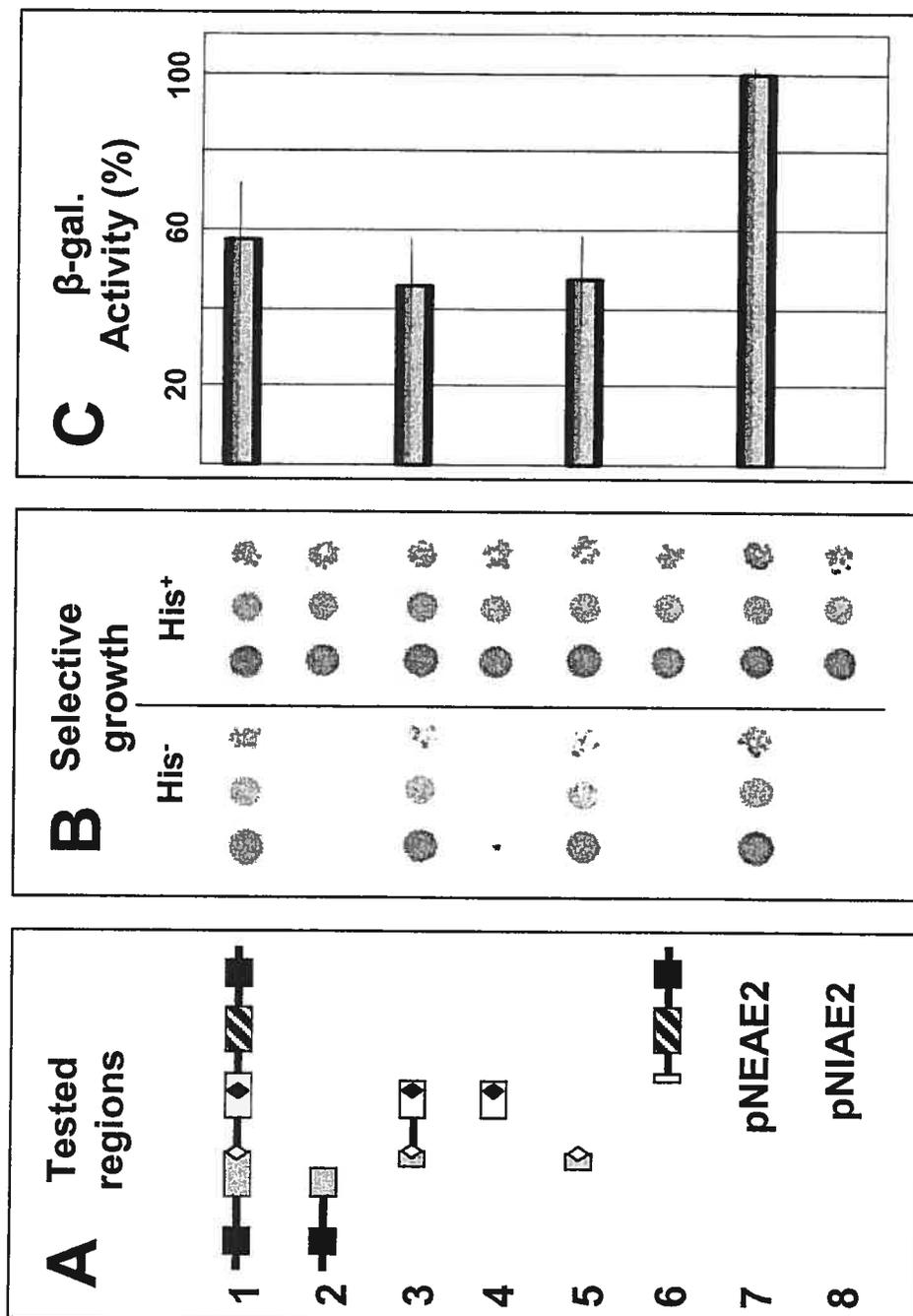
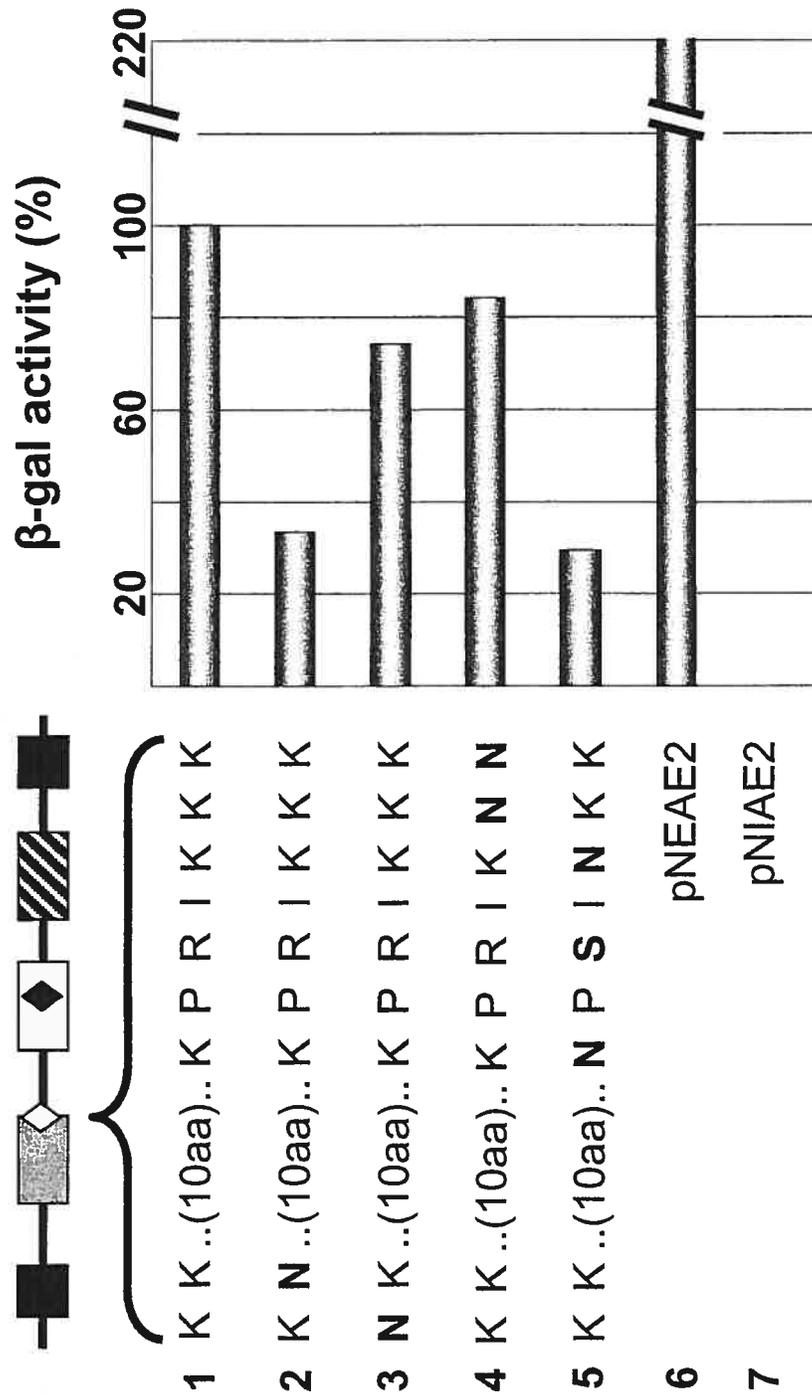


Figure 3. Mutations in the bipartite NLS abolish nuclear import. The wild-type and bipartite NLS mutants of the pNIA-hSt fusion protein were expressed in yeasts and tested for their ability to activate β -galactosidase activity. Staufen NLS-induced β -galactosidase activity is shown as a percentage of the activity generated by the pNIA-hSt construct. Mutated amino acids are shown in bold. 1: pNIA-hSt; 2: pNIA-hStmNLS1; 3: pNIA-hStmNLS2; 4: pNIA-hStmNLS3; 5: pNIA-hStmNLS4; 6: pNEAE2 (the LexA-Gal4-VirE2 protein fused to the SV40 NLS); 7: pNIAE2 (the LexA-Gal4-VirE2 fusion protein without NLS).



1
2
3
4
5
6
7

K K ..(10aa).. K P R I K K K
 K N ..(10aa).. K P R I K K K
 N K ..(10aa).. K P R I K K K
 K K ..(10aa).. K P R I K N N
 K K ..(10aa).. N P S I N K K
 pNEAE2
 pNIAE2

Figure 4. The bipartite NLS is also functional in mammalian cells. COS cells were transfected with 2 μg of cDNA coding for GFP alone (**A,A'**), virE2-GFP (**B,B'**), Staufen wild type bipartite NLS fused to virE2-GFP (**C,C'**) or Staufen mutated NLS (mNLS4) fused to virE2-GFP (**D,D'**). Their subcellular localization, 16h post-transfection, was monitored by GFP autofluorescence (**A,B,C,D**). Nuclei were stained with 300 nM DAPI solution (**A',B',C',D'**). Scale bar: 15.6 μm .

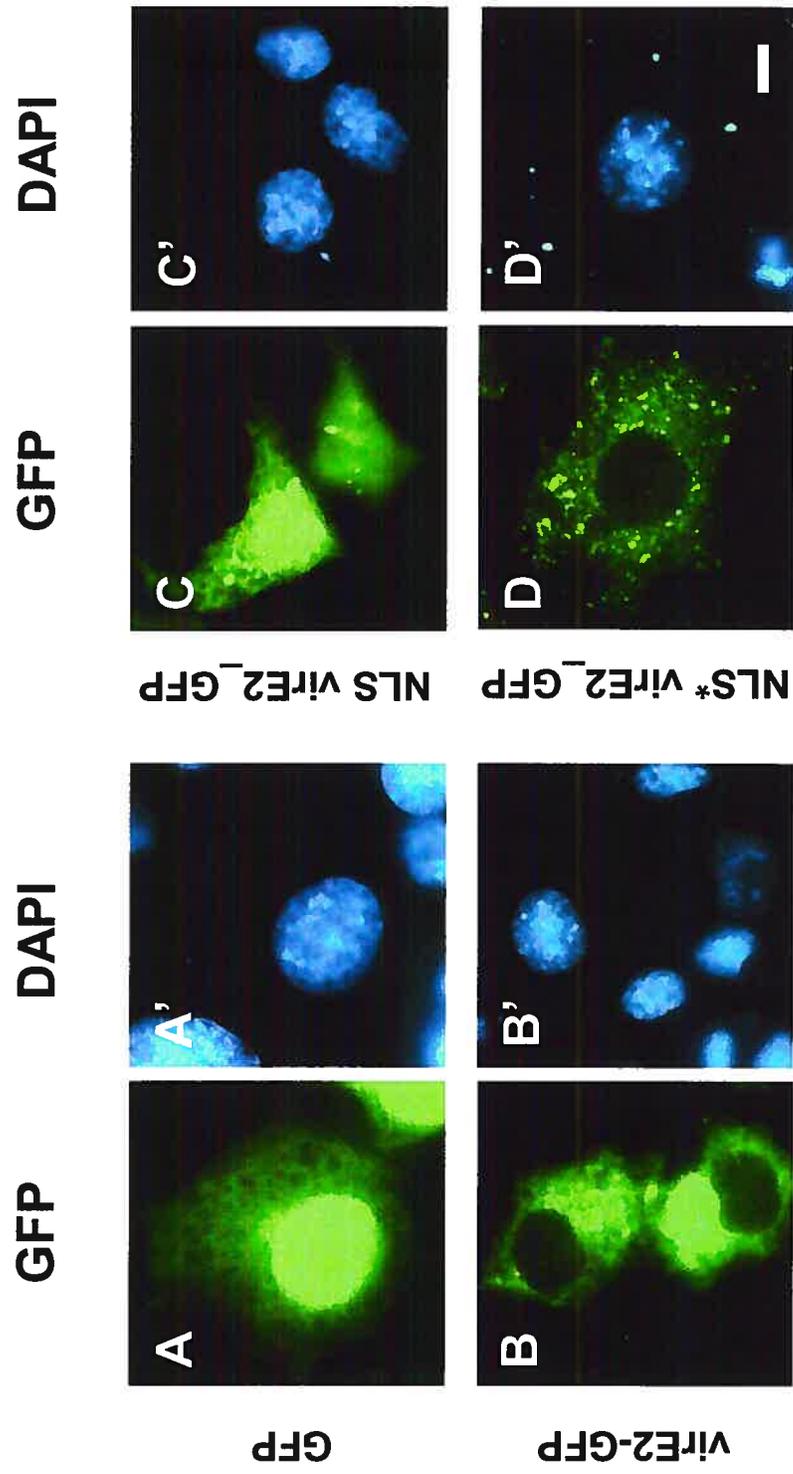


Figure 5. Subcellular localization of RNA-binding deficient Staufen mutants. COS cells were transfected with 2 μ g of cDNA coding for either St-GFP (**a,a'**), St/3*F-GFP (**b,b'**) or St/3*K4-GFP (**c,c'**). (**A**) RNA-binding activity of Staufen mutants. Cell extracts from mock transfected cells (lane 1), or cells expressing St-GFP (lane 2), St/3*K4-GFP (lane 3) or St/3*F-GFP (lane 4) were immunoprecipitated with mouse monoclonal anti-human Staufen antibodies (11C6) and analyzed by SDS PAGE. Upper panel: Northwestern analysis using [32 P]labeled 3'UTR bicoïd mRNA. Lower panel : Western blot of the same immunoprecipitates using rabbit anti-Staufen antibody. (**B**) Transfected cells were fixed 16h post-transfection and the subcellular localization of each construct was monitored by GFP autofluorescence (**a,b,c**). Nuclei were stained with 300 nM DAPI solution (**a',b',c'**). Scale bar: 15.6 μ m.

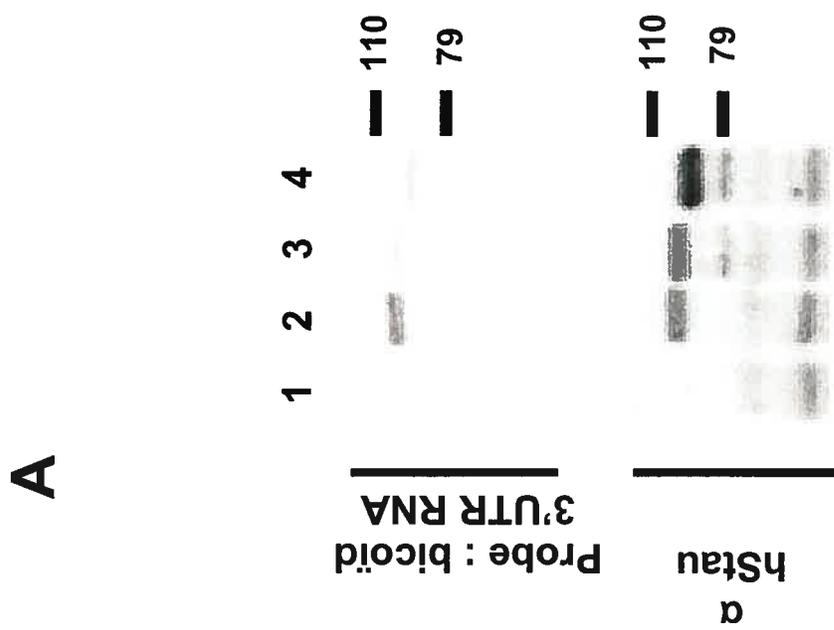
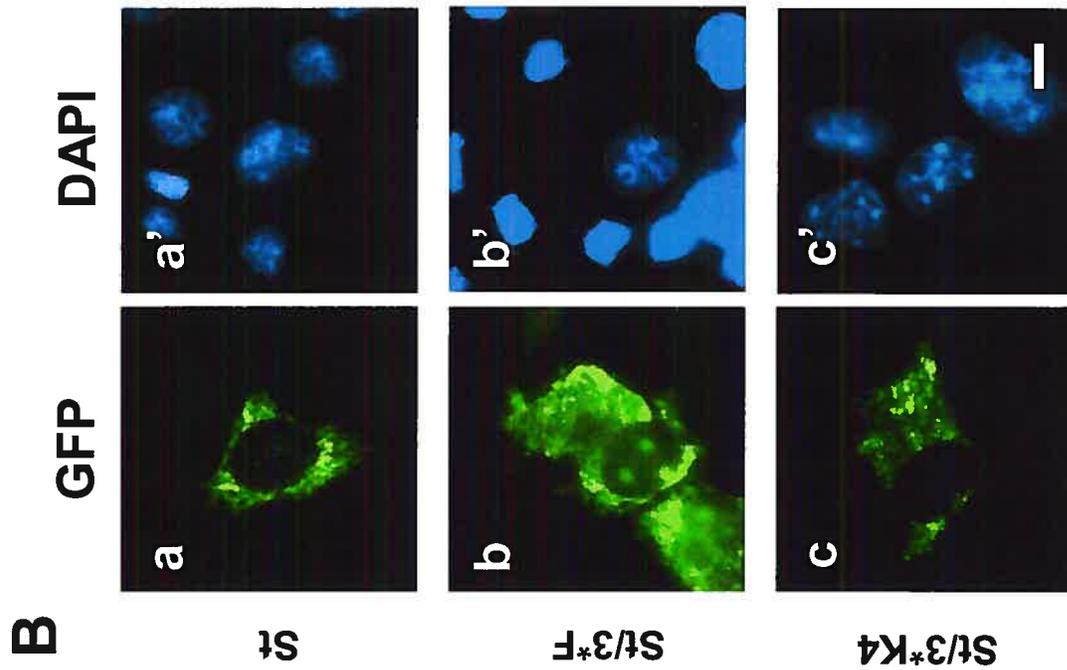


Figure 6. Deletion of dsRBD3 impairs Staufen MOI activity. COS cells were transfected with 2 μg of cDNA coding for different Staufen mutants lacking individual domain fused to virE2-GFP. Transfected cells were fixed 16h post-transfection and the subcellular localization of each construct was monitored by GFP autofluorescence (**A,B,C,D,E,F**). Nuclei were stained with 300 nM DAPI solution (**A',B',C',D',E',F'**). (**A,A'**) St-virE2-GFP, (**B,B'**) St/ Δ 2-virE2-GFP, (**C,C'**) St/ Δ 3-virE2-GFP, (**D,D'**) St/ Δ 4-virE2-GFP, (**E,E'**) St/ Δ TBD-virE2-GFP, (**F,F'**) St/ Δ 5-virE2-GFP. Scale bar: 15.6 μm .

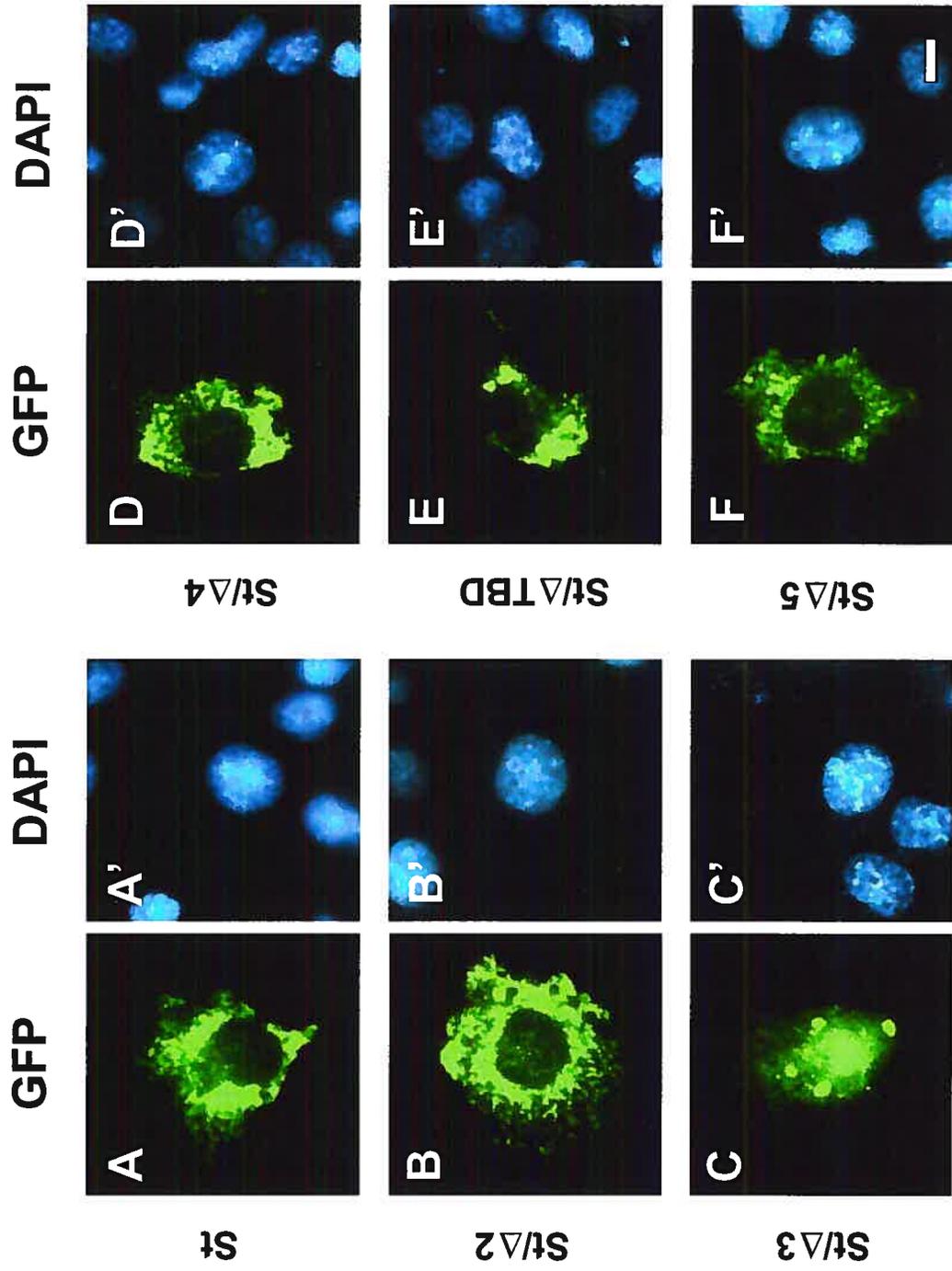


Figure 7. dsRBD3 cooperates with dsRBD4 for Staufen MOI activity. COS cells were transfected with 2 μ g of cDNA coding for RBD3-virE2-GFP (**A,A'**), RBD3NLS*-virE2-GFP (**B,B'**), RBD3/RBD4-virE2-GFP (**C,C'**) or St/3*F/ Δ 4-virE2-GFP (**D,D'**). Transfected cells were fixed 16h post-transfection and the subcellular localization of each construct was monitored by GFP autofluorescence (**A,B,C,D**). Nuclei were stained with 300 nM DAPI solution (**A',B',C',D'**). Scale bar: 15.6 μ m.

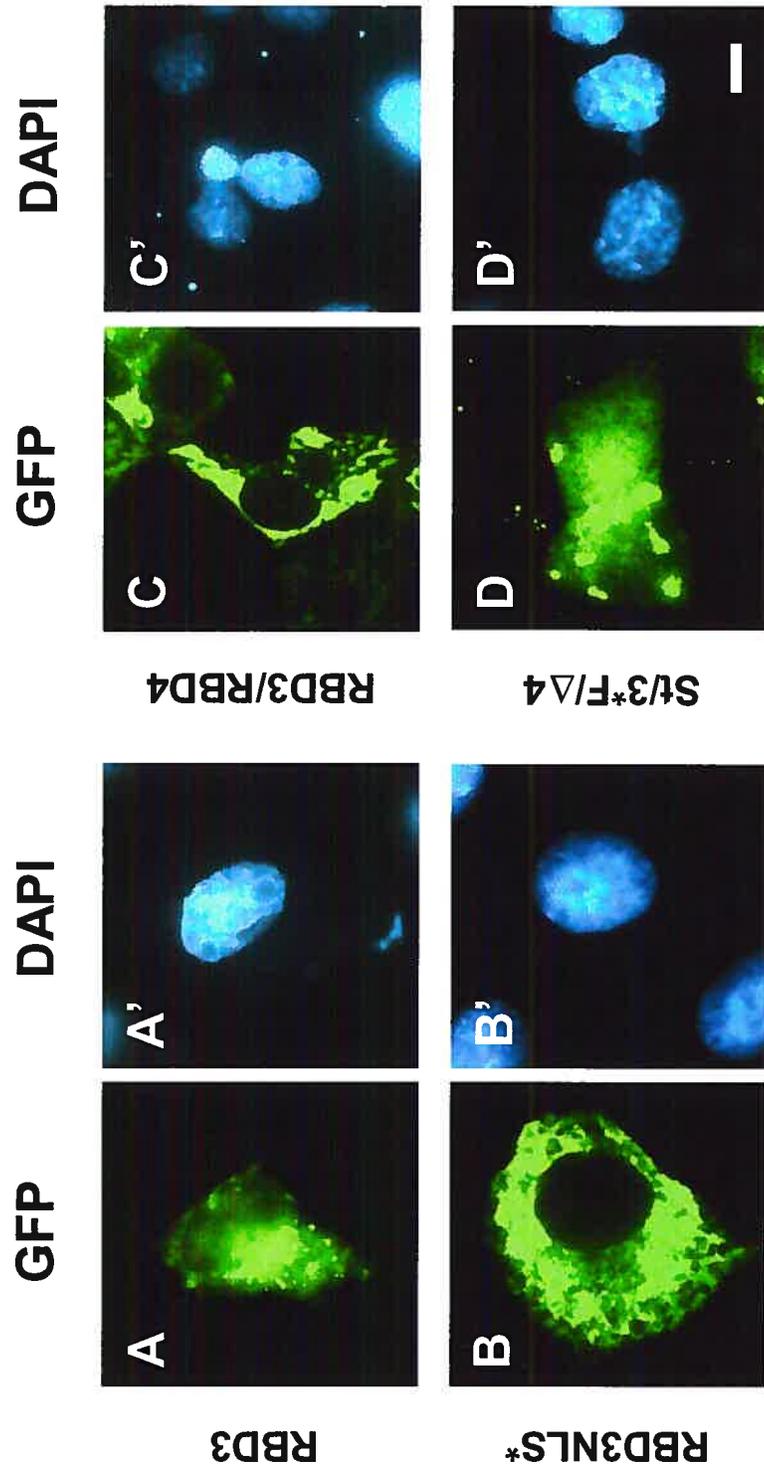


Figure 8. dsRBD3 is involved in Staufen cytoplasmic retention. COS cells were transfected with 2 μg of cDNA coding for RBD2-GFP (**A,A'**), RBD3-GFP (**B,B'**), RBD4-GFP (**C,C'**), TBD-GFP (**D,D'**), RBD5-GFP (**E,E'**). Transfected cells were fixed 16h post-transfection and the subcellular localization of each construct was monitored by GFP autofluorescence (**A,B,C,D,E**). Nuclei were stained with 300 nM DAPI solution (**A',B',C',D',E'**). Scale bar: 15.6 μm .

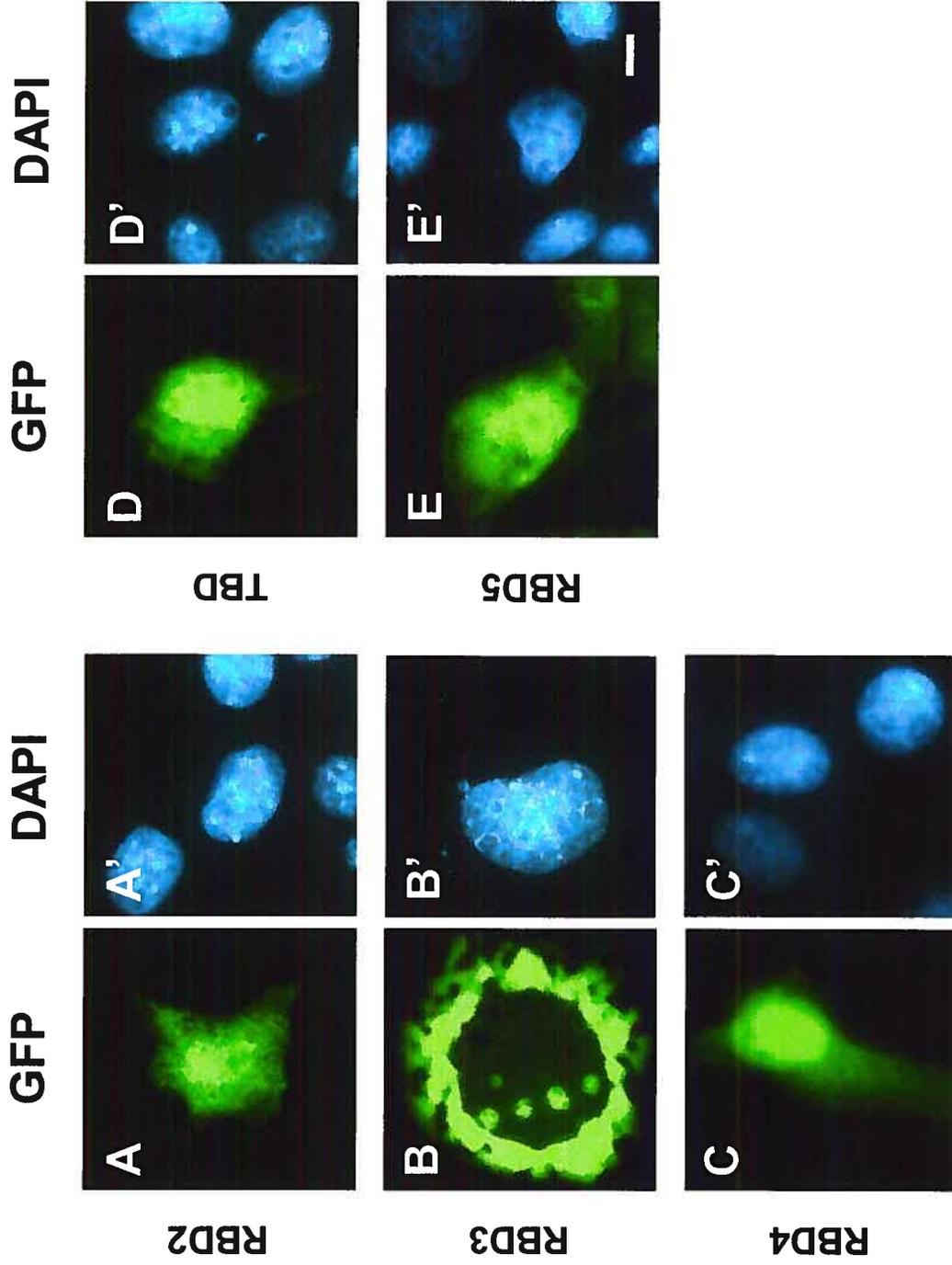
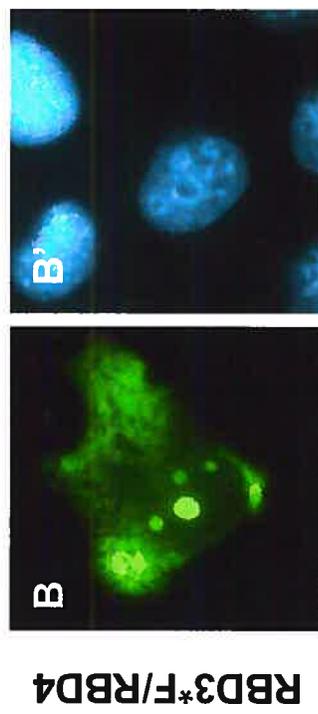
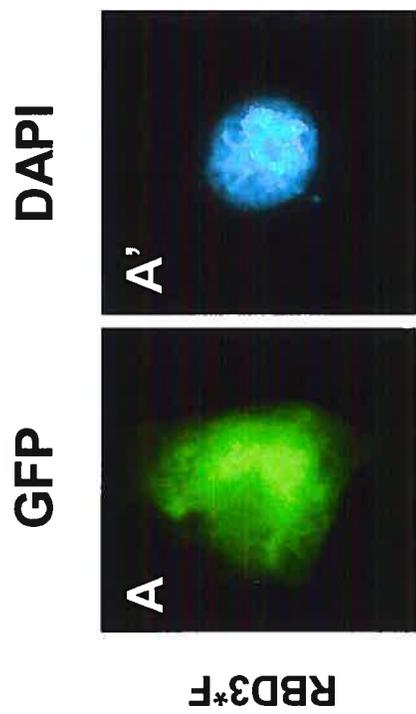
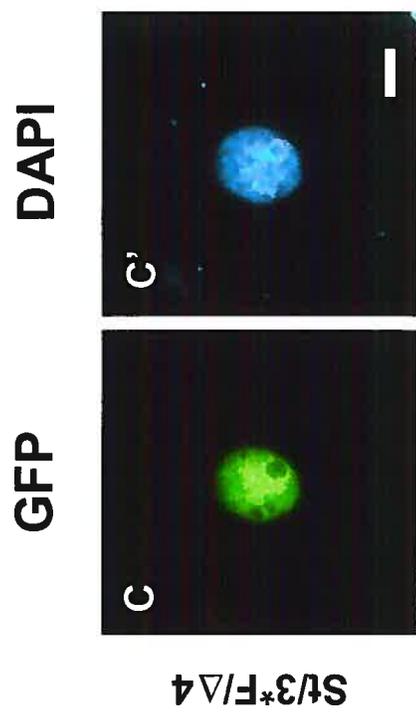


Figure 9. dsRBD3 cooperates with dsRBD4 for Staufen cytoplasmic retention. COS cells were transfected with 2 μg of cDNA coding for RBD3*F-GFP (**A,A'**), RBD3*/RBD4-GFP (**B,B'**) or St/3*F/ Δ 4 (**C,C'**). Transfected cells were fixed 16h post-transfection and the subcellular localization of each construct was monitored by GFP autofluorescence (**A,B,C**). Nuclei were stained with 300 nM DAPI solution (**A',B',C'**). Scale bar: 15.6 μm .



DISCUSSION

Les résultats présentés dans ce mémoire décrivent une nouvelle propriété de la protéine Staufen chez les mammifères : sa capacité à être importée au noyau grâce à un signal de localisation nucléaire de type bipartite. L'existence d'un tel mécanisme permet de jeter un regard nouveau sur les fonctions cellulaires médiées par Staufen. Cette étude soulève également de nombreuses questions concernant les fonctions nucléaires de Staufen ainsi que les mécanismes impliqués dans la régulation de cette activité. Des études ultérieures permettront de mieux caractériser ce phénomène et, conséquemment, de dresser un portrait plus exact du rôle de la protéine Staufen chez les mammifères.

Mécanismes de régulation potentiels du transport nucléocytoplasmique de Staufen

La présence d'un signal de localisation nucléaire dans une protéine ne garantit pas nécessairement son importation au noyau. En effet, des mécanismes de régulation de l'importation nucléaire peuvent moduler ce transport. La présence d'un NLS fonctionnel dans Staufen et son absence du noyau suggèrent que son importation puisse être régulée. Plusieurs mécanismes de régulation du transport nucléaire ont été caractérisés pour de nombreuses protéines navettes; il serait intéressant de déterminer si un ou plusieurs de ces mécanismes sont impliqués dans le transport de Staufen.

Phosphorylation

La phosphorylation est une modification post-traductionnelle souvent impliquée dans la modulation de la localisation subcellulaire (Hunter et Karin, 1992 ; Jans et Hübner, 1996 ; Whittaker et Helenius, 1998). Un des effets proposés de la phosphorylation est la modification de l'affinité entre le récepteur du transport et son cargo. La phosphorylation de la kinase Pho4 chez *S. cerevisiae* diminue fortement sa capacité d'interaction avec l'importine β Kap121 (Kaffman et al., 1998a ; Komeili et O'Shea, 1999) et favorise son interaction avec le facteur

d'exportation Msn5 (Kaffman et al., 1998b). La phosphorylation permet donc d'augmenter la présence cytoplasmique de Pho4 en diminuant son importation et en augmentant son exportation, simultanément. Des études portant sur la localisation subcellulaire de la protéine APC ont permis de démontrer que la phosphorylation d'un site caséine-kinase II (CKII) localisé à proximité du NLS augmentait significativement son importation nucléaire (Zhang et al., 2001b), alors que la phosphorylation d'un site PKA avait l'effet inverse (Zhang et al., 2000).

Quelques indices supportent l'hypothèse qu'une phosphorylation puisse être impliquée dans la régulation du transport de Staufen. D'abord, une interaction de Staufen avec la protéine phosphatase-1 a déjà été décrite par Aggen et al. (2000). Bien que la signification exacte de cette interaction n'ait pas encore été définie, cette observation supporte l'hypothèse selon laquelle la protéine Staufen puisse elle-même être phosphorylée. De plus, l'analyse de la séquence protéique de Staufen a permis d'identifier plusieurs sites potentiels de phosphorylation. De façon intéressante, deux sites consensus de phosphorylation CKII sont retrouvés de part et d'autre du NLS bipartite; une séquence consensus de phosphorylation par PKC est également localisée en N-terminale de ce NLS. La phosphorylation d'un ou plusieurs de ces sites pourrait donc permettre de moduler l'activité du NLS. Conséquemment, il serait intéressant d'étudier les effets de la phosphorylation sur la localisation subcellulaire de Staufen en remplaçant les acides aminés de ces sites par des alanines ou des acides aspartiques afin d'imiter l'état déphosphorylé ou hyperphosphorylé de ces sites. La comparaison de la localisation subcellulaire de ces mutants par rapport à la protéine sauvage permettra de déterminer si la phosphorylation influence l'importation nucléaire de Staufen.

Masquage du NLS

Un autre mécanisme fréquemment observé dans la régulation du transport nucléaire est le masquage des signaux de transport par l'association de la protéine avec certains co-facteurs. L'interaction du cargo avec lui-même (dimérisation, oligomérisation), avec d'autres protéines et/ou avec des molécules d'ARN peut,

conséquemment, influencer sa capacité à être importée ou exportée. L'importation du facteur de transcription NF- κ B est régulée à la fois par des interactions intra et intermoléculaires (Henkel et al, 1992 ; Zabel et al, 1993; Beg et al., 1992). L'importation au noyau de la protéine Mei2p, impliquée dans le processus de méiose chez la levure, est fortement favorisée par son association avec un ARN non codant (Yamashita et al., 1998).

La présence de Staufen dans des complexes protéiques de haute densité suggère sa capacité à établir de nombreuses interactions. Il est donc probable qu'une ou plusieurs de ces interactions interfèrent avec le mécanisme de transport en masquant le NLS bipartite. De plus, ce NLS étant situé dans la partie C-terminale du dsRBD3, domaine majeur de liaison à l'ARN, l'association de Staufen avec un ARN pourrait également modifier l'accessibilité du signal. Des expériences ont également démontré la capacité d'homodimérisation de Staufen *in vivo* via son dsRBD3 (C. Martel, résultats non publiés). Toutes ces interactions pourraient être impliquées dans la modulation du transport nucléocytoplasmique de Staufen. Le comportement des mutants du dsRBD3 suggère cependant que des interactions protéiques plutôt que l'interaction avec l'ARN puissent être impliqués dans une telle modulation.

Afin de déterminer si certaines interactions protéiques modifient l'accessibilité du NLS bipartite, une comparaison de la capacité d'interaction d'une protéine Staufen recombinante avec le complexe importine α/β 1, en absence et en présence d'un extrait cellulaire, pourrait être envisagée. L'observation d'une diminution d'interaction en présence de l'extrait cellulaire signifierait qu'un ou plusieurs facteurs présents dans l'extrait masquent le NLS en interagissant avec Staufen.

L'identification éventuelle des partenaires protéiques de Staufen et de leurs sites d'interaction permettra de mieux étudier l'implication de ce mécanisme dans le transport nucléaire de Staufen.

Rétention physique au cytoplasme

Les résultats présentés dans ce mémoire favorisent l'existence d'un mécanisme de régulation par rétention cytoplasmique. Ce mode de régulation n'empêche pas la formation du complexe récepteur-cargo, mais interfère avec son recrutement subséquent au pore nucléaire. La rétention est souvent causée par l'association de la protéine cargo à des structures cellulaires insolubles.

Staufen est associé fortement à différentes structures cellulaires tels le cytosquelette et le RER. Conséquemment, la force de ces interactions pourrait empêcher le transport de Staufen au noyau, malgré l'accessibilité de son NLS. En déstabilisant ces structures à l'aide de drogues induisant une dépolymérisation des microtubules et une perturbation du RER, telles le taxol et le nocodazole, il serait possible de vérifier si une association à ces structures est le principal mécanisme impliqué dans le contrôle du transport nucléocytoplasmique de Staufen.

Conditions cellulaires influençant la localisation subcellulaire

Les différents mécanismes de régulation du transport nucléocytoplasmique décrits précédemment permettent de contrôler la localisation subcellulaire de protéines en réponse à différents états physiologiques de la cellule. Il serait donc intéressant de déterminer si la capacité de Staufen à être importé dans le noyau est modulée par certaines conditions cellulaires spécifiques.

Densité cellulaire

Les nombreuses expériences de localisation subcellulaire de Staufen ont permis d'observer, de façon empirique, des variations dans l'intensité du signal nucléaire de certains mutants de même que dans la proportion des cellules présentant un phénotype d'accumulation nucléaire. Bien que les causes précises de ces fluctuations n'aient pas été spécifiquement étudiées, une certaine corrélation entre la densité de la couche de cellules et l'accumulation nucléaire a pu être observée. Cette observation laisse supposer que le transport nucléaire de Staufen puisse être influencé par la confluence cellulaire. Une telle régulation a

déjà été caractérisée pour la protéine NP du virus de l'influenza (Bui et al., 2002) et pour le produit des gènes suppresseurs de tumeur von Hippel-Lindau (Lee et al., 1996) et APC (Zhang et al., 2001b). Ces protéines, majoritairement cytoplasmiques dans des cellules confluentes, sont localisées dans le noyau dans des cultures clairsemées. De façon intéressante, l'accumulation nucléaire de certains mutants de Staufen semble également être plus importante lorsque les cellules sont dispersées. Une comparaison de la localisation subcellulaire de différentes constructions de Staufen (sauvage et muté) dans des cultures cellulaires sous- et sur-confluentes pourrait permettre de préciser la relation entre l'activité nucléocytoplasmique de Staufen et la densité cellulaire. L'utilisation de cultures de cellules primaires (ex : MEF) serait plus appropriée à l'étude de l'influence de la densité cellulaire puisque ces cellules possèdent tous les mécanismes impliqués dans l'inhibition de contact cellulaire, contrairement aux cellules transformées qui ont généralement perdu cette caractéristique.

Les détails du mécanisme par lequel la confluence influence la localisation cellulaire des protéines sont peu définis. Un mécanisme de phosphorylation résultant des contacts intercellulaires semble cependant être impliqué (Bui et al., 2002; Zhang et al., 2001b).

Cycle cellulaire

La localisation subcellulaire de nombreuses protéines dépend du cycle cellulaire. Afin de déterminer si l'importation de Staufen dans le noyau est modulée par le cycle cellulaire, sa localisation subcellulaire à différents stades du cycle cellulaire pourrait être analysée et comparée. Plusieurs drogues permettent d'arrêter les cellules à différents stades du cycle cellulaire, notamment la mimosine qui permet un arrêt des cellules en phase G₁ (Urbani et al., 1995; Ouhibi et al., 1994). Le nocodazole est souvent utilisé pour bloquer les cellules en phase M; toutefois, vu son effet sur le cytosquelette, son utilisation dans l'étude de la localisation de Staufen serait peu souhaitable. La privation de sérum pendant une période prolongée provoque également un arrêt du cycle cellulaire. L'analyse ponctuelle de la localisation subcellulaire de Staufen dans des cellules

synchronisées permettrait de déterminer si le cycle cellulaire influence la capacité de Staufen à être importée dans le noyau. Un marquage au BrdU d'une population hétérogène de cellules, afin d'identifier les cellules en phase S, pourrait également être utilisé pour comparer directement les changements de localisation subcellulaire de Staufen en fonction du cycle cellulaire.

Mécanismes d'exportation potentiels

L'hypothèse du transport nucléocytoplasmique de Staufen implique l'existence d'un mécanisme d'exportation. Les expériences effectuées dans l'étude présentée précédemment n'ont pas permis d'identifier la nature de ce mécanisme. Il sera primordial, dans les expériences futures, de déterminer les facteurs impliqués dans ce processus. Puisque des traitements à la leptomycine B n'induisent pas une accumulation nucléaire de Staufen, un mécanisme indépendant de CRM-1 doit être impliqué dans l'exportation. Un candidat intéressant est l'exportine-5, une karyophérine ayant la capacité de lier les domaines dsRBD (Brownawell and Macara, 2002). Comme son activité dépend de la présence du gradient RanGTP, il serait intéressant d'examiner l'effet d'une perturbation de ce gradient sur la localisation subcellulaire de Staufen. La microinjection nucléaire d'un mutant de Ran constitutivement lié au GDP (Richards et al., 1997) pourrait permettre d'inhiber spécifiquement le mécanisme d'exportation. Une accumulation nucléaire de Staufen dans les cellules microinjectées permettrait de conclure qu'un système d'exportation Ran-dépendant est impliqué dans le transit nucléaire. Dans ce cas, l'implication de l'exportine-5 pourrait être plus spécifiquement étudiée par des essais d'interaction *in vitro*, de co-immunoprécipitation et d'ablation génique (ex : RNAi).

Une autre hypothèse intéressante suggère que Staufen puisse être exporté en collaboration avec l'ARNm. L'indépendance des deux processus face au récepteur CRM1 appuie cette possibilité. Cette hypothèse s'accorde également avec certains faits qui, *a priori*, sembleraient la contredire. Premièrement, les expériences d'inhibition de la transcription avec l'actinomycine D ne provoquent pas d'accumulation nucléaire de Staufen. Le comportement de Staufen dans ces

conditions n'infirmes toutefois pas l'hypothèse d'une exportation avec l'ARNm puisque la majorité des protéines exportées de cette façon, notamment les protéines hnRNP, sont relocalisées au cytoplasme après un tel traitement (Pinol-Roma et Dreyfuss, 1992 ; Michael et al., 1997). Deuxièmement, la destruction de l'activité de liaison à l'ARN de Staufen n'induit pas toujours une accumulation nucléaire (mutant St/3*F vs mutant St/3 *K4), indiquant qu'une interaction directe de Staufen avec l'ARN ne semble pas impliquée dans l'exportation de Staufen. Il est toutefois fort possible que le recrutement de Staufen dans les complexes RNP ciblés pour l'exportation soit médié par des interactions protéiques. Afin de déterminer si Staufen est exporté avec les complexes RNP, son comportement suite à un blocage de l'exportation de l'ARNm pourrait être analysé. Comme aucune drogue connue n'inhibe spécifiquement l'exportation dépendante de Tap, la microinjection nucléaire de grande quantité d'ARN CTE pourrait être utilisée. En effet, en recrutant la protéine Tap, l'ARN CTE permet de titrer ce facteur essentiel à l'exportation des ARN poly(A), provoquant leur accumulation subséquente dans le noyau (Pasquinelli et al., 1997). Alternativement, l'expression et la localisation subcellulaire de Staufen dans des levures mutantes pour le facteur Mex67p (homologue de Tap) pourraient être examinées. Ce système possède toutefois le désavantage d'être hétérologue, puisque aucun homologue de Staufen n'a été identifié chez la levure. L'absence de certains cofacteurs pourrait donc fausser l'analyse des résultats dans un tel système.

Rôles potentiels de Staufen dans le noyau

La présence de Staufen dans le noyau soulève de nouvelles interrogations concernant son rôle dans ce compartiment. L'étude des fonctions remplies par Staufen dans le noyau s'avère essentielle à la compréhension de son mécanisme d'action.

Reconnaissance et liaison d'ARNm à localiser

L'implication de la présence nucléaire de Staufen dans le transport cytoplasmique d'ARN pourrait être éclairée par l'étude du comportement d'une protéine Staufen incapable d'être importée au noyau. Des modifications dans la localisation subcellulaire ou dans la capacité d'association avec des structures cytoplasmiques (polysomes, ER) d'une protéine Staufen arborant un NLS mutant pourrait fournir des indices intéressants quant au rôle du transport nucléocytoplasmique de Staufen. En mesurant la quantité d'ARN lié *in vivo* par une protéine mutante par rapport à la protéine Staufen sauvage, il serait possible de déterminer si sa présence nucléaire permet un recrutement plus efficace d'ARN. Puisque le transport d'ARN est plus évident dans les cellules polarisées, l'utilisation de neurones dans l'étude d'un tel mutant pourrait permettre d'observer un phénotype intéressant.

Un des problèmes majeurs d'une étude fonctionnelle de Staufen est le manque d'information concernant son rôle précis dans la cellule. Bien que son implication dans le transport d'ARN soit bien établie, aucun ARN cible n'a encore été clairement associé à Staufen. L'étude de l'importance du transit nucléaire de Staufen serait donc grandement facilitée par l'identification d'un tel ARN. En effet, l'identification d'un transcrit spécifiquement lié par Staufen pourrait permettre de vérifier de façon plus directe si le transport nucléocytoplasmique de Staufen influence la localisation et/ou la régulation finale de cet ARN cible.

Implications de Staufen dans le complexe télomérique

L'identification de Staufen comme composante du complexe de la télomérase fournit le premier exemple d'une interaction protéique de Staufen dans le noyau. Plusieurs hypothèses peuvent être suggérées pour expliquer l'implication de Staufen dans le complexe télomérique *in vivo*. Les différentes études proposées ci-dessous permettraient de mieux comprendre les mécanismes et fonctions de cette association et conséquemment de clarifier le rôle nucléaire de Staufen.

Afin de pouvoir étudier le rôle de Staufen dans le complexe télomérique, il s'avère primordial de déterminer si sa présence est essentielle à l'activité de la télomérase. Pour ce faire, l'analyse de l'activité télomérase (TRAP) d'extraits cellulaires de cellules n'exprimant pas Staufen (K.O.) de même que l'examen de la longueur des télomères dans ces mêmes cellules pourraient être effectués. Si la présence de Staufen influence l'activité de la télomérase, son rôle dans ce complexe pourra être plus spécifiquement étudié.

La localisation nucléolaire de Staufen et son interaction avec l'ARN hTR suggèrent son implication dans le processus de biogenèse du RNP télomérique. Des analyses ont toutefois rapportées la présence de Staufen dans des complexes télomériques catalytiquement actifs (Le et al., 2000). Cette observation n'infirme cependant pas l'hypothèse d'un rôle de Staufen dans la maturation des complexes télomériques puisque certaines protéines clairement impliquées dans la biogenèse de la télomérase demeurent associées au complexe mature (Mitchell et al., 1999). En supposant que l'ablation génique de Staufen perturbe l'activité de la télomérase *in vitro*, il serait intéressant de vérifier si l'activité TRAP d'extraits cellulaires provenant de cellules K.O. pour Staufen peut être restaurée par l'ajout de la protéine Staufen recombinante. Si Staufen est nécessaire au processus de biogenèse de la télomérase, son addition à des complexes purifiés ne devrait pas permettre de restaurer l'activité catalytique. Par contre, si Staufen est important pour la fonctionnalité des complexes télomériques matures, une augmentation de l'activité TRAP pourrait être observée.

De par sa capacité de liaison à l'ARN, Staufen pourrait être impliqué dans le recrutement direct de l'ARN hTR au niveau du complexe télomérique. En soumettant à des essais de retardement sur gel (EMSA) (Bachand et al. 2001) des complexes télomériques isolés de cellules n'exprimant pas Staufen ou exprimant un mutant ne liant plus l'ARN, il serait possible de déterminer si la présence de Staufen, et plus spécifiquement son activité de liaison à l'ARN, influence la capacité d'association du RNP télomérique à l'ARNhTR.

Dans l'éventualité où Staufen n'influencerait pas l'activité télomérique *in vitro*, il se pourrait qu'il joue un rôle dans la régulation de cette activité *in vivo* en

modulant la localisation subnucléaire des complexes télomériques. En effet, des études indiquent que la télomérase demeure catalytiquement active durant tout le cycle cellulaire, et que son effet sur le génome est modulé par sa localisation subnucléaire plutôt que par une régulation de son activité. Ainsi, en observant la localisation subnucléaire d'une protéine de fusion hTERT-GFP, des études ont démontré que le RNP télomérique est majoritairement localisé au nucléole en phase G1, et qu'une redistribution dans le nucléoplasme, allant même jusqu'à une exclusion des nucléoles, est observée en phase G2/S (Wang et al., 2002 ; Yang et al., 2002). Afin de déterminer si Staufen demeure associé au complexe télomérique durant tout le cycle cellulaire, sa colocalisation avec la protéine hTERT-GFP pourrait être examinée. Alternativement, la présence de Staufen dans les complexes télomériques purifiés de populations cellulaires à différents stades du cycle cellulaire (cellules synchronisées ou triées par FACS) pourrait également être vérifiée par buvardage de type Western. L'importance de Staufen dans le recrutement nucléolaire de la télomérase pourrait finalement être étudiée en vérifiant si le comportement de la protéine hTERT aux différents stades du cycle cellulaire est modifié dans des cellules n'exprimant pas Staufen.

Considérant l'interdépendance existant entre la liaison de Staufen à l'ARN et sa localisation efficace dans l'ovocyte durant l'ovogenèse chez la drosophile, il serait intéressant de déterminer si une telle relation existe également entre Staufen et l'ARN hTR pour la localisation nucléolaire de Staufen. Afin de déterminer si le recrutement de Staufen au nucléole reflète sa liaison à l'ARN, la localisation subnucléaire de Staufen dans des cellules n'exprimant pas hTR (lignée SV40-WI38 ou WI38 VA13/2RA (aussi dépourvue de hTERT)) pourrait être examinée. La présence du mutant incapable de lier l'ARN, St/3*F, dans le nucléole suggère cependant que l'interaction avec l'ARN ne serait pas le seul facteur permettant le recrutement de Staufen au nucléole. L'existence d'interaction avec une ou plusieurs protéines de la télomérase pourrait donc également être impliquée. La protéine hTERT étant aussi retrouvée au nucléole dans certaines conditions (Etheridge et al., 2002), la localisation subnucléaire de Staufen dans des cellules

n'exprimant pas hTERT pourrait être analysée (lignée GM847). Dans l'éventualité où une perte de la localisation nucléolaire de Staufen était observée dans un de ces types cellulaires, l'expression exogène de l'ARN hTR ou de la protéine hTERT permettrait de confirmer l'importance de ces deux facteurs dans le recrutement nucléolaire de Staufen.

Une étude récente portant sur la protéine hTERT a permis de caractériser la présence d'un signal de localisation nucléolaire dans cette protéine, dont l'activité dépend de l'intégrité de deux régions essentielles à la liaison de l'ARN hTR (Etheridge et al., 2002). Des mutations détruisant l'activité de liaison à l'ARN du fragment encodant le domaine de localisation nucléolaire (NoLD) inhibent totalement son accumulation nucléolaire. Par contre, les mêmes mutations situées dans le contexte de la protéine hTERT pleine longueur n'abolissent pas totalement l'accumulation nucléolaire (diminution d'environ 50%). De façon similaire, une mutation détruisant l'activité de liaison à l'ARN du dsRBD3 (mutant RBD3*F-GFP) abolit sa localisation nucléolaire. Toutefois, la présence du dsRBD4 permet de minimiser l'effet de cette mutation et de restaurer l'accumulation nucléolaire. La signification exacte de cette similarité des paramètres influençant la localisation nucléolaire de Staufen et hTERT demeure toutefois très hypothétique ; il pourrait s'agir d'un mécanisme général ou encore refléter un mode de régulation plus spécifique aux protéines télomériques ou nucléolaires.

Rôle de Staufen dans la biogenèse du ribosome

La biogenèse du ribosome est un phénomène complexe au cours duquel les ARNr subissent différentes étapes de maturation avant d'être assemblés avec les quelques 85 protéines formant le ribosome. Suite à sa transcription, l'ARNr s'associe donc de façon séquentielle et transitoire avec les nombreux cofacteurs, tant protéiques que ribonucléiques, nécessaire à sa maturation. Alors que plusieurs ARNsno ont été identifiés et leur rôle dans la maturation des ARNr, caractérisé ; l'identité des facteurs protéiques impliqués dans ces processus demeure mal

définie. La présence de Staufen dans le nucléole, de même que sa capacité à lier les deux sous-unités ribosomiques (Luo et al., 2002) suggèrent qu'elle puisse être impliquée dans le processus de maturation des RNP pré-ribosomiques.

L'examen d'images à haute résolution générées par microscopie électronique a permis de subdiviser le nucléole en 3 sous-domaines morphologiquement distincts associés aux différentes étapes du processus de biogenèse du ribosome (Goessens, 1984 ; Spector, 1993 ; Scheer et Hock, 1999). Ainsi, la région FC (fibrillar center) contenant l'ARN polymérase de type I et l'ADNr semble être le lieu de transcription de l'ARNr. Les premières étapes de la maturation de l'ARNr ont lieu dans le domaine DFC (dense fibrillar content), entourant la région FC. Cette région se caractérise d'ailleurs par la présence de nombreux cofacteurs impliqués dans ce processus, notamment la protéine fibrillarine. Finalement, le reste du nucléole, qualifié de région GC (granular component), constitue le site d'assemblage final de l'ARNr avec les protéines ribosomiques. Les facteurs impliqués dans la biogenèse des ribosomes colocalisent généralement dans une de ces régions nucléolaires (Goessens, 1984; Ochs et al., 1988). Inversement, les facteurs nucléolaires non impliqués dans le processus de biogenèse ne colocalisent pas de façon définie avec l'une de ces structures, comme c'est le cas pour l'ARN SRP (Politz et al., 2002). Conséquemment, une première indication du rôle de Staufen dans la synthèse ribosomique pourrait être révélée par une analyse de la localisation subnucléolaire du mutant St/3*F. La présence de Staufen dans une région particulière du nucléole supporterait l'hypothèse d'un rôle dans le processus de biogenèse.

L'implication de Staufen dans la formation des ribosomes pourrait également être confirmée par sa présence dans des complexes pré-ribosomiques isolés d'extraits nucléaires ou nucléolaires. Des expériences de co-immunoprécipitation pourraient permettre de déterminer si Staufen se retrouve dans les mêmes complexes que certains cofacteurs connus du processus de maturation, tel la fibrillarine et la protéine B23.

Mis à part l'ARNr 5S, les ARNr retrouvés dans les ribosomes matures proviennent tous d'un même précurseur, l'ARNr 45S. Cet ARNr subit différentes étapes de maturation afin de produire les ARNr 18S, 5.8S et 28S. En comparant le patron de migration des ARNr isolés de cellules sauvages et de cellules n'exprimant pas Staufen (RNAi), il serait possible de déterminer si l'absence de Staufen inhibe ou ralentit une ou plusieurs étapes de ce processus de maturation. En effet, si Staufen joue un rôle dans ce phénomène, une accumulation de certains précurseurs pourrait être observée.

La maturation de l'ARNr est le résultat de l'action de plusieurs complexes RNP nucléaires (snoRNP) formés par les ARNsno et leurs protéines associés. De façon intéressante, plusieurs des protéines retrouvées dans les complexes snoRNP s'associent également avec l'ARN hTR et sont retrouvées dans le complexe télomérique (Dragon et al., 2000 ; Heiss et al., 1999 ; Pogacic et al., 2000). Considérant sa présence dans le complexe télomérique ainsi que sa capacité à lier l'ARN hTR, il serait intéressant de déterminer si Staufen présente cette dualité d'association. En soumettant un immunoprécipitat nucléaire de Staufen à des essais de protection à la RNaseA/T1 (Goodall et al., 1990) utilisant des sondes d'ARN antisens spécifiques pour certains snoRNA, la capacité d'association de Staufen aux complexes snoRNP pourrait être révélée.

CONCLUSION

Les travaux présentés dans ce mémoire de maîtrise ont permis d'élargir l'éventail des fonctions cellulaires impliquant la protéine Staufen chez les mammifères. Nous avons pu démontrer la présence d'un signal de localisation nucléaire fonctionnel dans la protéine Staufen ainsi que l'existence d'un mécanisme de régulation permettant de moduler sa présence dans le noyau. D'une façon plus générale, les travaux de ce mémoire, en conjonction avec d'autres études portant sur le transit nucléocytoplasmique des protéines liant l'ARN, appuie l'idée selon laquelle la synthèse, la maturation, le transport et la traduction des ARNm sont des phénomènes concertés régulés par des protéines communes qui sont recrutées sur l'ARN dès sa transcription dans le noyau. Ces travaux ouvre donc l'a voie à de nouveaux concepts et hypothèses de recherche.

SOURCES DOCUMENTAIRES

Adam,E.J. and Adam,S.A. (1994). Identification of cytosolic factors required for nuclear location sequence-mediated binding to the nuclear envelope. *J Cell Biol* *125*, 547-55.

Adinolfi,S., Bagni,C., Castiglione Morelli,M.A., Fraternali,F., Musco,G., and Pastore,A. (1999). Novel RNA-binding motif: the KH module. *Biopolymers* *51*, 153-64.

Aggen,J.B., Nairn,A.C., and Chamberlin,R. (2000). Regulation of protein phosphatase-1. *Chem Biol* *7*, 13-23.

Ainger,K., Avossa,D., Diana,A.S., Barry,C., Barbarese,E., and Carson,J.H. (1997). Transport and localization elements in myelin basic protein mRNA. *J Cell Biol* *138*, 1077-87.

Ainger,K., Avossa,D., Morgan,F., Hill,S.J., Barry,C., Barbarese,E., and Carson,J.H. (1993). Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes. *J Cell Biol* *123*, 431-41.

Akam,M. (1987). The molecular basis for metameric pattern in the *Drosophila* embryo. *Development* *101*, 1-22.

Akiyama-Oda,Y., Hosoya,T., and Hotta,Y. (1999). Asymmetric cell division of thoracic neuroblast 6-4 to bifurcate glial and neuronal lineage in *Drosophila*. *Development* *126*, 1967-74.

Arts,G.J., Fornerod,M., and Mattaj,I.W. (1998). Identification of a nuclear export receptor for tRNA. *Curr Biol* *8*, 305-14.

Bachand,F. and Autexier,C. (2001). Functional regions of human telomerase reverse transcriptase and human telomerase RNA required for telomerase activity and RNA-protein interactions. *Mol Cell Biol* *21*, 1888-97.

Bachand,F., Triki,I., and Autexier,C. (2001). Human telomerase RNA-protein interactions. *Nucleic Acids Res* *29*, 3385-93.

Bailey,C.H., Bartsch,D., and Kandel,E.R. (1996). Toward a molecular definition of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13445-52.

Bashirullah,A., Halsell,S.R., Cooperstock,R.L., Kloc,M., Karaiskakis,A., Fisher,W.W., Fu,W., Hamilton,J.K., Etkin,L.D., and Lipshitz,H.D. (1999). Joint action of two RNA degradation pathways controls the timing of maternal transcript elimination at the midblastula transition in *Drosophila melanogaster*. *Embo J* 18, 2610-20.

Bassell,G.J., Zhang,H., Byrd,A.L., Femino,A.M., Singer,R.H., Taneja,K.L., Lifshitz,L.M., Herman,I.M., and Kosik,K.S. (1998). Sorting of beta-actin mRNA and protein to neurites and growth cones in culture. *J Neurosci* 18, 251-65.

Beach,D.L. and Bloom,K. (2001). ASH1 mRNA localization in three acts. *Mol Biol Cell* 12, 2567-77.

Beg,A.A., Ruben,S.M., Scheinman,R.I., Haskill,S., Rosen,C.A., and Baldwin,A.S., Jr. (1992). I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes Dev* 6, 1899-913.

Berleth,T., Burri,M., Thoma,G., Bopp,D., Richstein,S., Frigerio,G., Noll,M., and Nusslein-Volhard,C. (1988). The role of localization of bicoid RNA in organizing the anterior pattern of the *Drosophila* embryo. *Embo J* 7, 1749-56.

Bernardoni,R., Kammerer,M., Vonesch,J.L., and Giangrande,A. (1999). Gliogenesis depends on glide/gcm through asymmetric division of neuroglia. *Dev Biol* 216, 265-75.

Bertrand,E., Chartrand,P., Schaefer,M., Shenoy,S.M., Singer,R.H., and Long,R.M. (1998). Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Mol Cell* 2, 437-45.

Bischoff,F.R., Krebber,H., Kempf,T., Hermes,I., and Ponstingl,H. (1995). Human RanGTPase-activating protein RanGAP1 is a homologue of yeast Rna1p involved in mRNA processing and transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1749-53.

Blasco,M.A., Funk,W., Villeponteau,B., and Greider,C.W. (1995). Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science* 269, 1267-70.

Bobola,N., Jansen,R.P., Shin,T.H., and Nasmyth,K. (1996). Asymmetric accumulation of Ash1p in postanaphase nuclei depends on a myosin and restricts yeast mating-type switching to mother cells. *Cell* 84, 699-709.

Bohl,F., Kruse,C., Frank,A., Ferring,D., and Jansen,R.P. (2000). She2p, a novel RNA-binding protein tethers ASH1 mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p. *Embo J* 19, 5514-24.

Bond,V.C. and Wold,B. (1993). Nucleolar localization of myc transcripts. *Mol Cell Biol* 13, 3221-30.

Bray,M., Prasad,S., Dubay,J.W., Hunter,E., Jeang,K.T., Rekosh,D., and Hammariskjold,M.L. (1994). A small element from the Mason-Pfizer monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev- independent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1256-60.

Breeuwer,M. and Goldfarb,D.S. (1990). Facilitated nuclear transport of histone H1 and other small nucleophilic proteins. *Cell* 60, 999-1008.

Brendza,R.P., Serbus,L.R., Duffy,J.B., and Saxton,W.M. (2000). A function for kinesin I in the posterior transport of oskar mRNA and Stauf protein. *Science* 289, 2120-2.

Brennan,C.M., Gallouzi,I.E., and Steitz,J.A. (2000). Protein ligands to HuR modulate its interaction with target mRNAs in vivo. *J Cell Biol* 151, 1-14.

Brenner,H.R., Witzemann,V., and Sakmann,B. (1990). Imprinting of acetylcholine receptor messenger RNA accumulation in mammalian neuromuscular synapses. *Nature* 344, 544-7.

Brentani,R. and Brentani,M. (1969). Messenger ribonucleic acid in the nucleolus. *Genetics* 61, 391-9.

Broadus,J. and Doe,C.Q. (1997). Extrinsic cues, intrinsic cues and microfilaments regulate asymmetric protein localization in *Drosophila* neuroblasts. *Curr Biol* 7, 827-35.

Broadus,J., Fuerstenberg,S., and Doe,C.Q. (1998). Stufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature* 391, 792-5.

Brownawell,A.M. and Macara,I.G. (2002). Exportin-5, a novel karyopherin, mediates nuclear export of double- stranded RNA binding proteins. *J Cell Biol* 156, 53-64.

Bruckenstein,D.A., Lein,P.J., Higgins,D., and Freneau,R.T., Jr. (1990). Distinct spatial localization of specific mRNAs in cultured sympathetic neurons. *Neuron* 5, 809-19.

Buchner,G., Bassi,M.T., Andolfi,G., Ballabio,A., and Franco,B. (1999). Identification of a novel homolog of the *Drosophila* stufen protein in the chromosome 8q13-q21.1 region. *Genomics* 62, 113-8.

Buckanovich,R.J., Posner,J.B., and Darnell,R.B. (1993). Nova, the paraneoplastic Ri antigen, is homologous to an RNA-binding protein and is specifically expressed in the developing motor system. *Neuron* 11, 657-72.

Bui,M., Myers,J.E., and Whittaker,G.R. (2002). Nucleo-cytoplasmic localization of influenza virus nucleoprotein depends on cell density and phosphorylation. *Virus Res* 84, 37-44.

Burd,C.G. and Dreyfuss,G. (1994). RNA binding specificity of hnRNP A1: significance of hnRNP A1 high- affinity binding sites in pre-mRNA splicing. *Embo J* 13, 1197-204.

Burd,C.G., Matunis,E.L., and Dreyfuss,G. (1991). The multiple RNA-binding domains of the mRNA poly(A)-binding protein have different RNA-binding activities. *Mol Cell Biol* 11, 3419-24.

Burgin,K.E., Waxham,M.N., Rickling,S., Westgate,S.A., Mobley,W.C., and Kelly,P.T. (1990). In situ hybridization histochemistry of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. *J Neurosci* 10, 1788-98.

Bycroft,M., Grunert,S., Murzin,A.G., Proctor,M., and St Johnston,D. (1995a). NMR solution structure of a dsRNA binding domain from *Drosophila* staufen protein reveals homology to the N-terminal domain of ribosomal protein S5. *Embo J* 14, 3563-71.

Bycroft,M., Grunert,S., Murzin,A.G., Proctor,M., and St Johnston,D. (1995b). NMR solution structure of a dsRNA binding domain from *Drosophila* staufen protein reveals homology to the N-terminal domain of ribosomal protein S5. *Embo J* 14, 3563-71.

Caceres,J.F. and Krainer,A.R. (1993). Functional analysis of pre-mRNA splicing factor SF2/ASF structural domains. *Embo J* 12, 4715-26.

Carson,J.H., Worboys,K., Ainger,K., and Barbarese,E. (1997). Translocation of myelin basic protein mRNA in oligodendrocytes requires microtubules and kinesin. *Cell Motil Cytoskeleton* 38, 318-28.

Castiglione Morelli,M.A., Stier,G., Gibson,T., Joseph,C., Musco,G., Pastore,A., and Trave,G. (1995). The KH module has an alpha beta fold. *FEBS Lett* 358, 193-8.

Cha,B.J., Koppetsch,B.S., and Theurkauf,W.E. (2001). In vivo analysis of *Drosophila bicoid* mRNA localization reveals a novel microtubule-dependent axis specification pathway. *Cell* 106, 35-46.

Chang,J.S., Tan,L., and Schedl,P. (1999). The *Drosophila* CPEB homolog, orb, is required for oskar protein expression in oocytes. *Dev Biol* 215, 91-106.

Chartrand,P., Singer,R.H., and Long,R.M. (2001). RNP localization and transport in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 297-310.

Chicurel,M.E., Singer,R.H., Meyer,C.J., and Ingber,D.E. (1998). Integrin binding and mechanical tension induce movement of mRNA and ribosomes to focal adhesions. *Nature* 392, 730-3.

Chook,Y.M. and Blobel,G. (2001). Karyopherins and nuclear import. *Curr Opin Struct Biol* 11, 703-15.

Clark,I.E., Jan,L.Y., and Jan,Y.N. (1997). Reciprocal localization of Nod and kinesin fusion proteins indicates microtubule polarity in the *Drosophila* oocyte, epithelium, neuron and muscle. *Development* 124, 461-70.

Clouse,K.N., Luo,M.J., Zhou,Z., and Reed,R. (2001). A Ran-independent pathway for export of spliced mRNA. *Nat Cell Biol* 3, 97-9.

Cockell,M.M. and Gasser,S.M. (1999). The nucleolus: nucleolar space for RENT. *Curr Biol* 9, 575-6.

Cullen,B.R., Hauber,J., Campbell,K., Sodroski,J.G., Haseltine,W.A., and Rosen,C.A. (1988). Subcellular localization of the human immunodeficiency virus trans-acting gene product. *J Virol* 62, 2498-501.

Dasso,M. (2002). The Ran GTPase: theme and variations. *Curr Biol* 12, 502-8.

de la Luna,S., Fortes,P., Beloso,A., and Ortin,J. (1995). Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. *J Virol* 69, 2427-33.

De Robertis,E.M., Black,P., and Nishikura,K. (1981). Intranuclear location of the tRNA splicing enzymes. *Cell* 23, 89-93.

Deshler,J.O., Highett,M.I., Abramson,T., and Schnapp,B.J. (1998). A highly conserved RNA-binding protein for cytoplasmic mRNA localization in vertebrates. *Curr Biol* 8, 489-96.

Deshler,J.O., Highett,M.I., and Schnapp,B.J. (1997). Localization of *Xenopus* Vg1 mRNA by Vera protein and the endoplasmic reticulum. *Science* 276, 1128-31.

Dragon,F., Pogacic,V., and Filipowicz,W. (2000). In vitro assembly of human H/ACA small nucleolar RNPs reveals unique features of U17 and telomerase RNAs. *Mol Cell Biol* 20, 9028-40.

Dreyfuss,G., Kim,V.N., and Kataoka,N. (2002). Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 195-205.

Dreyfuss,G., Philipson,L., and Mattaj,I.W. (1988). Ribonucleoprotein particles in cellular processes. *J Cell Biol* 106, 1419-25.

Dubnau,J., Chiang,A.S., Grady,L., Barditch,J., Gossweiler,S., McNeil,J., Smith,P., Buldoc,F., Scott,R., Certa,U., Broger,C., and Tully,T. (2003). The staufen/pumilio Pathway Is Involved in *Drosophila* Long-Term Memory. *Curr Biol* 13, 286-96.

Duchaine,T., Wang,H.J., Luo,M., Steinberg,S.V., Nabi,I.R., and DesGroseillers,L. (2000). A novel murine Staufen isoform modulates the RNA content of Staufen complexes. *Mol Cell Biol* 20, 5592-601.

Duchaine,T.F., Hemraj,I., Furic,L., Deitinghoff,A., Kiebler,M.A., and DesGroseillers,L. (2002). Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J Cell Sci* 115, 3285-95.

- Enami,K., Sato,T.A., Nakada,S., and Enami,M. (1994). Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein. *J Virol* 68, 1432-7.
- Ephrussi,A., Dickinson,L.K., and Lehmann,R. (1991). Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell* 66, 37-50.
- Ephrussi,A. and Lehmann,R. (1992). Induction of germ cell formation by oskar. *Nature* 358, 387-92.
- Erdelyi,M., Michon,A.M., Guichet,A., Glotzer,J.B., and Ephrussi,A. (1995). Requirement for *Drosophila* cytoplasmic tropomyosin in oskar mRNA localization. *Nature* 377, 524-7.
- Etheridge,K.T., Banik,S.S., Armbruster,B.N., Zhu,Y., Terns,R.M., Terns,M.P., and Counter,C.M. (2002). The nucleolar localization domain of the catalytic subunit of human telomerase. *J Biol Chem* 277, 24764-70.
- Falcon,A.M., Fortes,P., Marion,R.M., Beloso,A., and Ortin,J. (1999). Interaction of influenza virus NS1 protein and the human homologue of Staufen in vivo and in vitro. *Nucleic Acids Res* 27, 2241-7.
- Farina,K.L. and Singer,R.H. (2002). The nuclear connection in RNA transport and localization. *Trends Cell Biol* 12, 466-72.
- Feng,J., Funk,W.D., Wang,S.S., Weinrich,S.L., Avilion,A.A., Chiu,C.P., Adams,R.R., Chang,E., Allsopp,R.C., Yu,J., and et al. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science* 269, 1236-41.
- Ferrandon,D., Elphick,L., Nusslein-Volhard,C., and St Johnston,D. (1994). Staufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* 79, 1221-32.
- Ferrandon,D., Koch,I., Westhof,E., and Nusslein-Volhard,C. (1997). RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3' UTR-STAUFIN ribonucleoprotein particles. *Embo J* 16, 1751-8.

Fischer,U., Huber,J., Boelens,W.C., Mattaj,I.W., and Luhrmann,R. (1995). The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* 82, 475-83.

Fornerod,M., Ohno,M., Yoshida,M., and Mattaj,I.W. (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90, 1051-60.

Fribourg,S., Braun,I.C., Izaurralde,E., and Conti,E. (2001). Structural basis for the recognition of a nucleoporin FG repeat by the NTF2-like domain of the TAP/p15 mRNA nuclear export factor. *Mol Cell* 8, 645-56.

Frigerio,G., Burri,M., Bopp,D., Baumgartner,S., and Noll,M. (1986). Structure of the segmentation gene paired and the *Drosophila* PRD gene set as part of a gene network. *Cell* 47, 735-46.

Gadal,O., Strauss,D., Kessl,J., Trumpower,B., Tollervey,D., and Hurt,E. (2001). Nuclear export of 60s ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Mol Cell Biol* 21, 3405-15.

Gall,J.G., Tsvetkov,A., Wu,Z., and Murphy,C. (1995). Is the sphere organelle/coiled body a universal nuclear component? *Dev Genet* 16, 25-35.

Garcia,S.N. and Pillus,L. (1999). Net results of nucleolar dynamics. *Cell* 97, 825-8.

Garner,C.C., Tucker,R.P., and Matus,A. (1988). Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature* 336, 674-7.

Gatfield,D. and Izaurralde,E. (2002). REF1/Aly and the additional exon junction complex proteins are dispensable for nuclear mRNA export. *J Cell Biol* 159, 579-88.

- Gautreau,D., Cote,C.A., and Mowry,K.L. (1997). Two copies of a subelement from the Vg1 RNA localization sequence are sufficient to direct vegetal localization in *Xenopus* oocytes. *Development* 124, 5013-20.
- Gellon,G., Harding,K.W., McGinnis,N., Martin,M.M., and McGinnis,W. (1997). A genetic screen for modifiers of Deformed homeotic function identifies novel genes required for head development. *Development* 124, 3321-31.
- Ghetti,A., Pinol-Roma,S., Michael,W.M., Morandi,C., and Dreyfuss,G. (1992). hnRNP I, the polypyrimidine tract-binding protein: distinct nuclear localization and association with hnRNAs. *Nucleic Acids Res* 20, 3671-8.
- Gibson,T.J., Rice,P.M., Thompson,J.D., and Heringa,J. (1993). KH domains within the FMR1 sequence suggest that fragile X syndrome stems from a defect in RNA metabolism. *Trends Biochem Sci* 18, 331-3.
- Goessens,G. (1984). Nucleolar Structure. *Int Rev Cytol* 87, 107-58.
- Goodall,G.J., Wiebauer,K., and Filipowicz,W. (1990). Analysis of pre-mRNA processing in transfected plant protoplasts. *Methods Enzymol* 181, 148-61.
- Gorlach,M., Wittekind,M., Beckman,R.A., Mueller,L., and Dreyfuss,G. (1992). Interaction of the RNA-binding domain of the hnRNP C proteins with RNA. *Embo J* 11, 3289-95.
- Gorlich,D., Pante,N., Kutay,U., Aebi,U., and Bischoff,F.R. (1996). Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *Embo J* 15, 5584-94.
- Gorlich,D., Prehn,S., Laskey,R.A., and Hartmann,E. (1994). Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell* 79, 767-78.
- Groisman,I., Huang,Y.S., Mendez,R., Cao,Q., Theurkauf,W., and Richter,J.D. (2000). CPEB, maskin, and cyclin B1 mRNA at the mitotic apparatus: implications for local translational control of cell division. *Cell* 103, 435-47.

Gruter,P., Tabernero,C., von Kobbe,C., Schmitt,C., Saavedra,C., Bachi,A., Wilm,M., Felber,B.K., and Izaurralde,E. (1998). TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Mol Cell* *1*, 649-59.

Gunkel,N., Yano,T., Markussen,F.H., Olsen,L.C., and Ephrussi,A. (1998). Localization-dependent translation requires a functional interaction between the 5' and 3' ends of oskar mRNA. *Genes Dev* *12*, 1652-64.

Gutzeit,H.O. (1986). The role of microfilaments in cytoplasmic streaming in *Drosophila* follicles. *J Cell Sci* *80*, 159-69.

Hall,M.N., Craik,C., and Hiraoka,Y. (1990). Homeodomain of yeast repressor alpha 2 contains a nuclear localization signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 6954-8.

Heiss,N.S., Girod,A., Salowsky,R., Wiemann,S., Pepperkok,R., and Poustka,A. (1999). Dyskerin localizes to the nucleolus and its mislocalization is unlikely to play a role in the pathogenesis of dyskeratosis congenita. *Hum Mol Genet* *8*, 2515-24.

Henkel,T., Zabel,U., van Zee,K., Muller,J.M., Fanning,E., and Baeuerle,P.A. (1992). Intramolecular masking of the nuclear location signal and dimerization domain in the precursor for the p50 NF-kappa B subunit. *Cell* *68*, 1121-33.

Hieda,M., Tachibana,T., Yokoya,F., Kose,S., Imamoto,N., and Yoneda,Y. (1999). A monoclonal antibody to the COOH-terminal acidic portion of Ran inhibits both the recycling of Ran and nuclear protein import in living cells. *J Cell Biol* *144*, 645-55.

Hill,M.A. and Gunning,P. (1993). Beta and gamma actin mRNAs are differentially located within myoblasts. *J Cell Biol* *122*, 825-32.

- Hinshaw, J.E., Carragher, B.O., and Milligan, R.A. (1992). Architecture and design of the nuclear pore complex. *Cell* 69, 1133-41.
- Ho, J.H., Kallstrom, G., and Johnson, A.W. (2000). Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *J Cell Biol* 151, 1057-66.
- Hoffman, M. (1991). First protein kinase structure. *Science* 253, 383.
- Huang, P. and Lai, M.M. (2001). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein a1 binds to the 3'-untranslated region and mediates potential 5'-3'-end cross talks of mouse hepatitis virus RNA. *J Virol* 75, 5009-17.
- Hunter, T. and Karin, M. (1992). The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* 70, 375-87.
- Huntley, G.W., Benson, D.L., and Colman, D.R. (2002). Structural remodeling of the synapse in response to physiological activity. *Cell* 108, 1-4.
- Hurt, E., Hannus, S., Schmelzl, B., Lau, D., Tollervey, D., and Simos, G. (1999). A novel in vivo assay reveals inhibition of ribosomal nuclear export in ran-cycle and nucleoporin mutants. *J Cell Biol* 144, 389-401.
- Ikeshima-Kataoka, H., Skeath, J.B., Nabeshima, Y., Doe, C.Q., and Matsuzaki, F. (1997). Miranda directs Prospero to a daughter cell during *Drosophila* asymmetric divisions. *Nature* 390, 625-9.
- Ingham, P.W. (1988). The molecular genetics of embryonic pattern formation in *Drosophila*. *Nature* 335, 25-34.
- Ishikawa, F., Matunis, M.J., Dreyfuss, G., and Cech, T.R. (1993). Nuclear proteins that bind the pre-mRNA 3' splice site sequence r(UUAG/G) and the human telomeric DNA sequence d(TTAGGG)_n. *Mol Cell Biol* 13, 4301-10.

Izaurre, E. and Adam, S. (1998). Transport of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. *Rna* 4, 351-64.

Izaurre, E. and Mattaj, I. W. (1995). RNA export. *Cell* 81, 153-9.

Jacobson, M. R. and Pederson, T. (1998). Localization of signal recognition particle RNA in the nucleolus of mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7981-6.

Jans, D. A. and Hubner, S. (1996). Regulation of protein transport to the nucleus: central role of phosphorylation. *Physiol Rev* 76, 651-85.

Jansen, R. P., Dowzer, C., Michaelis, C., Galova, M., and Nasmyth, K. (1996). Mother cell-specific HO expression in budding yeast depends on the unconventional myosin myo4p and other cytoplasmic proteins. *Cell* 84, 687-97.

Kaffman, A., Rank, N. M., and O'Shea, E. K. (1998a). Phosphorylation regulates association of the transcription factor Pho4 with its import receptor Pse1/Kap121. *Genes Dev* 12, 2673-83.

Kaffman, A., Rank, N. M., O'Neill, E. M., Huang, L. S., and O'Shea, E. K. (1998b). The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. *Nature* 396, 482-6.

Kalderon, D., Richardson, W. D., Markham, A. F., and Smith, A. E. (1984). Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* 311, 33-8.

Kang, H., Jia, L. Z., Suh, K. Y., Tang, L., and Schuman, E. M. (1996). Determinants of BDNF-induced hippocampal synaptic plasticity: role of the Trk B receptor and the kinetics of neurotrophin delivery. *Learn Mem* 3, 188-96.

Keene, J. D. (2001). Ribonucleoprotein infrastructure regulating the flow of genetic information between the genome and the proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7018-24.

- Keene, J.D. and Tenenbaum, S.A. (2002). Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. *Mol Cell* *9*, 1161-7.
- Kenan, D.J., Query, C.C., and Keene, J.D. (1991). RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem Sci* *16*, 214-20.
- Kenmochi, N., Kawaguchi, T., Rozen, S., Davis, E., Goodman, N., Hudson, T.J., Tanaka, T., and Page, D.C. (1998). A map of 75 human ribosomal protein genes. *Genome Res* *8*, 509-23.
- Kharrat, A., Macias, M.J., Gibson, T.J., Nilges, M., and Pastore, A. (1995). Structure of the dsRNA binding domain of E. coli RNase III. *Embo J* *14*, 3572-84.
- Kiebler, M.A., Hemraj, I., Verkade, P., Kohrmann, M., Fortes, P., Marion, R.M., Ortin, J., and Dotti, C.G. (1999). The mammalian stau protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J Neurosci* *19*, 288-97.
- Kiledjian, M., Dreyfuss, G. (1994). Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *Embo J* *11*, 2655-64.
- Kim-Ha, J., Kerr, K., and Macdonald, P.M. (1995). Translational regulation of oskar mRNA by bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential. *Cell* *81*, 403-12.
- Kim-Ha, J., Smith, J.L., and Macdonald, P.M. (1991). oskar mRNA is localized to the posterior pole of the Drosophila oocyte. *Cell* *66*, 23-35.
- King, M.L., Zhou, Y., and Bubunenko, M. (1999). Polarizing genetic information in the egg: RNA localization in the frog oocyte. *Bioessays* *21*, 546-57.
- Kislauskis, E.H., Li, Z., Singer, R.H., and Taneja, K.L. (1993). Isoform-specific 3'-untranslated sequences sort alpha-cardiac and beta- cytoplasmic actin messenger RNAs to different cytoplasmic compartments. *J Cell Biol* *123*, 165-72.

Kislauskis,E.H., Zhu,X., and Singer,R.H. (1994). Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype. *J Cell Biol* 127, 441-51.

Kleiman,R., Banker,G., and Steward,O. (1990). Differential subcellular localization of particular mRNAs in hippocampal neurons in culture. *Neuron* 5, 821-30.

Kloc,M., Bilinski,S., Chan,A.P., Allen,L.H., Zearfoss,N.R., and Etkin,L.D. (2001). RNA localization and germ cell determination in *Xenopus*. *Int Rev Cytol* 203, 63-91.

Kloc,M., Dougherty,M.T., Bilinski,S., Chan,A.P., Brey,E., King,M.L., Patrick,C.W., Jr., and Etkin,L.D. (2002a). Three-dimensional ultrastructural analysis of RNA distribution within germinal granules of *Xenopus*. *Dev Biol* 241, 79-93.

Kloc,M. and Etkin,L.D. (1995). Two distinct pathways for the localization of RNAs at the vegetal cortex in *Xenopus* oocytes. *Development* 121, 287-97.

Kloc,M., Zearfoss,N.R., and Etkin,L.D. (2002b). Mechanisms of subcellular mRNA localization. *Cell* 108, 533-44.

Kohrmann,M., Luo,M., Kaether,C., DesGroseillers,L., Dotti,C.G., and Kiebler,M.A. (1999). Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol Biol Cell* 10, 2945-53.

Komeili,A. and O'Shea,E.K. (1999). Roles of phosphorylation sites in regulating activity of the transcription factor Pho4. *Science* 284, 977-80.

Krichevsky,A.M. and Kosik,K.S. (2001). Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation- dependent translation. *Neuron* 32, 683-96.

Krovat,B.C. and Jantsch,M.F. (1996). Comparative mutational analysis of the double-stranded RNA binding domains of *Xenopus laevis* RNA-binding protein A. *J Biol Chem* 271, 28112-9.

Kubota,S., Siomi,H., Satoh,T., Endo,S., Maki,M., and Hatanaka,M. (1989). Functional similarity of HIV-I rev and HTLV-I rex proteins: identification of a new nucleolar-targeting signal in rev protein. *Biochem Biophys Res Commun* 162, 963-70.

Kutay,U., Bischoff,F.R., Kostka,S., Kraft,R., and Gorlich,D. (1997). Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* 90, 1061-71.

Kwon,S., Abramson,T., Munro,T.P., John,C.M., Kohrmann,M., and Schnapp,B.J. (2002). UUCAC- and vera-dependent localization of VegT RNA in *Xenopus* oocytes. *Curr Biol* 12, 558-64.

Lall,S., Francis-Lang,H., Flament,A., Norvell,A., Schupbach,T., and Ish-Horowicz,D. (1999). Squid hnRNP protein promotes apical cytoplasmic transport and localization of *Drosophila* pair-rule transcripts. *Cell* 98, 171-80.

Lantz,V.A., Clemens,S.E., and Miller,K.G. (1999). The actin cytoskeleton is required for maintenance of posterior pole plasm components in the *Drosophila* embryo. *Mech Dev* 85, 111-22.

Lasko,P. (1999). RNA sorting in *Drosophila* oocytes and embryos. *Faseb J* 13, 421-33.

Lawrence,J.B. and Singer,R.H. (1986). Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal proteins. *Cell* 45, 407-15.

Le Hir,H., Gatfield,D., Izaurralde,E., and Moore,M.J. (2001). The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *Embo J* 20, 4987-97.

Le,S., Sternglanz,R., and Greider,C.W. (2000). Identification of two RNA-binding proteins associated with human telomerase RNA. *Mol Biol Cell* 11, 999-1010.

Lee,S., Chen,D.Y., Humphrey,J.S., Gnarra,J.R., Linehan,W.M., and Klausner,R.D. (1996). Nuclear/cytoplasmic localization of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product is determined by cell density. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1770-5.

Lehmann,R. and Nusslein-Volhard,C. (1986). Abdominal segmentation, pole cell formation, and embryonic polarity require the localized activity of oskar, a maternal gene in *Drosophila*. *Cell* 47, 141-52.

Lei,E.P. and Silver,P.A. (2002). Protein and RNA export from the nucleus. *Dev Cell* 2, 261-72.

Levesque,L., Guzik,B., Guan,T., Coyle,J., Black,B.E., Rekosh,D., Hammarskjold,M.L., and Paschal,B.M. (2001). RNA export mediated by tap involves NXT1-dependent interactions with the nuclear pore complex. *J Biol Chem* 276, 44953-62.

Li,P., Yang,X., Wasser,M., Cai,Y., and Chia,W. (1997). Inscuteable and Staufen mediate asymmetric localization and segregation of prospero RNA during *Drosophila* neuroblast cell divisions. *Cell* 90, 437-47.

Li,Y., Koike,K., Ohashi,S., Funakoshi,T., Tadano,M., Kobayashi,S., Anzai,K., Shibata,N., and Kobayashi,M. (2001). Pur alpha protein implicated in dendritic RNA transport interacts with ribosomes in neuronal cytoplasm. *Biol Pharm Bull* 24, 231-5.

Lie,Y.S. and Macdonald,P.M. (1999). Apontic binds the translational repressor Bruno and is implicated in regulation of oskar mRNA translation. *Development* 126, 1129-38.

Lin,H. and Spradling,A.C. (1995). Fusome asymmetry and oocyte determination in *Drosophila*. *Dev Genet* 16, 6-12.

Lipowsky,G., Bischoff,F.R., Izaurrealde,E., Kutay,U., Schafer,S., Gross,H.J., Beier,H., and Gorlich,D. (1999). Coordination of tRNA nuclear export with processing of tRNA. *Rna* 5, 539-49.

Lipshitz,H.D. and Smibert,C.A. (2000). Mechanisms of RNA localization and translational regulation. *Curr Opin Genet Dev* 10, 476-88.

Long,R.M., Gu,W., Lorimer,E., Singer,R.H., and Chartrand,P. (2000). She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to ASH1 mRNA. *Embo J* 19, 6592-601.

Long,R.M., Singer,R.H., Meng,X., Gonzalez,I., Nasmyth,K., and Jansen,R.P. (1997). Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA. *Science* 277, 383-7.

Luo,M., Duchaine,T.F., and DesGroseillers,L. (2002). Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen- ribosome association. *Biochem J* 365, 817-24.

Macdonald,P.M. (1990). bicoid mRNA localization signal: phylogenetic conservation of function and RNA secondary structure. *Development* 110, 161-71.

Macdonald,P.M. and Kerr,K. (1998). Mutational analysis of an RNA recognition element that mediates localization of bicoid mRNA. *Mol Cell Biol* 18, 3788-95.

Macdonald,P.M., Kerr,K., Smith,J.L., and Leask,A. (1993). RNA regulatory element BLE1 directs the early steps of bicoid mRNA localization. *Development* 118, 1233-43.

Macdonald,P.M. and Struhl,G. (1988). cis-acting sequences responsible for anterior localization of bicoid mRNA in *Drosophila* embryos. *Nature* 336, 595-8.

Makkerh,J.P., Dingwall,C., and Laskey,R.A. (1996). Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids. *Curr Biol* 6, 1025-7.

Malatesta,M., Zancanaro,C., Martin,T.E., Chan,E.K., Amalric,F., Luhrmann,R., Vogel,P., and Fakan,S. (1994). Is the coiled body involved in nucleolar functions? *Exp Cell Res* 211, 415-9.

Mallardo,M., Deitinghoff,A., Muller,J., Goetze,B., Macchi,P., Peters,C., and Kiebler,M.A. (2003). Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2100-5.

Marion,R.M., Fortes,P., Beloso,A., Dotti,C., and Ortin,J. (1999). A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 19, 2212-9.

Matera,A.G., Frey,M.R., Margelot,K., and Wolin,S.L. (1995). A perinucleolar compartment contains several RNA polymerase III transcripts as well as the polypyrimidine tract-binding protein, hnRNP I. *J Cell Biol* 129, 1181-93.

Matus,A. (1999). Postsynaptic actin and neuronal plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 9, 561-5.

Mayford,M., Bach,M.E., Huang,Y.Y., Wang,L., Hawkins,R.D., and Kandel,E.R. (1996). Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* 274, 1678-83.

Melchior,F. and Gerace,L. (1998). Two-way trafficking with Ran. *Trends Cell Biol* 8, 175-9.

Michael,W.M., Choi,M., and Dreyfuss,G. (1995). A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature- dependent nuclear protein export pathway. *Cell* 83, 415-22.

- Michael,W.M., Eder,P.S., and Dreyfuss,G. (1997). The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *Embo J* 16, 3587-98.
- Micklem,D.R., Adams,J., Grunert,S., and St Johnston,D. (2000). Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. *Embo J* 19, 1366-77.
- Mitchell,J.R., Cheng,J., and Collins,K. (1999). A box H/ACA small nucleolar RNA-like domain at the human telomerase RNA 3' end. *Mol Cell Biol* 19, 567-76.
- Mitchell,J.R. and Collins,K. (2000). Human telomerase activation requires two independent interactions between telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell* 6, 361-71.
- Monshausen,M., Rehbein,M., Richter,D., and Kindler,S. (2002). The RNA-binding protein Staufen from rat brain interacts with protein phosphatase-1. *J Neurochem* 81, 557-64.
- Moore,M.S. (1998). Ran and nuclear transport. *J Biol Chem* 273, 22857-60.
- Mouland,A.J., Mercier,J., Luo,M., Bernier,L., DesGroseillers,L., and Cohen,E.A. (2000). The double-stranded RNA-binding protein Staufen is incorporated in human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in genomic RNA encapsidation. *J Virol* 74, 5441-51.
- Mowry,K.L. and Cote,C.A. (1999). RNA sorting in *Xenopus* oocytes and embryos. *Faseb J* 13, 435-45.
- Mowry,K.L. and Melton,D.A. (1992). Vegetal messenger RNA localization directed by a 340-nt RNA sequence element in *Xenopus* oocytes. *Science* 255, 991-4.
- Moy,T.I. and Silver,P.A. (2002). Requirements for the nuclear export of the small ribosomal subunit. *J Cell Sci* 115, 2985-95.

Musco,G., Stier,G., Joseph,C., Castiglione Morelli,M.A., Nilges,M., Gibson,T.J., and Pastore,A. (1996). Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insights into the fragile X syndrome. *Cell* 85, 237-45.

Nachury,M.V. and Weis,K. (1999). The direction of transport through the nuclear pore can be inverted. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9622-7.

Nagai,K., Oubridge,C., Jessen,T.H., Li,J., and Evans,P.R. (1990a). Crystal structure of the RNA-binding domain of the U1 small nuclear ribonucleoprotein A. *Nature* 348, 515-20.

Nakayama,J., Saito,M., Nakamura,H., Matsuura,A., and Ishikawa,F. (1997). TLP1: a gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. *Cell* 88, 875-84.

Nakielnny,S., Siomi,M.C., Siomi,H., Michael,W.M., Pollard,V., and Dreyfuss,G. (1996). Transportin: nuclear transport receptor of a novel nuclear protein import pathway. *Exp Cell Res* 229, 261-6.

Nanduri,S., Carpick,B., Yang,Y., Williams,B.R., and Qin,J. (1998). ¹H, ¹³C, ¹⁵N resonance assignment of the 20 kDa double stranded RNA binding domain of PKR. *J Biomol NMR* 12, 349-51.

Narayanan,A., Lukowiak,A., Jady,B.E., Dragon,F., Kiss,T., Terns,R.M., and Terns,M.P. (1999). Nucleolar localization signals of box H/ACA small nucleolar RNAs. *Embo J* 18, 5120-30.

Neuman-Silberberg,F.S. and Schupbach,T. (1993). The *Drosophila* dorsoventral patterning gene *gurken* produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF alpha-like protein. *Cell* 75, 165-74.

Neville,M. and Rosbash,M. (1999). The NES-Crm1p export pathway is not a major mRNA export route in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 18, 3746-56.

Neville,M., Stutz,F., Lee,L., Davis,L.I., and Rosbash,M. (1997). The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. *Curr Biol* 7, 767-75.

Nguyen,Q.T. and Lichtman,J.W. (1996). Mechanism of synapse disassembly at the developing neuromuscular junction. *Curr Opin Neurobiol* 6, 104-12.

Nietfeld,W., Mentzel,H., and Pieler,T. (1990). The *Xenopus laevis* poly(A) binding protein is composed of multiple functionally independent RNA binding domains. *Embo J* 9, 3699-705.

Norvell,A., Kelley,R.L., Wehr,K., and Schupbach,T. (1999). Specific isoforms of squid, a *Drosophila* hnRNP, perform distinct roles in Gurken localization during oogenesis. *Genes Dev* 13, 864-76.

Nugent,C.I. and Lundblad,V. (1998). The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev* 12, 1073-85.

Nusslein-Volhard,C., Frohnhofe,H.G., and Lehmann,R. (1987). Determination of anteroposterior polarity in *Drosophila*. *Science* 238, 1675-81.

Ochs,R.L., Reilly,M.T., Freeman,J.W., and Busch,H. (1988). Intranucleolar localization of human proliferating cell nucleolar antigen p120. *Cancer Res* 48, 6523-9.

Ohashi,S., Koike,K., Omori,A., Ichinose,S., Ohara,S., Kobayashi,S., Sato,T.A., and Anzai,K. (2002). Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor. *J Biol Chem* 277, 37804-10.

Ohno,M., Segref,A., Kuersten,S., and Mattaj,I.W. (2002). Identity elements used in export of mRNAs. *Mol Cell* 9, 659-71.

Ohtsubo,M., Okazaki,H., and Nishimoto,T. (1989). The RCC1 protein, a regulator for the onset of chromosome condensation locates in the nucleus and binds to DNA. *J Cell Biol* 109, 1389-97.

Oleynikov,Y. and Singer,R.H. (2003). Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization. *Curr Biol* 13, 199-207.

Ouhibi,N., Fulka,J., Jr., Kanka,J., and Moor,R.M. (1994). A reversible block at the G1/S border during cell cycle progression of mouse embryos. *Int J Dev Biol* 38, 731-6.

Palacios,I.M. and St Johnston,D.S. (2002). Kinesin light chain-independent function of the Kinesin heavy chain in cytoplasmic streaming and posterior localisation in the *Drosophila* oocyte. *Development* 129, 5473-85.

Pasquinelli,A.E., Ernst,R.K., Lund,E., Grimm,C., Zapp,M.L., Rekosh,D., Hammarskjold,M.L., and Dahlberg,J.E. (1997). The constitutive transport element (CTE) of Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) accesses a cellular mRNA export pathway. *Embo J* 16, 7500-10.

Pederson,T. (1998). The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res* 26, 3871-6.

Pinol-Roma,S. and Dreyfuss,G. (1992). Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature* 355, 730-2.

Pogacic,V., Dragon,F., and Filipowicz,W. (2000). Human H/ACA small nucleolar RNPs and telomerase share evolutionarily conserved proteins NHP2 and NOP10. *Mol Cell Biol* 20, 9028-40.

Pokrywka,N.J. and Stephenson,E.C. (1995). Microtubules are a general component of mRNA localization systems in *Drosophila* oocytes. *Dev Biol* 167, 363-70.

Polesello,C., Delon,I., Valenti,P., Ferrer,P., and Payre,F. (2002). Dmoesin controls actin-based cell shape and polarity during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Nat Cell Biol* 4, 782-9.

Politz,J.C., Lewandowski,L.B., and Pederson,T. (2002). Signal recognition particle RNA localization within the nucleolus differs from the classical sites of ribosome synth. *J Cell Biol* 59, 411-8.

Politz,J.C., Yarovoi,S., Kilroy,S.M., Gowda,K., Zwieb,C., and Pederson,T. (2000). Signal recognition particle components in the nucleolus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 55-60.

Query,C.C., Bentley,R.C., and Keene,J.D. (1989). A common RNA recognition motif identified within a defined U1 RNA binding domain of the 70K U1 snRNP protein. *Cell* 57, 89-101.

Radu,A., Blobel,G., and Moore,M.S. (1995). Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1769-73.

Ramos,A., Grunert,S., Adams,J., Micklem,D.R., Proctor,M.R., Freund,S., Bycroft,M., St Johnston,D., and Varani,G. (2000). RNA recognition by a Staufen double-stranded RNA-binding domain. *Embo J* 19, 997-1009.

Rexach,M. and Blobel,G. (1995). Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell* 83, 683-92.

Ribbeck,K., Lipowsky,G., Kent,H.M., Stewart,M., and Gorlich,D. (1998). NTF2 mediates nuclear import of Ran. *Embo J* 17, 6587-98.

Richards,S.A., Carey,K.L., and Macara,I.G. (1997). Requirement of guanosine triphosphate-bound ran for signal-mediated nuclear protein export. *Science* 276, 1842-4.

Rivera-Pomar,R., Niessing,D., Schmidt-Ott,U., Gehring,W.J., and Jackle,H. (1996). RNA binding and translational suppression by bicoid. *Nature* 379, 746-9.

Robbins,J., Dilworth,S.M., Laskey,R.A., and Dingwall,C. (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* 64, 615-23.

Rodrigues,J.P., Rode,M., Gatfield,D., Blencowe,B.J., Carmo-Fonseca,M., and Izaurralde,E. (2001). REF proteins mediate the export of spliced and unspliced mRNAs from the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1030-5.

Ross,A.F., Oleynikov,Y., Kislauskis,E.H., Taneja,K.L., and Singer,R.H. (1997). Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol Cell Biol* 17, 2158-65.

Rout,M.P., Aitchison,J.D., Suprpto,A., Hjertaas,K., Zhao,Y., and Chait,B.T. (2000). The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol* 148, 635-51.

Ryter,J.M. and Schultz,S.C. (1998). Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA. *Embo J* 17, 7505-13.

Saavedra,C., Felber,B., and Izaurralde,E. (1997). The simian retrovirus-1 constitutive transport element, unlike the HIV- 1 RRE, uses factors required for cellular mRNA export. *Curr Biol* 7, 619-28.

Saffman,E.E., Styhler,S., Rother,K., Li,W., Richard,S., and Lasko,P. (1998). Premature translation of oskar in oocytes lacking the RNA-binding protein bicaudal-C. *Mol Cell Biol* 18, 4855-62.

Saunders,C. and Cohen,R.S. (1999). The role of oocyte transcription, the 5'UTR, and translation repression and derepression in *Drosophila* gurken mRNA and protein localization. *Mol Cell* 3, 43-54.

Scheer,U. and Hock,R. (1999). Structure and function of the nucleolus. *J Cell Sci* 114, 709-18.

Scherly,D., Kambach,C., Boelens,W., van Venrooij,W.J., and Mattaj,I.W. (1991). Conserved amino acid residues within and outside of the N-terminal ribonucleoprotein motif of U1A small nuclear ribonucleoprotein involved in U1 RNA binding. *J Mol Biol* 219, 577-84.

Schnapp,G., Rodi,H.P., Rettig,W.J., Schnapp,A., and Damm,K. (1998). One-step affinity purification protocol for human telomerase. *Nucleic Acids Res* 26, 3311-3.

Schnorrer,F., Bohmann,K., and Nusslein-Volhard,C. (2000). The molecular motor dynein is involved in targeting swallow and bicoid RNA to the anterior pole of *Drosophila* oocytes. *Nat Cell Biol* 2, 185-90.

Schuldt,A.J., Adams,J.H., Davidson,C.M., Micklem,D.R., Haseloff,J., St Johnston,D., and Brand,A.H. (1998). Miranda mediates asymmetric protein and RNA localization in the developing nervous system. *Genes Dev* 12, 1847-57.

Schuman,E.M. (1999). mRNA trafficking and local protein synthesis at the synapse. *Neuron* 23, 645-8.

Seeger,M.A. and Kaufman,T.C. (1990). Molecular analysis of the bicoid gene from *Drosophila pseudoobscura*: identification of conserved domains within coding and noncoding regions of the bicoid mRNA. *Embo J* 9, 2977-87.

Segref,A., Sharma,K., Doye,V., Hellwig,A., Huber,J., Luhrmann,R., and Hurt,E. (1997). Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)+ RNA and nuclear pores. *Embo J* 16, 3256-71.

Serano,T.L., Karlin-McGinness,M., and Cohen,R.S. (1995). The role of fs(1)K10 in the localization of the mRNA of the TGF alpha homolog gurken within the *Drosophila* oocyte. *Mech Dev* 51, 183-92.

Shen,C.P., Knoblich,J.A., Chan,Y.M., Jiang,M.M., Jan,L.Y., and Jan,Y.N. (1998). Miranda as a multidomain adapter linking apically localized Inscuteable and basally localized Staufen and Prospero during asymmetric cell division in *Drosophila*. *Genes Dev* 12, 1837-46.

Sil,A. and Herskowitz,I. (1996). Identification of asymmetrically localized determinant, Ash1p, required for lineage-specific transcription of the yeast HO gene. *Cell* 84, 711-22.

Simon,A.M., Hoppe,P., and Burden,S.J. (1992). Spatial restriction of AChR gene expression to subsynaptic nuclei. *Development* 114, 545-53.

Siomi,H. and Dreyfuss,G. (1995). A nuclear localization domain in the hnRNP A1 protein. *J Cell Biol* 129, 551-60.

Siomi,H., Matunis,M.J., Michael,W.M., and Dreyfuss,G. (1993). The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acids Res* 21, 1193-8.

Siomi,H., Shida,H., Nam,S.H., Nosaka,T., Maki,M., and Hatanaka,M. (1988). Sequence requirements for nucleolar localization of human T cell leukemia virus type I pX protein, which regulates viral RNA processing. *Cell* 55, 197-209.

Smith,A., Brownawell,A., and Macara,I.G. (1998). Nuclear import of Ran is mediated by the transport factor NTF2. *Curr Biol* 8, 1403-6.

Spector,D.L. (1993). Macromolecular domains within the cell nucleus. *Annu Rev Cell Biol* 9, 265-315.

St Johnston,D. (2001). The beginning of the end. *Embo J* 20, 6169-79.

St Johnston,D., Beuchle,D., and Nusslein-Volhard,C. (1991). Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* 66, 51-63.

St Johnston,D., Brown,N.H., Gall,J.G., and Jantsch,M. (1992). A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10979-83.

St Johnston,D., Driever,W., Berleth,T., Richstein,S., and Nusslein-Volhard,C. (1989). Multiple steps in the localization of bicoid RNA to the anterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Development* 107, 13-9.

Stade,K., Ford,C.S., Guthrie,C., and Weis,K. (1997). Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* 90, 1041-50.

Stoffler,D., Fahrenkrog,B., and Aebi,U. (1999). The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 11, 391-401.

Strasser,K., Bassler,J., and Hurt,E. (2000). Binding of the Mex67p/Mtr2p heterodimer to FXFG, GLFG, and FG repeat nucleoporins is essential for nuclear mRNA export. *J Cell Biol* 150, 695-706.

Stutz,F., Bachi,A., Doerks,T., Braun,I.C., Seraphin,B., Wilm,M., Bork,P., and Izaurralde,E. (2000). REF, an evolutionary conserved family of hnRNP-like proteins, interacts with TAP/Mex67p and participates in mRNA nuclear export. *Rna* 6, 638-50.

Stutz,F. and Rosbash,M. (1994). A functional interaction between Rev and yeast pre-mRNA is related to splicing complex formation. *Embo J* 13, 4096-104.

Swanson,M.S., Nakagawa,T.Y., LeVan,K., and Dreyfuss,G. (1987). Primary structure of human nuclear ribonucleoprotein particle C proteins: conservation of sequence and domain structures in heterogeneous nuclear RNA, mRNA, and pre-rRNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 7, 1731-9.

Takizawa,P.A., Sil,A., Swedlow,J.R., Herskowitz,I., and Vale,R.D. (1997). Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast. *Nature* 389, 90-3.

Takizawa,P.A. and Vale,R.D. (2000). The myosin motor, Myo4p, binds Ash1 mRNA via the adapter protein, She3p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5273-8.

Tang,S.J., Meulemans,D., Vazquez,L., Colaco,N., and Schuman,E. (2001). A role for a rat homolog of stau6 in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron* 32, 463-75.

Theurkauf,W.E., Smiley,S., Wong,M.L., and Alberts,B.M. (1992). Reorganization of the cytoskeleton during *Drosophila* oogenesis: implications for axis specification and intercellular transport. *Development* 115, 923-36.

Trapp,B.D., Moench,T., Pulley,M., Barbosa,E., Tennekoon,G., and Griffin,J. (1987). Spatial segregation of mRNA encoding myelin-specific proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7773-7.

Uechi,T., Tanaka,T., and Kenmochi,N. (2001). A complete map of the human ribosomal protein genes: assignment of 80 genes to the cytogenetic map and implications for human disorders. *Genomics* 72, 223-30.

Urbani,L., Sherwood,S.W., and Schimke,R.T. (1995). Dissociation of nuclear and cytoplasmic cell cycle progression by drugs employed in cell synchronization. *Exp Cell Res* 219, 159-68.

van Eeden,F. and St Johnston,D. (1999). The polarisation of the anterior-posterior and dorsal-ventral axes during *Drosophila* oogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 9, 396-404.

Venema,J. and Tollervey,D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 33, 261-311.

Walter,P. and Johnson,A.E. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* 10, 87-119.

Wang,C., Dickinson,L.K., and Lehmann,R. (1994). Genetics of nanos localization in *Drosophila*. *Dev Dyn* 199, 103-15.

Wang,Z., Frederick,J., and Garabedian,M.J. (2002). Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor in vivo. *J Biol Chem* 277, 26573-80.

Watanabe,H., Kislauskis,E.H., Mackay,C.A., Mason-Savas,A., and Marks,S.C., Jr. (1998). Actin mRNA isoforms are differentially sorted in normal osteoblasts and sorting is altered in osteoblasts from a skeletal mutation in the rat. *J Cell Sci* 111, 1287-92.

Webster,P.J., Liang,L., Berg,C.A., Lasko,P., and Macdonald,P.M. (1997). Translational repressor bruno plays multiple roles in development and is widely conserved. *Genes Dev* 11, 2510-21.

Weiss,M.A., Naraya,N. (1998). RNA recognition by arginine-rich peptide motifs. *Biopolymers* 48, 167-80.

Wen,W., Meinkoth,J.L., Tsien,R.Y., and Taylor,S.S. (1995). Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* 82, 463-73.

Whittaker,G.R. and Helenius,A. (1998). Nuclear import and export of viruses and virus genomes. *Virology* 246, 1-23.

Wickham,L., Duchaine,T., Luo,M., Nabi,I.R., and DesGroseillers,L. (1999). Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 19, 2220-30.

Wiegand,H.L., Coburn,G.A., Zeng,Y., Kang,Y., Bogerd,H.P., and Cullen,B.R. (2002). Formation of Tap/NXT1 heterodimers activates Tap-dependent nuclear mRNA export by enhancing recruitment to nuclear pore complexes. *Mol Cell Biol* 22, 245-56.

Wilson,J.E., Connell,J.E., Schlenker,J.D., and Macdonald,P.M. (1996). Novel genetic screen for genes involved in posterior body patterning in *Drosophila*. *Dev Genet* 19, 199-209.

Wittekind,M., Gorlach,M., Friedrichs,M., Dreyfuss,G., and Mueller,L. (1992). ¹H, ¹³C, and ¹⁵N NMR assignments and global folding pattern of the RNA- binding domain of the human hnRNP C proteins. *Biochemistry* 31, 6254-65.

Yamashita,A., Watanabe,Y., Nukina,N., and Yamamoto,M. (1998). RNA-assisted nuclear transport of the meiotic regulator Mei2p in fission yeast. *Cell* 95, 115-23.

Yang,J., Bogerd,H.P., Peng,S., Wiegand,H., Truant,R., and Cullen,B.R. (1999). An ancient family of human endogenous retroviruses encodes a functional homolog of the HIV-1 Rev protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13404-8.

Yang,Y., Chen,Y., Zhang,C., Huang,H., and Weissman,S.M. (2002). Nucleolar localization of hTERT protein is associated with telomerase function. *Exp Cell Res* 277, 201-9.

Yaniv,K. and Yisraeli,J.K. (2001). Defining cis-acting elements and trans-acting factors in RNA localization. *Int Rev Cytol* 203, 521-39.

Yewdell,J. and Garcia-Sastre,A. (2002). Influenza virus still surprises. *Curr Opin Microbiol* 5, 414-8.

Yisraeli,J.K., Sokol,S., and Melton,D.A. (1990). A two-step model for the localization of maternal mRNA in *Xenopus* oocytes: involvement of microtubules and microfilaments in the translocation and anchoring of Vg1 mRNA. *Development* 108, 289-98.

Yoshihama,M., Uechi,T., Asakawa,S., Kawasaki,K., Kato,S., Higa,S., Maeda,N., Minoshima,S., Tanaka,T., Shimizu,N., and Kenmochi,N. (2002). The human ribosomal protein genes: sequencing and comparative analysis of 73 genes. *Genome Res* 12, 379-90.

Zabel,U., Henkel,T., Silva,M.S., and Baeuerle,P.A. (1993). Nuclear uptake control of NF-kappa B by MAD-3, an I kappa B protein present in the nucleus. *Embo J* 12, 201-11.

Zasloff, M. (1983). tRNA transport from the nucleus in a eukaryotic cell: carrier-mediated translocation process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 6436-40.

Zauner, W., Kratz, J., Staunton, J., Feick, P., and Wiche, G. (1992). Identification of two distinct microtubule binding domains on recombinant rat MAP 1B. *Eur J Cell Biol* 57, 66-74.

Zhang, F., White, R.L., and Neufeld, K.L. (2000). Phosphorylation near nuclear localization signal regulates nuclear import of adenomatous polyposis coli protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12577-82.

Zhang, F., White, R.L., and Neufeld, K.L. (2001a). Cell density and phosphorylation control the subcellular localization of adenomatous polyposis coli protein. *Mol Cell Biol* 21, 8143-56.

Zhang, H.L., Eom, T., Oleynikov, Y., Shenoy, S.M., Liebelt, D.A., Dichtenberg, J.B., Singer, R.H., and Bassell, G.J. (2001b). Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNA complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron* 31, 261-75.

Zhang, H.L., Singer, R.H., and Bassell, G.J. (1999). Neurotrophin regulation of beta-actin mRNA and protein localization within growth cones. *J Cell Biol* 147, 59-70.

Zhou, Y. and King, M.L. (1996). Localization of Xcat-2 RNA, a putative germ plasm component, to the mitochondrial cloud in *Xenopus* stage I oocytes. *Development* 122, 2947-53.

Zolotukhin, A.S. and Felber, B.K. (1999). Nucleoporins nup98 and nup214 participate in nuclear export of human immunodeficiency virus type 1 Rev. *J Virol* 73, 120-7.