

Université de Montréal

Caractérisation moléculaire des complexes ribonucléoprotéiques  
des neurones de mammifères

Par

George Elvira

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine

En vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph.D.)

En Biochimie

Juin 2005

©George Elvira, 2005



W

4

U58

2005

V. 164

**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 de Médecine

Cette thèse intitulée :

Caractérisation moléculaire des complexes ribonucléoprotéiques

des neurones de mammifères

Présentée par :

George Elvira

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Pascal Chartrand    Président-rapporteur

Luc DesGroseillers    Directeur de Recherche

Nicole Leclerc    Membre du jury

Paul De Koninck    Examineur externe

## RÉSUMÉ

---

Dans les neurones, le transport d'ARNm dans des complexes ribonucléoprotéiques (RNP) de haute densité est essentiel à la synaptogenèse, la mémoire et l'apprentissage. Au moment d'entreprendre nos études, l'identité et la fonction des protéines engagées dans la formation de ces complexes RNP étaient peu connues. En collaboration avec des chercheurs de l'Institut de Neurologie de Montréal, nous avons développé une approche expérimentale qui permet d'identifier plusieurs composants protéiques de ces complexes. Pour ce faire, nous avons utilisé une approche de fractionnement subcellulaire afin d'enrichir des complexes RNP à partir de lysat de cerveaux embryonnaires de rat. Par la suite, nous avons soumis cette fraction à une caractérisation de style protéomique et identifié plusieurs protéines. Nous avons montré que le fractionnement subcellulaire utilisé permet d'enrichir des structures macromoléculaires qui répondent aux caractéristiques établies pour les complexes RNP de transport dendritique. Ensuite, une approche biocellulaire a permis de valider l'approche expérimentale utilisée en démontrant la localisation des protéines ainsi identifiées dans des complexes RNP dendritiques qui se déplacent avec des vitesses typiques des moteurs moléculaires dendritiques. Nous montrons l'importance de la protéine DDX3 dans la stabilisation et/ou la formation de complexes RNP somatodendritiques. Cette étude a également montrée la présence d'une population hétérogène de complexes RNP, soit ceux spécifiques à la protéine DDX3 et ceux à la protéine encodée par le gène *CGI-99*. Nous montrons que la surexpression de CGI-99 inhibe le transport dendritique des complexes DDX3 suggérant que les complexes RNP peuvent faire compétition pour des facteurs de transport dont la quantité serait limitée.

Nous avons également montré par une approche classique de criblage d'une banque d'ADNc de cerveau foetal de souris que la protéine ZFR, principalement nucléaire, interagit avec la protéine Staufen2, un marqueur des complexes RNP dendritiques. Cette interaction cytoplasmique est supportée par plusieurs essais biochimiques. Une approche d'interférence par ARN (RNAi) a permis d'identifier un rôle critique de ZFR dans la navette nucléo-cytoplasmique de Staufen2; lorsque l'expression de ZFR est inhibée, l'isoforme de 62 kDa de Staufen2, normalement cytoplasmique, est enrichie dans le noyau des cellules traitées.

Mots clés :Staufen, ARNm, transport, mémoire, développement.

## ABSTRACT

---

In neurons, some mRNAs are transported in dendrites as heavy ribonucleoprotein complexes (RNP). This localization process is essential to synaptogenesis, memory and learning. At the time we undertook our studies, little was known about the identity and function of proteins engaged in the formation of these RNP complexes. In collaboration with researchers from the Montreal Neurology Institute, we developed a large scale experimental approach which made it possible to identify several protein components of these complexes. We used a subcellular fractionation approach to enrich a heavy RNP fraction from rat brain embryonic lysate. Thereafter, we subjected this fraction to a proteomic characterization and identified several proteins. We showed that the macromolecular structures enriched by this protocol meet the established characteristics of heavy dendritic RNP complexes. A biocellular approach made it possible to validate the subcellular fractionation / proteomic experimental approach used. We showed the localization of identified proteins in dendritic RNP complexes which move with typical molecular motor speeds. We show the importance of the DDX3 protein in the stabilization and/or formation of somatodendritic RNP complexes. This study also showed the presence of a heterogeneous population of complexes RNP. Moreover, we show that heterogeneous RNP complexes can influence one another by potentially sharing critical factors for dendritic transport. Indeed, overexpression of CGI-99 led to a dramatic decrease in the amount dendritic DDX3 granules.

We also show by the yeast two hybrid screen of a mouse foetal brain library that the ZFR protein, mainly nuclear, interacts with the Staufen2 protein, a marker of dendritic RNP complexes. This cytoplasmic interaction is further supported by several biochemical assays. RNA interference (RNAi) made it possible to identify a critical role

for ZFR in the Staufen2 nucleo-cytoplasmic shuttling; when ZFR is downregulated, the 62 kDa isoform, normally cytoplasmic, is enriched in the nucleus of treated cells.

Keywords : Ribonucleoprotein, neuron, dendrite, Staufen, RNA, transport, localization, granule, LTP.



## TABLE DES MATIÈRES

|  |            |
|--|------------|
| <b>RÉSUMÉ</b>  | <b>III</b> |
| <b>ABSTRACT</b>  | <b>V</b>   |
| <b>TABLE DES MATIÈRES</b>                                  | <b>VII</b> |
| <b>LISTE DES TABLEAUX</b>                                  | <b>X</b>   |
| <b>LISTE DES FIGURES</b>                                   | <b>XI</b>  |
| <b>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS</b>                    | <b>XII</b> |
| <b>REMERCIEMENTS</b>                                       | <b>XV</b>  |
| <b>INTRODUCTION</b>  | <b>18</b>  |
| <b>1.1 INTRODUCTION GÉNÉRALE</b>                           | <b>18</b>  |
| 1.1.1 LE CERVEAU   | 18         |
| 1.1.2 LE NEURONE   | 18         |
| 1.1.3 OBJECTIFS DE LA THÈSE                                | 19         |
| <b>1.2 CONTEXTES BIOLOGIQUES DU TRANSPORT DE L'ARN</b>     | <b>20</b>  |
| 1.2.1 LA NEURITOGÉNÈSE                                     | 20         |
| 1.2.1.1 Cônes de croissance                                | 21         |
| 1.2.1.2 Effet des neurotrophines sur le cône de croissance | 21         |
| 1.2.1.3 Localisation de l'ARNm $\beta$ -actine et ZBP1     | 24         |
| 1.2.1.4 Localisation de l'ARNm $\beta$ -actine et ZBP2     | 26         |
| 1.2.1.5 Granules RNP $\beta$ -actine                       | 27         |
| 1.2.2 LA PLASTICITÉ SYNAPTIQUE                             | 28         |
| 1.2.2.1 La potentialisation à long terme                   | 28         |
| 1.2.2.2 Deux modèles de spécificité synaptique             | 32         |
| <b>1.3 TRANSPORT DE L'ARNM</b>                             | <b>36</b>  |
| 1.3.1 COMPLEXES RNP  | 36         |
| 1.3.2 COMPLEXES RNP DE LA CAMKIIA                          | 37         |
| 1.3.3 CARACTÉRISATION DES GRANULES D'ARN                   | 39         |
| 1.3.4 GRANULES DANS LES NEURONES                           | 41         |
| <b>1.4 STAUFEN</b>   | <b>42</b>  |
| 1.4.1 IDENTIFICATION ET FONCTIONS                          | 42         |
| 1.4.2 STAUFEN CHEZ LES MAMMIFÈRES                          | 43         |
| 1.4.3 CLONAGE ET CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DE STAUFEN1   | 43         |
| 1.4.4 RÔLES POTENTIELS DE STAU1                            | 43         |
| 1.4.4.1 Régulation de la traduction                        | 44         |
| 1.4.4.2 Dégradation d'ARNm spécifiques                     | 49         |
| 1.4.4.3 Transport de l'ARNm                                | 50         |
| 1.4.5 CLONAGE ET CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DE STAU2      | 52         |

|   |    |
|---|----|
| 1.4.6 LA NAVETTE NUCLÉO-CYTOPLASMIQUE DE STAUFEN2 | 52 |
| 1.4.6.1 Import nucléaire                          | 53 |
| 1.4.6.2 Export nucléaire exportine-5 dépendant    | 53 |
| 1.4.6.3 Export CRM1-dépendant                     | 54 |

## **HYPOTHÈSES DE TRAVAIL** **55**

## **RÉSULTATS** **57**

### **CHARACTERIZATION OF A PUTATIVE RNA GRANULE FROM DEVELOPING BRAIN.** **60**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>RESULTS</b>  | <b>69</b> |
| PURIFICATION OF PUTATIVE RNA GRANULES   | 69        |
| TRANSPORTED MRNAS ENRICH IN THE PUTATIVE RNA GRANULE FRACTION                     | 71        |
| FINAL PURIFICATION OF THE PUTATIVE RNA GRANULES                                   | 72        |
| ABUNDANT COMPONENTS OF THE RNA GRANULE  | 72        |
| LOCALIZATION OF PROTEINS TO GRANULES USING IMMUNO-EM                              | 74        |
| PROTEOMICALLY-IDENTIFIED PROTEINS FORM PUNCTA IN DENDRITES OF HIPPOCAMPAL NEURONS | 76        |
| PROTEOMICALLY-IDENTIFIED PROTEINS CO-LOCALIZE IN PUNCTA                           | 77        |
| DEAD-BOX 3 CO-LOCALIZES WITH RNA AND RIBOSOME-CONTAINING STRUCTURES IN PROCESSES  | 77        |
| DEAD BOX 3 PUNCTA MOVE IN DENDRITES BUT ARE NOT AFFECTED BY ACTIVITY              | 79        |
| <b>DISCUSSION</b>   | <b>79</b> |
| PROTEOME OF A PUTATIVE RNA GRANULE FROM DEVELOPING BRAIN                          | 79        |
| MULTIPLE TYPES OF mRNA GRANULES   | 83        |
| <b>CONCLUSION</b>   | <b>85</b> |

### **THE ZINC-FINGER PROTEIN ZFR IS CRITICAL FOR STAUFEN 2 ISOFORM SPECIFIC NUCLEOCYTOPLASMIC SHUTTLING IN NEURONS** **121**

|  |            |
|--|------------|
| <b>RESULTS</b>   | <b>132</b> |
| IDENTIFICATION OF ZFR AS A STAU2-BINDING PROTEIN                             | 132        |
| ZFR CO-LOCALIZES WITH CYTOPLASMIC STAU2 GRANULES                             | 133        |
| ZFR AND STAU2 SEDIMENT WITH DENSE PARTICLES/ORGANELLES                       | 134        |
| ZFR CO-FRACTIONATES WITH STAU2 ISOFORMS                                      | 134        |
| ZFR CO-IMMUNOPURIFIES WITH STAU2-CONTAINING RNP                              | 135        |
| ZFR DOES NOT ASSOCIATE WITH STAU1  | 136        |
| ZFR IS REQUIRED FOR STAU2 <sup>62</sup> NUCLEAR EXPORT                       | 136        |
| <b>DISCUSSION</b>  | <b>139</b> |
| ZFR IS AN RNA/DNA-BINDING PROTEIN  | 140        |
| ZFR IS ASSOCIATED WITH STAU2-CONTAINING RNPs                                 | 141        |
| ZFR IS ESSENTIAL FOR THE NUCLEO-CYTOPLASMIC SHUTTLING OF STAU2 <sup>62</sup> | 142        |

## **DISCUSSION** **166**

|  |            |
|--|------------|
| <b>4.1. PURIFICATION DE GRANULES D'ARN EMBRYONNAIRES</b> | <b>166</b> |
|--|------------|

|   |                   |
|---|-------------------|
| <b>4.2. AUTHENTICITÉ DE LA PRÉPARATION ANALYSÉE</b>                                       | <b>167</b>        |
| <b>4.3. IDENTIFICATION DE PLUSIEURS TYPE DE GRANULES</b>                                  | <b>169</b>        |
| 4.3.1 GRANULES DDX3-YFP ET L'ACTIVITÉ SYNAPTIQUE  | 169               |
| 4.3.1.1 Identification des ARN associés par DDX3  | 173               |
| 4.3.2 GRANULES CGI-99   | 174               |
| 4.3.3 GRANULES STAU2  | 176               |
| 4.3.3.1 Rôle de Stau2 <sup>62</sup> vs Stau2 <sup>59</sup>                                | 177               |
| <b>4.4. TRANSPORT D'ARN DENDRITIQUE ET GRANULES D'ARN</b>                                 | <b>179</b>        |
| <b>4.5. CONCLUSIONS GÉNÉRALES</b>   | <b>181</b>        |
| <br>  |                   |
| <b><u>ANNEXE</u></b>  | <b><u>183</u></b> |
| <br>  |                   |
| <b>5.1 EFFET D'UNE SUREXPRESSON DE CGI99 SUR LES GRANULES DENDRITIQUES DE DDX3</b>        | <b>183</b>        |
| <b>5.2 CO-LOCALISATION DE DDX3 AVEC DES COMPOSANTES RIBOSOMIQUES EN FONCTION DU TEMPS</b> | <b>186</b>        |
| <b>5.3 CARACTÉRISATION DE PARTENAIRES PROTÉIQUES DE STAU2</b>                             | <b>189</b>        |
| 5.3.1 ATPASE S4   | 189               |
| 5.3.2 DSCR1/CALCIPRESSINE   | 190               |
| <br>  |                   |
| <b><u>SOURCES DOCUMENTAIRES</u></b>   | <b><u>195</u></b> |

**LISTE DES TABLEAUX**

---

|  |            |
|--|------------|
| <b>TABLEAU I : PROTÉINES IDENTIFIÉES DANS LES COMPLEXES LIÉS PAR KIF5 .....</b>                    | <b>41</b>  |
| <b>TABLEAU II : PROTÉINES ASSOCIÉES AVEC STAU1<sup>55</sup> .....</b>                              | <b>47</b>  |
| <b>TABLEAU III : CO-LOCALISATION DE COMPOSANTES DE GRANULES D'ARN AVEC DDX3 ET<br/>CGI99. ....</b> | <b>188</b> |
| <b>TABLEAU IV : LISTE DES PARTENAIRES POTENTIELS DE STAU2. ....</b>                                | <b>193</b> |

**LISTE DES FIGURES**

---

|  |            |
|--|------------|
| <b>FIGURE 1. CÔNE DE CROISSANCE</b>  | <b>23</b>  |
| <b>FIGURE 2. LOCALISATION DE ZBP1 ET DE L'ARNM DE B-ACTINE</b>                                       | <b>25</b>  |
| <b>FIGURE 3. L'HIPPOCAMPE CHEZ LE RAT</b>  | <b>30</b>  |
| <b>FIGURE 4. RÉPONSE FACILITÉE D'UN NEURONE POST-SYNAPTIQUE (VOIE DE SCHAFER)</b>                    | <b>31</b>  |
| <b>FIGURE 5. LTP DANS LA VOIE DE SCHAFER ET LA RÉGION CA1 DE L'HIPPOCAMPE</b>                        | <b>33</b>  |
| <b>FIGURE 6. ÉVIDENCES D'UNE INTERACTION ENTRE RAC1/CDC42 ET STAU1</b>                               | <b>48</b>  |
| <b>FIGURE 7 LES GRANULES CFP-CGI99 NE CONTIENNENT PAS DE RIBOSOMES NI D'ARNM</b>                     | <b>184</b> |
| <b>FIGURE 8 LA SUR-EXPRESSION DE XFP-CGI99 DIMINUE LA QUANTITÉ DE GRANULES<br/>DENDRITIQUES DDX3</b> | <b>185</b> |
| <b>FIGURE 9. CO-LOCALISATION DE DDX3 AVEC P0 EN FONCTION DU TEMPS</b>                                | <b>187</b> |
| <b>FIGURE 10. CARACTÉRISATION DES SERA ANTI-DSCR1</b>  | <b>194</b> |

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

---

ADN : acide désoxynucléique

ADNc : acide désoxynucléique complémentaire

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARNdb : ARN bicaténaire

ARNt : ARN de transfert

miARN : micro ARN

shARN : *short hairpin* ARN

siARN : *small interfering* ARN

CaM : calmoduline

CaMKII : protéine kinase II dépendante du  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmoduline

CFP : protéine fluorescente cyan

CN : calcineurine/PP2B

dsRBD : motif de liaison à l'ARNdb

EF1 $\alpha$  : facteur d'élongation 1 $\alpha$

GFP : protéine fluorescente verte

HA : hémagglutinine

kDa : kiloDalton

NES : signal d'export nucléaire

NLS : signal de localisation nucléaire

Stau1 : Staufen 1, mammifère

Stau2 : Staufen 2, mammifère

RNP : ribonucléoprotéi(ne/que)

RE : réticulum endoplasmique

RNAi : interférence par l'ARN

UTR : région non traduite

YFP : protéine fluorescente jaune

*Au nom de Malik, Stéphanie*

*Et de tous les miens.*



## REMERCIEMENTS

---

*La route se poursuit sans fin  
Descendant de la porte où elle commença  
Maintenant, loin en avant, la route s'étire  
Et je la dois suivre, si je le puis.  
La parcourant d'un pied avide,  
Jusqu'à ce qu'elle rejoigne quelque voie plus grande  
Où se joignent maints chemins et maintes courses.  
Et vers quel lieu, alors? Je ne saurais le dire.*

J.R.R. Tolkien - " Le Seigneur des Anneaux "

Je remercie mes parents, ma famille, ma femme et mon enfant car sans leur Encadrement, Encouragements, Amour, Présence je ne serais qui je suis et n'aurais jamais eu l'occasion de compléter les travaux, surmonté les obstacles et enduré le stress vécus durant les cinq ans que durèrent mes études doctorales. Sans eux je ne pourrais entreprendre cette nouvelle étape de mon aventure post-doctorale.

*L'astronome peut vous parler de sa compréhension de  
l'espace, mais il ne peut pas vous la donner.*

K. Gibran – " Le prophète. "

Mon directeur de recherche Luc DesGroseillers, excellent mentor durant mes études, a su me transmettre son enthousiasme et son éternelle confiance de pouvoir

arriver à percer les mystères de la science, malgré les obstacles et échéances incontournables de la vie d'un scientifique. Pour cela je le remercie de son appui et de sa confiance. Je ne peux dénombrer toutes les fois que je suis rentré dans son bureau la mine basse et en suis ressortis motivé par un résultat expérimental difficile à comprendre, mais dont les conséquences étaient susceptibles de révéler un aspect excitant de notre hypothèse de travail.

Je remercie le groupe IRSC du Centre de Recherche en Neurosciences, pour leur expertise en électrophysiologie et en imagerie microscopique. Grâce à ce groupe j'ai pu connaître et collaborer avec des gens experts en leur domaine.

*Votre ami, c'est la réponse à vos besoins*

K. Gibran – " Le prophète. "

Je remercie spécialement les membres du laboratoire du Dr DesGroseillers de m'avoir fourni quelques ml de solutions ici et là, d'avoir partagé des cafés avec moi, de m'avoir fourni l'occasion d'observer la formation de plus d'un couple (puisses-t-ils durer jusqu'à la nuit des temps et être fertiles comme le Nil) et surtout, d'avoir supporté mon caractère assez spécial. L'atmosphère de travail qui y existe est exceptionnelle et fournit l'encadrement nécessaire pour l'épanouissement scientifique.

*Les dunes changent sous l'action du vent,*

*Mais le désert reste le même*

Proverbe arabe

La vieille garde : Demian l'autre moitié de Dupont et Dupont, puissions-nous poursuivre la conquête du monde ensemble. Luc Louis-de-furax'o'matic-nouveau-senior-blasé puisses-tu te souvenir de moi lorsque tu décrocheras ton Nobel.

*Ce qui se fait de grand, se fait dans le silence*

E. Gustaf Geijer

Laurent gougnole-importé, finalement avoir refusé les dîners stratégiques chez moi était peut-être la meilleure stratégie, puisses-tu engendrer une descendance nombreuse et un peu moins râleuse! Avec un peu de travail, tu l'auras ton accent québécois! Karine, fourmis acharnée, tente de ne pas fossiliser sur ta *bench*, prend un peu de soleil afin de toujours bien porter cette blouse chinoise qui te sied à merveille. Marjolaine, ma *part-time* favorite tu le seras toujours, je n'oublierai jamais ce *viet* que je te dois, c'est en quelque sorte un prétexte pour se revoir! Samuel, ton acharnement silencieux aura valu la résurrection de mon projet de maîtrise, je t'en suis reconnaissant du fond du cœur.

*Qui s'assied au fond d'un puit pour contempler le ciel,*

*le trouvera petit*

Han Yu

Linda *your presence has enlightened my days by numerous laughs and great conversations... keep the good work going!* Enfin les autres que je n'ai pas eu l'occasion de bien connaître, bonne chance et que la science vous sourit pour les années à venir!



---

## INTRODUCTION

---

### 1.1 Introduction générale

#### *1.1.1 Le cerveau*

Il nous différencie des autres espèces animales, il nous permet de créer de la musique, de l'art et de la littérature, d'imaginer ce qui n'existe pas encore. Sa complexité est fascinante, notre compréhension de son fonctionnement reste modeste. La neuroscience se propose de décoder un des mystères du cerveau : comment plusieurs milliards de cellules se forment et se développent, puis s'organisent en formant des réseaux fonctionnels? Comment les souvenirs s'impriment-ils dans le cerveau ? Quelle est la nature physique des traces mnésiques et quels sont les mécanismes qui président à leur construction, leur stockage et leur rappel. Comment, en sommes, apprenons-nous et nous souvenons-nous?

#### *1.1.2 Le neurone*

Historiquement, le neurone est la cellule la plus étudiée et à laquelle on a associé l'activité électrique à la base de la transmission d'information entre organes et cellules.

Chez les mammifères, cette cellule est composée d'un corps cellulaire, d'un axone et de dendrites. L'axone peut s'arboriser et ses différentes branches former des synapses. Les dendrites sont généralement le site où les axones forment des synapses. Lorsque l'influx nerveux qui se propage le long de la membrane de l'axone atteint une synapse, il cause la relâche pré-synaptique de neurotransmetteurs qui sont reconnus et liés par des récepteurs post-synaptiques qui initient alors une cascade d'événements post-synaptiques. La plasticité synaptique permet l'établissement d'un processus par lequel l'efficacité de la transmission d'une information entre deux neurones connectés par une synapse est modulée en fonction de l'activité passée des neurones. Les changements de l'efficacité de la transmission synaptique permettent de modifier de manière rapide et durable le transfert de l'information nerveuse entre les neurones et de stocker ainsi un message pertinent.

Ce phénomène de plasticité synaptique représente pour la communauté neuroscientifique un modèle cellulaire de la mémoire et de l'apprentissage.

### *1.1.3 Objectifs de la thèse*

Cette thèse s'inscrit dans la poursuite de la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents aux phénomènes de plasticité synaptique et de développement neuronal. Nous avons privilégié une approche génétique, biochimique et protéomique afin d'identifier des composants protéiques importantes pour la ségrégation d'ARNm dans le cerveau. Ce processus implique un transport actif de molécules d'ARNm sous la forme de complexes ribonucléoprotéiques (RNP) et permet la répartition fonctionnelle de l'information génétique.

Cette thèse propose deux sujets de recherche. Le premier est la purification de granules RNP de cerveau en développement et l'identification des constituants protéiques de ces granules par une approche en protéomique. Le deuxième est l'identification de partenaires protéiques de Staufen2, une protéine qui fait partie de complexes RNP dans le cerveau de mammifères. Ces deux sujets s'inscrivent dans un courant de recherche qui consiste en l'identification et la caractérisation des constituants protéiques des granules d'ARN. Ces recherches sont primordiales afin de mieux comprendre la régulation et la fonction des complexes RNP dans le développement et la plasticité synaptique.

Dans cette introduction, nous survolerons deux phénomènes qui dépendent du processus de transport de l'ARNm soit la neuritogenèse et la plasticité synaptique, nous expliquerons le modèle du transport de l'ARN sous la forme de granules d'ARN et enfin nous reverrons les notions connues chez les mammifères à propos de la protéine Staufen et de sa présence dans des granules d'ARN.

## **1.2 Contextes biologiques du transport de l'ARN**

### *1.2.1 La neuritogenèse*

Lors du développement d'un neurone, ses neurites doivent se spécialiser soit en dendrite soit en axone. Cette spécialisation exige une répartition asymétrique de récepteurs membranaires, cytosquelette, vésicules de sécrétion, ARNm, constituants de la traduction protéique, etc.

Par exemple, la localisation des ARNm *tau* (Litman et al., 1993) et *tropomyosine-5* (Hannan et al., 1995) dans l'axone naissant corrèle avec l'enrichissement et la fonction

des protéines respectives lors du développement et la croissance de l'axone. La localisation de l'ARNm  *$\beta$ -actine* dans les cônes de croissance des neurites naissants est essentielle pour leur migration et l'établissement de synapses avec d'autres neurones (Bassell et al., 1998).

#### 1.2.1.1 Cônes de croissance

Les neurites en développement se terminent par un cône de croissance qui projette de minces extensions (filopode) reliées entre elles par des membranes aux allures de voiles (lamellipode) (Figure 1). Ces structures dynamiques varient en grosseur et en nombre de filopodes émergents, ces derniers varient également en longueur, dépendamment de l'état de croissance de la neurite (Mason and Wang, 1997). La formation de lamellipodes et de filopodes ainsi que leurs mouvements dépendent, entre autre, de la polymérisation et de l'organisation du réseau d'actine (Gallo and Letourneau, 2004). En effet, les lamellipodes étant constitués de réseaux de filaments d'actine et les filopodes de paquets de filaments parallèles d'actine, la teneur en actine du réseau détermine leurs caractéristiques. Les cônes de croissance permettent aux neurites de répondre aux indications moléculaires (i.e. neurotrophines) du micro-environnement et de se diriger vers leur destination.

#### 1.2.1.2 Effet des neurotrophines sur le cône de croissance

La famille des neurotrophines est constituée de molécules telles que : NGF (*nerve growth factor*), BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), NT3, NT4 et NT6. Ces protéines lient les récepteurs à haute affinité tyrosine kinase TrkA, TrkB et TrkC ainsi que le récepteur à basse affinité p75NTR, retrouvés à la surface des neurones et

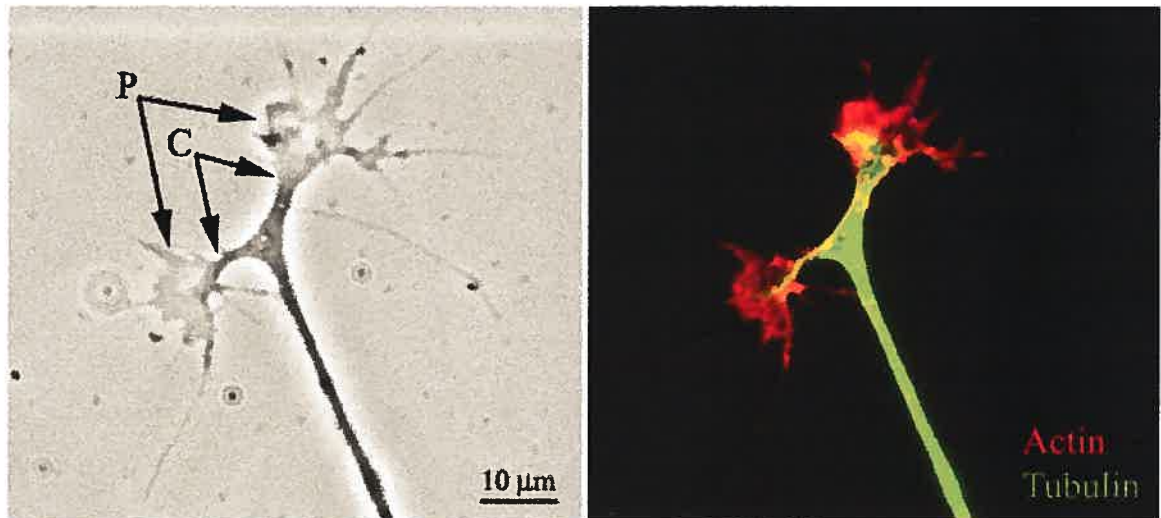
---

induisent des cascades intracellulaires responsables de la survie et de la croissance des neurites (Kaplan and Miller, 1997).

Dans des neurones de cortex de poulet, en absence de co-culture avec des astrocytes, source de neurotrophines, la privation en sérum (milieu N2, Invitrogen) diminue la localisation de l'ARNm  *$\beta$ -actine* aux cônes de croissance. L'application subséquente de la neurotrophine NT-3 au milieu de culture permet la localisation rapide (10 min post-application) d'ARNm  *$\beta$ -actine* aux cônes de croissance (Zhang et al., 1999). Ce transport de l'ARNm  *$\beta$ -actine* induit par NT-3 dépend de l'activation de la PKA, d'une accumulation en cAMP ainsi que d'un cytosquelette intact (Zhang et al., 1999).

L'effet des neurotrophines sur la morphologie des cônes de croissance et de l'axone est rapide : 1h après le début du traitement, des filopodes émergent des extrémités des cônes de croissance et le long des axones. De plus les cônes de croissance se déplacent et migrent de façon antérograde (Zhang et al., 2001). La localisation d'ARNm  *$\beta$ -actine* au cône de croissance permet ainsi de rapidement synthétiser de l'actine et de réorganiser localement le réseau d'actine, événements critiques pour l'émergence de filopodes (Bassell et al., 1998; Crino and Eberwine, 1996; Deitch and Banker, 1993).





### Figure 1: Cône de croissance

Le panneau de gauche permet d'observer en contraste de phase l'image de l'extrémité d'un neurite en croissance d'un neurone de poulet du système nerveux central en culture. Le cône de croissance original s'est dédoublé et a donné naissance à deux embranchements qui se terminent chacun par un cône de croissance avec leurs domaines central (C) et périphérique (P) respectifs. Le panneau de droite montre les filaments d'actine (rhodamine-phalloïdine, rouge) et les microtubules (anti-tubuline, vert).

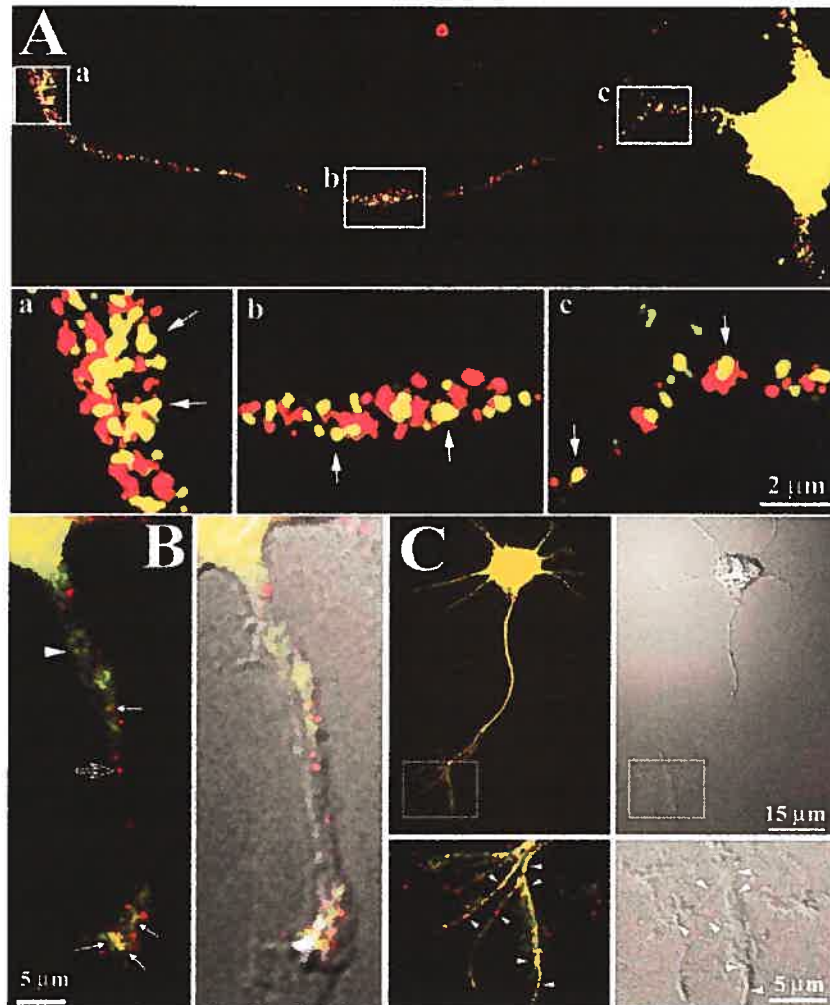
Tiré de (Gallo and Letourneau, 2004)

### 1.2.1.3 Localisation de l'ARNm $\beta$ -actine et ZBP1

Dans les fibroblastes, une séquence de 54 nucléotides, nommée « code postal » (*zipcode*), retrouvée dans le 3' UTR du transcrit de la  $\beta$ -actine permet de recruter la protéine ZBP1 (*zipcode binding protein*) (Ross et al., 1997) et de localiser le complexe RNP  $\beta$ -actine à la face émergente des lamellipodes (Kislauskis et al., 1994; Kislauskis et al., 1997). L'association ZBP1/ARNm  $\beta$ -actine est visible au site de transcription du transcrit; ZBP1 est une protéine qui fait la navette entre le cytoplasme et le noyau (Oleynikov and Singer, 2003).

La localisation de l'ARNm  $\beta$ -actine dans les neurites de neurones en développement, dépend également de la séquence du « code postal » (*zipcode*). En effet, l'injection d'oligonucléotides antisens complémentaires à la séquence du code postal, inhibe la localisation de l'ARNm  $\beta$ -actine même en présence de neurotrophine NT-3 (Zhang et al., 2001). Cette séquence permet de recruter des facteurs protéiques qui forment un complexe RNP (Zhang et al., 2001) et qui apparaît en microscopie comme une structure granulaire (Bassell et al., 1998). Ces structures granulaires contiennent également des constituants importants pour la synthèse protéique (Bassell et al., 1998).

Les mouvements de la protéine de fusion ZBP1-eGFP observés dans des neurones vivants suivent trois tendances et ressemblent à ceux observés pour les granules de l'ARNm *CamKII $\alpha$*  (section 1.3.2) : antérograde, rétrograde et oscillatoire (Oleynikov and Singer, 2003; Zhang et al., 2001). Comme cela est observée pour l'ARNm  $\beta$ -actine, la privation en sérum diminue également la quantité en protéine ZBP1 dans les cônes de croissance et l'application subséquente de la neurotrophine NT-3 permet un enrichissement en ZBP1 dans les cônes de croissance (Zhang et al., 2001).



**Figure 2: Localisation de ZBP1 et de l'ARNm de  $\beta$ -actine**

A) ZBP1 (vert) et l'ARNm de l'actine (rouge) sont localisés sous la forme de granules dans des neurites et dans les cônes de croissance (panneau du haut). Les agrandissements des régions indiquées dans (A) montrent une co-localisation entre ZBP1 et l'ARNm de l'actine (flèches). B) Neurone transfecté avec eGFP-ZBP1 (vert) fixé et traité en hybridation in situ pour détecter l'ARNm de l'actine (rouge). La superposition des images montre la co-localisation entre ZBP1 et l'ARNm de l'actine (flèches). La protéine eGFP-ZBP1 est également observée dans des sites sans signal d'ARNm actine détectable (têtes de flèche), de même que des granules d'ARNm  $\beta$ -actine sont dépourvus de protéine eGFP-ZBP1. C) Des granules de ZBP1 (rouge) sont à proximité du réseau de microtubules marqués avec de l'anti-tubuline (vert) au centre du cône de croissance.

Figure tirée de (Zhang et al., 2001)

De plus, la localisation de l'ARNm *β-actine* est perturbée lorsque l'expression de ZBP1 est réprimée par l'emploi d'oligonucléotides antisens (Eom et al., 2003).

L'ensemble de ces résultats montre l'importance de ZBP1 dans le transport et la localisation de l'ARNm *β-actine* aux cônes de croissance de neurites en développement.

#### 1.2.1.4 Localisation de l'ARNm *β-actine* et ZBP2

Une étude d'essais de retard sur gel avec une sonde radioactive contenant les 54 nucléotides du code postal a permis d'identifier, à partir d'homogénats de cerveaux de poulet, cinq protéines liant le code postal (Gu et al., 2002) : ZBP1, ZBP2 (orthologue de la protéine humaine KSRP, impliquée dans l'épissage d'ARNm (Min et al., 1997)), une protéine de 70 kDa (orthologue de la protéine humaine FBP, un facteur de transcription du gène *c-myc* (Duncan et al., 1994)), une protéine de 65 kDa inconnue et la protéine ssDBF (orthologue de la protéine humaine hnRNP A/B impliquée dans l'épissage d'ARNm (Lau et al., 1997)).

Dans des neurones en culture, la protéine ZBP2 est principalement retrouvée dans le noyau, mais est également présente dans les dendrites sous forme de granules qui co-localisent avec l'ARNm de la *β-actine*. L'association cytoplasmique de ZBP2 et de l'ARNm de la *β-actine* est également décelée par immunoprécipitation (Gu et al., 2002).

L'expression d'une forme tronquée de ZBP2, qui ne contient que les domaines KH suffisants pour l'association à l'ARN, démontre un phénotype de dominant négatif. En effet, elle diminue de façon significative (environ de 50%) la présence d'ARNm *β-actine* dans les neurites et les cônes de croissance (Gu et al., 2002). La distribution sub-cellulaire de cette forme tronquée étant restreinte au noyau, les auteurs suggèrent que l'association de cette protéine principalement nucléaire avec le complexe RNP de

l'ARNm *β-actine* peut survenir dans le noyau et être essentielle à son transport et à sa localisation cytoplasmique.

Depuis la publication de cette étude, des évidences montrent que les domaines KH de KSRP (l'orthologue humain de ZBP2) sont essentiels et suffisants pour l'association cytoplasmique avec l'exosome et PARN (polyA ribonucléase) et avec l'élément ARE (*AU rich element*) de certains ARNm (Gherzi et al., 2004). Or, l'exosome est également présent dans le noyau (Allmang et al., 1999a; Allmang et al., 2000; Gherzi et al., 2004) où il participe à la maturation et à la dégradation de snRNA (*small nuclear RNA*), de snoRNA (*small nucleolar RNA*), d'ARNr (ARN ribosomal) et fragments de séquences d'espacement de pré-ARNr (Allmang et al., 1999a; Allmang et al., 1999b; Allmang et al., 2000) et au contrôle de qualité des pré-ARNm (Bousquet-Antonelli et al., 2000). Ainsi, les domaines KH de la protéine tronquée ZBP2, suffisant pour l'association avec l'ARNm *β-actine*, pourrait recruter l'exosome sur l'ARNm *β-actine*, entraînant sa dégradation ce qui expliquerait la diminution de 50% observée par Gu et collaborateurs et infirmerait leur modèle (Gu et al., 2002).

#### 1.2.1.5 Granules RNP *β-actine*

Ces études dévoilent que le transport d'ARNm *β-actine* dans les neurones en développement se fait par le recrutement, via des signaux contenus sur l'ARNm, de protéines qui forment ainsi des complexes RNP. La régulation du processus de formation des complexes pourrait se faire dès le noyau et impliquer des protéines importantes pour des processus tels que l'épissage d'ARNm ou la transcription. Des signaux externes comme ceux fournis par les neurotrophines peuvent moduler la formation ou la mobilité de ces RNP. Cependant la (les) voie(s) exacte(s) de

signalisation ainsi que leur(s) cible(s) dans le complexe RNP  $\beta$ -actine est (sont) encore inconnue(s).

### 1.2.2 La plasticité synaptique

#### 1.2.2.1 La potentialisation à long terme

Chez les mammifères, la mémoire dépend surtout de l'hippocampe et des structures du système limbique (Eichenbaum, 2000; Milner et al., 1998). La mémoire dépendante de l'hippocampe peut être classée sous deux formes qui sont distinctes au niveau temporel et mécanistique : une forme de courte durée (de quelques secondes à quelques minutes) et une de longue durée (de quelques heures à quelques jours ou semaines).

Des études au niveau cellulaire et comportemental suggèrent que l'apprentissage et la mémoire peuvent répondre au modèle de plasticité synaptique. Deux grandes formes de plasticité synaptique ont été découvertes dans diverses structures cérébrales de la mémoire : la LTP (potentialisation à long terme) et la LTD (dépression à long terme). La LTP est une mesure électrophysiologique de l'efficacité synaptique soutenue qui existe entre deux synapses (Bliss and Collingridge, 1993).

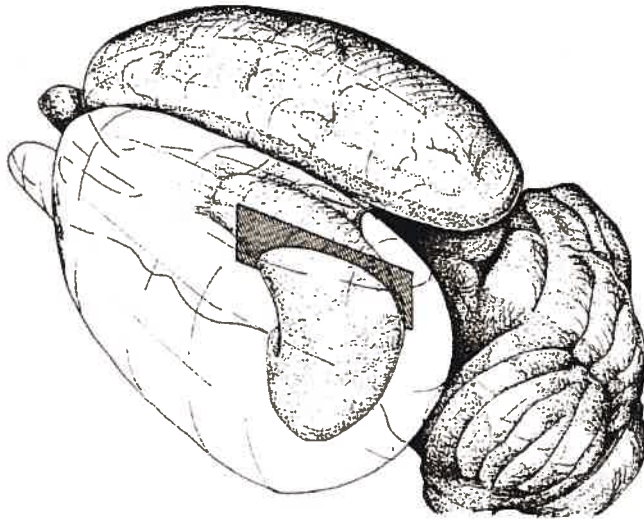
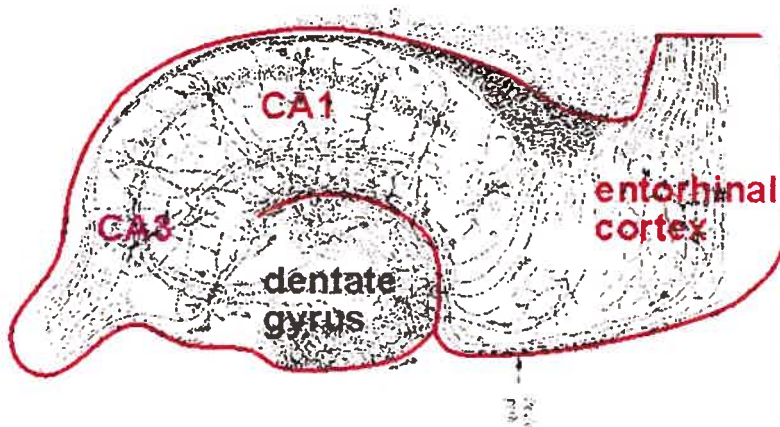
Dans l'hippocampe (Figure 3) il existe trois voies de communication majeures : la voie de la fibre perforante (*perforant fiber*), la voie de la fibre moussue (*mossy fiber*) et la voie collatérale de Schaffer (*Schaffer collateral*). À la suite d'une stimulation brève, mais répétée de haute fréquence (tétanisation) sur une des trois voies susmentionnées, on peut mesurer une augmentation de l'amplitude de l'EPSP (*excitatory post synaptic potential*) des neurones post-synaptiques cibles (Figure 4). Les changements de l'efficacité de la transmission synaptique permettent ainsi de modifier de manière rapide

et durable le transfert de l'information nerveuse entre les neurones et de stocker ainsi un message pertinent.

La LTP peut être étudiée dans l'animal intact, dans des cultures organotypiques d'hippocampes et dans des cultures de neurones dissociés. Les mécanismes moléculaires responsables de la LTP ne sont pas les mêmes dans les trois voies.

La voie de la fibre moussue est constituée des axones des cellules granulaires du gyrus dentelé (*dentate gyrus*) formant synapse avec les neurones de la région CA3. Les terminaux axonaux de la fibre moussue relâchent le neurotransmetteur glutamate qui lie les récepteurs glutaminergiques (NMDA, AMPA, kainate et mGluR) sur les cellules pyramidales cibles du CA3 (Bortolotto et al., 2003; Kullmann et al., 2000). Cependant, dans cette voie, les récepteurs post-synaptiques glutaminergiques ne jouent qu'un rôle mineur dans l'établissement de la LTP, puisque l'application d'inhibiteurs spécifiques à chaque type de récepteur avant la tétanisation ne peut pas bloquer la LTP (Nicoll and Malenka, 1995).

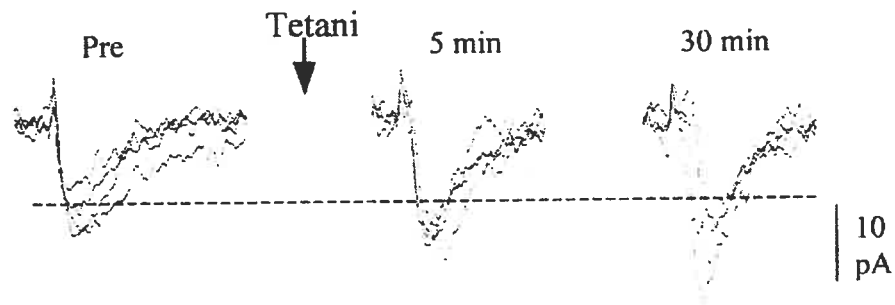
La voie collatérale de Schaffer relie les cellules pyramidales des régions du CA3 et du CA1. Les terminaux axonaux des neurones du CA3 relâchent le neurotransmetteur glutamate. La LTP de la voie de Schaffer est dite associative en ce sens qu'elle requiert une activité synaptique dans les deux neurones (i.e. pré- et post-synaptique), mais elle peut également être sollicitée par la stimulation d'un nombre critique de fibres afférentes (Gustafsson et al., 1987). La LTP dans la région CA1 de l'hippocampe requiert les quatre événements post-synaptiques suivants : dépolarisation du neurone post-synaptique, activation voltage-dépendante des récepteurs NMDA, influx de  $\text{Ca}^{2+}$  via les récepteurs NMDA et activation de plusieurs seconds messagers par le  $\text{Ca}^{2+}$  (Lisman, 1994; Malinow et al., 1994; Muller and Lynch, 1988).

**A****B**

**Figure 3: L'hippocampe chez le rat**

A) Chez le rat, l'hippocampe en forme de lettre « C » est retrouvé sous le cortex, rendu transparent dans la figure. B) Section transverse de l'hippocampe coupé selon l'axe montré en (A) dévoile une structure stéréotypée. Les régions CA1 et CA3 contiennent des neurones pyramidaux comme type de neurones principaux. Le gyrus dentelé (*dentate gyrus*) possède des cellules granulaires (*granule cells*) comme type principal de neurones.





**Figure 4: Réponse facilitée d'un neurone post-synaptique (voie de Schaffer)**

Exemples d'EPSC (*excitatory post synaptic current*) produit par un neurone post-synaptique avant (pre) et 5 puis 30 min après une stimulation téτανique (2 stimulations de 20 Hz pendant 5 sec séparé par des pauses de 20s) du neurone pré-synaptique associée avec une dépolarisation du neurone post-synaptique à 0 mV et 2min de perfusion dans un tampon salin avec 0  $Mg^{2+}$ . La ligne pointillé indique la moyenne des EPSC en situation contrôle (pre).

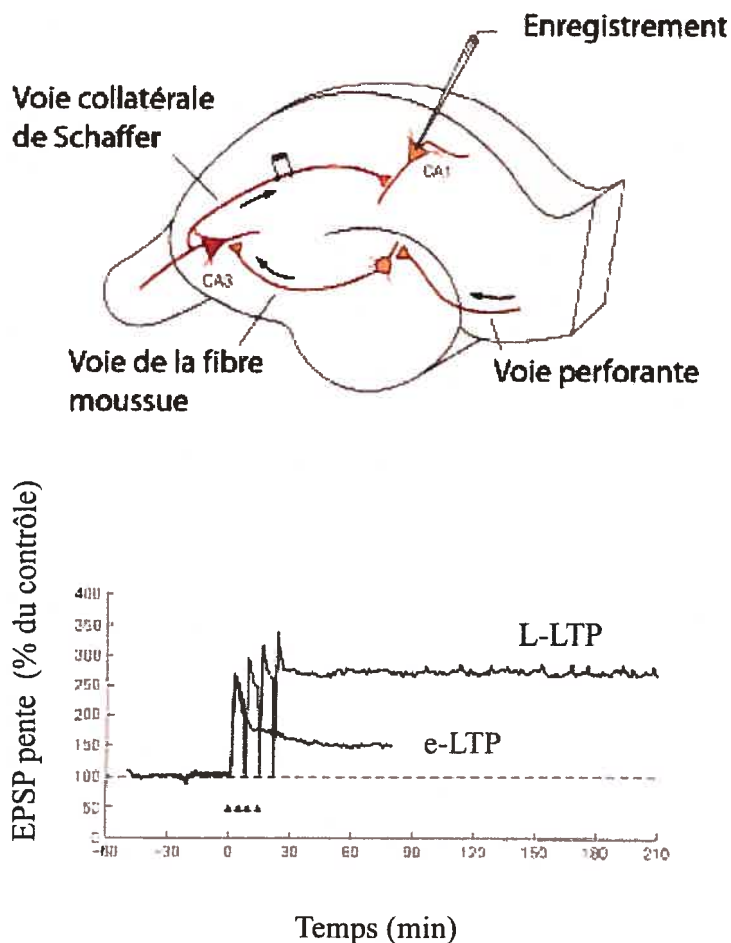
La LTP de la voie perforante dépend de mécanismes similaires à ceux retrouvés dans la voie collatérale de Schaffer (McNaughton, 2003).

La LTP possède au moins deux phases : une seule stimulation produit une LTP de courte durée (1-3 heures) ou E-LTP (*early LTP*) alors qu'une stimulation répétée produit une LTP de longue durée (24 heures) ou L-LTP (*late LTP*) (Figure 5). La L-LTP de longue durée nécessite une synthèse d'ARNm, de protéines et recrute la voie de signalisation des cAMP-PKA-MAPK-CREB (Abel et al., 1997; Bourtchuladze et al., 1994; Huang and Kandel, 1994; Martin et al., 1997).

#### 1.2.2.2 Deux modèles de spécificité synaptique

Le maintien de la L-LTP exige la transcription d'ARNm au niveau du noyau du neurone et leur traduction. L'application concomitante d'inhibiteurs de la transcription et de la synthèse protéique abolit l'effet de la téτανisation et empêche l'établissement d'une L-LTP (Krug et al., 1984; Otani and Abraham, 1989). La dépendance de la L-LTP pour une synthèse protéique post-stimulation est documentée dans des cerveaux intacts (Fazeli et al., 1993), des synaptoneurosomes (Rao and Steward, 1991; Weiler and Greenough, 1993), des cultures organotypiques d'hippocampe (Feig and Lipton, 1993) ainsi que dans des cultures de cellules dissociées (Crino and Eberwine, 1996). Les modifications synaptiques qui accompagnent la L-LTP sont restreintes au niveau des synapses téτανisées et représente un aspect fondamental de ce phénomène. Comment la synthèse de nouvelles protéines peut-elle être spécifiquement ciblée ou capturée par les synapses activées? Les protéines sont-elles synthétisées dans le corps cellulaire puis capturées par les synapses activées ou bien sont-elles localement synthétisées?

## Configuration de l'expérience

**Figure 5 LTP dans la voie de Schaffer et la région CA1 de l'hippocampe**

**En haut.** Configuration de l'expérience. La voie collatérale de Schaffer est stimulée électriquement et la réponse est enregistrée au niveau de la population de neurones pyramidaux de la région CA1. **En bas.** Comparaison des e-LTP et L-LTP dans une cellule de la région CA1 de l'hippocampe. Le graphique est une représentation de la pente du potentiel d'excitation post-synaptique (EPSP) dans la cellule en fonction du temps. Le potentiel d'excitation est mesuré à l'extérieur de la cellule. La e-LTP est stimulée avec une stimulation de 1s à 100 MHz, alors que la L-LTP est stimulée par quatre stimulations séparées par des pauses de 10min. La e-LTP dure 2-3 heures alors que la L-LTP dure au moins 24h.

Adapté de Kandel et al., Principles of Neuroscience, 4th Ed., p.1259.

Deux modèles proposés qui ne sont pas mutuellement exclusifs, pourraient expliquer ce phénomène de spécificité synaptique.

#### *1.2.2.2.a L'étiquette synaptique*

La mise en place d'une étiquette synaptique (*synaptic tagging*) permettrait d'identifier la synapse activée et recruterait les protéines nouvellement synthétisées dans la dendrite (Frey and Morris, 1997). Selon ce modèle, la synthèse de facteurs critiques pour la plasticité synaptique provoquée par un tétanus est suivie par le transport de ces facteurs dans les dendrites. Ces facteurs sont ensuite capturés et/ou stabilisés dans les dendrites préalablement tétanisées. La nature de cette étiquette est, à ce jour, incertaine. Cependant les évidences expérimentales suggèrent qu'elle est transitoire, ne durant que 2-3 heures, et que son établissement est indépendant d'une synthèse locale de protéines (Frey and Morris, 1997).

Des évidences récentes suggèrent un rôle pour la kinase PKA dans l'établissement de cette étiquette synaptique (Barco et al., 2002). En effet, la surexpression de CREB constitutivement active dans des souris transgéniques permet l'établissement de la L-LTP avec un stimulus court qui normalement induit une E-LTP. L'inhibition de la PKA à l'aide d'inhibiteurs spécifiques avant et pendant la tétanisation est suffisante pour inhiber la L-LTP dans ces souris transgéniques. Cette étude supporte deux modèles. Premièrement, la voie activée par la PKA est essentielle dans l'établissement de l'étiquette synaptique. Deuxièmement l'expression induite par CREB produit des facteurs de plasticité synaptique qui peuvent être capturés par l'étiquette synaptique.

#### *1.2.2.2.b Traduction locale*

Une stratégie alternative permettant d'établir la spécificité synaptique serait la traduction locale au niveau des synapses activées. Les évidences expérimentales suivantes soutiennent ce modèle : présence d'ARNm spécifiques dans les épines dendritiques de neurones d'hippocampe (Steward, 1995), de facteurs de la synthèse protéique, d'ARNt (Tiedge and Brosius, 1996) et de polyribosomes (Steward et al., 1996). De plus, la quantité de polyribosomes post-synaptiques augmente après la synaptogenèse (Steward and Levy, 1982) et après exposition de l'animal intact à un environnement complexe (Greenough et al., 1985).

Avec des préparations de synaptoneurosome, l'équipe de recherche du Dr Greenough a montré que l'activité synaptique, simulée par une haute concentration en KCl ou l'application de glutamate, permet le recrutement et la traduction d'ARNm spécifiques (Weiler et al., 1997; Weiler and Greenough, 1993). De plus, la séparation physique des dendrites du corps cellulaire de neurones d'hippocampe en culture a permis de montrer une synthèse protéique dendritique indépendante du corps cellulaire (Torre and Steward, 1992). Cette synthèse est également augmentée par le traitement avec du BDNF (Aakalu et al., 2001), une neurotrophine qui peut solliciter la L-LTP (Lu, 2003).

Un exemple concret de l'importance de la synthèse locale est montré par une étude de Miller et collaborateurs (Miller et al., 2002). L'expression dans une souris transgénique d'un transcrite de la CaMKII $\alpha$  dont le 3'UTR est absent empêche sa localisation dans les dendrites et prévient la traduction locale. Or, ces souris transgéniques présentent des défauts de L-LTP ainsi que de consolidation de la mémoire

démontrant l'importance de la traduction locale de ce transcrit dans ces processus (Miller et al., 2002).

L'inhibition d'une synthèse locale par l'ajout d'émétine, un inhibiteur de la traduction, empêche la L-LTP au niveau des dendrites traitées (Bradshaw et al., 2003). En effet, l'ajout d'émétine au niveau des dendrites apicales des neurones de la région CA1 empêche la L-LTP à ces dendrites, mais n'affecte pas la L-LTP au niveau des dendrites basales. Réciproquement, l'ajout d'émétine au niveau des dendrites basales empêche la L-LTP au niveau de ces dendrites, mais n'affecte pas la L-LTP au niveau des dendrites apicales.

Enfin, dans la région CA1 de l'hippocampe, la téτανisation à haute fréquence ou l'utilisation d'agonistes des récepteurs NMDA induit le transport et l'accumulation de l'ARNm Arc (*Activity-regulated, cytoskeletal-associated protein*) au niveau des dendrites stimulées (Link et al., 1995; Lyford et al., 1995). Cette accumulation d'ARNm Arc est également observée dans des préparations de synaptoneurosomes (Yin et al., 2002). De plus, suite à une stimulation électrique, la protéine Arc résultante de la localisation de l'ARNm est détectée, à l'aide de la microscopie électronique, au niveau des épines dendritiques des synapses stimulées, mais pas dans les synapses des couches environnantes (Moga et al., 2004).

### 1.3 Transport de l'ARNm

#### 1.3.1 Complexes RNP

Les ARNm sont synthétisés dans le noyau, puis en sont exportés par un processus qui est modulé par des protéines qui lient l'ARN (Cullen, 2003; Jensen et al., 2003). Par

la suite, la majorité de ces ARNm sont ciblés vers les ribosomes par la liaison de facteurs protéiques à la coiffe 5-méthyl guanosine et/ou à la queue de poly-adénosine (Gingras et al., 1999). La traduction non localisée de ces ARNm permet la production de protéines cytoplasmiques. Les protéines membranaires et/ou faisant partie de la voie de sécrétion ont leur traduction arrêtée lors de l'apparition du signal peptidique. Le complexe RNP de traduction, dorénavant silencieux, est transporté vers le réticulum endoplasmique (RE) puis la traduction reprend en concert avec l'import dans le RE de la protéine nouvellement synthétisée (Walter and Johnson, 1994).

Contrairement à ces deux mécanismes de synthèse protéique, certains ARNm sont transportés et localisés en des endroits spécifiques de la cellule où par la suite, ils y sont traduits (Bassell et al., 1999; Jansen, 2001; Kiebler and DesGroseillers, 2000; Tiedge et al., 1999). Ces ARNm contiennent des éléments qui sont généralement situés dans leur 3'UTR (3'-*untranslated region*) et qui permettent de recruter des facteurs protéiques qui lient directement l'ARNm formant ainsi des complexes RNP. Semblable au processus de localisation des transcrits des protéines vouées à la voie de la sécrétion, la traduction de ces ARNm est réprimée durant le transport et cette répression est modulée par des indicateurs spatio-temporels ou par l'activité synaptique (Bassell et al., 1999; Kiebler and DesGroseillers, 2000; Schuman, 1999; Steward and Schuman, 2001; Steward and Schuman, 2003).

### 1.3.2 Complexes RNP de la *CamKII $\alpha$*

La protéine kinase de type 2 dépendante du calcium et de la calmoduline (*Calcium-calmodulin-dependent protein kinase II*), la CaMKII, est une sérine/thréonine kinase abondante dans le cerveau, impliquée dans la plasticité synaptique et le

comportement (Braun and Schulman, 1995; Lisman et al., 2002). Chez les mammifères, cette holoenzyme est constituée d'au moins vingt sous-unités issues de l'épissage alternatif de quatre gènes différents:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  (Edman and Schulman, 1994). Dans le cerveau, les deux isozymes  $\alpha$  et  $\beta$  sont les formes prédominantes (Miller and Kennedy, 1985). L'intérêt que porte la communauté neuroscientifique pour cette kinase se base sur sa capacité d'agir en tant que commutateur moléculaire via des événements d'autophosphorylation. La liaison de  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmoduline (CaM) au site d'auto-régulation de l'enzyme l'active en induisant la relâche du site catalytique. Le site catalytique ainsi libéré de l'inhibition par des séquences auto-régulatrices, permet à la kinase de s'autophosphoryler et de phosphoryler ses substrats (Griffith et al., 2003).

Des évidences biochimiques suggèrent que l'association de la CaMKII avec une synapse est dynamique et régulée par l'activité de cette dernière. Dans les neurones de rats élevés dans l'obscurité, la queue poly-A des ARNm *CaMKII $\alpha$*  allonge et la synthèse de protéine CaMKII $\alpha$  augmente lorsque les rats sont soumis à la lumière (Wu et al., 1998). Dans ce même sens, Bagni et al montrent à partir d'une préparation de synaptoneurosomes obtenue avec des cerveaux de souris adultes qu'un traitement avec le neurotransmetteur glutamate-glycine ou une haute concentration en KCl induit l'association de l'ARNm *CaMKII $\alpha$*  avec les polysomes (Bagni et al., 2000).

L'activité synaptique induit également la localisation de l'ARNm *CaMKII $\alpha$*  au niveau des dendrites (Thomas et al., 1994) via des éléments retrouvés dans le 3'UTR du transcrit (Mayford et al., 1996). Au moins deux éléments ont été identifiés par des études de cartographie par délétion : un signal proximal de 30nt qui dirige l'ARNm vers les dendrites et un signal distal qui inhibe le transport en absence d'activité neuronale (Mori et al., 2000).



L'utilisation d'un messager chimérique possédant la séquence 3'UTR du transcrite CamKII $\alpha$  et la séquence de liaison à la protéine MS2 a permis de visualiser le transport d'une fusion GFP-MS2 sous la forme de granules dendritiques (Rook et al., 2000). Cette étude révèle que les granules d'ARN dendritiques CamKII $\alpha$  présentent différents types de mouvement : (1) antérograde (vers les dendrites), (2) rétrograde (vers le corps cellulaire) et (3) oscillatoire (Rook et al., 2000). La dépolarisation des neurones induit un changement dans les mouvements des granules en favorisant des mouvements antérogrades.

### *1.3.3 Caractérisation des granules d'ARN*

Les granules de transport d'ARN dendritiques ont fait l'objet de nombreuses études. La molécule SYTO14, fluorescente lorsqu'elle lie des acides nucléiques, a été utilisée afin de mesurer le mouvement de complexes RNP (Ainger et al., 1993) dans les dendrites de neurones vivants (Knowles et al., 1996). Par microscopie électronique, ces granules sont décrits comme étant des structures enrichies en ribosomes (Knowles et al., 1996; Krichevsky and Kosik, 2001).

Certains constituants protéiques des granules d'ARN sont connus. La protéine Staufen1 co-localise avec des granules marqués au SYTO14 et une fusion GFP-Staufen1 forme des granules dendritiques qui se déplacent à des vitesses similaires à celle des granules positifs pour le SYTO14 (Kohrmann et al., 1999). Les protéines ZBP1 et ZBP2 sont transportées dans les neurites et participent à la localisation de l'ARNm de la  $\beta$ -actine dans les cônes de croissance et les dendrites (Bassell et al., 1998; Gu et al., 2002; Tiruchinapalli et al., 2003; Zhang et al., 1999).

Les granules dendritiques seraient des réservoirs d'ARNm non traduits auxquels il

manquerait des facteurs d'initiation de la traduction (Krichevsky and Kosik, 2001). Après stimulation avec une haute concentration en KCl, plusieurs ARNm dendritiques sont libérés de ces granules et incorporés dans des polysomes (Krichevsky and Kosik, 2001).

La structure des granules dendritiques est aujourd'hui mieux connue. En exploitant une approche d'interaction protéine/protéine, des granules d'ARN démontrant une affinité pour la kinésine Kif5 ont été isolés à partir d'extraits cytoplasmiques de cerveaux de souris (Kanai et al., 2004). La caractérisation de ce complexe RNP a permis d'identifier plusieurs protéines susceptibles de faire partie de granules d'ARN dendritiques (Tableau I). Les auteurs ont utilisé le transcrit chimérique décrit plus haut (section 1.2.3) afin de visualiser l'effet de la sous-expression de protéines identifiées dans la préparation de granule Kif5 sur le transport dendritique d'ARNm contenant les éléments de localisation du 3'UTR de l'ARNm *CamKII $\alpha$* . La sous-expression de ces protéines est obtenue par l'utilisation d'ARN interférents (siARN) qui induisent un RNAi. En utilisant cette approche, les auteurs ont pu déterminer que les protéines suivantes sont importantes pour la localisation dendritique du transcrit chimérique : Staufen1, Pura, hnRNP-U, et PSF. D'autres protéines, comme SYNCRIP et DDX3 qui sont retrouvées dans le protéome des granules Kif5, ne seraient pas essentielles pour le transport du transcrit chimérique.

**Tableau I : Protéines identifiées dans les complexes liés par Kif5**

| Fonction/type      | Nom de la protéine   |
|--------------------|--|
| Transport d'ARN    | FMR1, FXR1, FXR2, Pur $\alpha$ , Pur $\beta$ , Staufen1                                |
| Synthèse protéique | EF-1 $\alpha$ , eIF2 $\alpha$ , eIF2 $\beta$ , eIF2 $\gamma$ , Hsp70,<br>L3 (ribosome) |
| RNA helicase       | DDX1, DDX3, DDX5   |
| hnRNP              | hnRNP A/B, hnRNP A0, hnRNP A1, hnRNP D,<br>hnRNPU                                      |
| Liaison à l'ARN    | ARF6, ALY, EWS, Non0, nucleolin, PSF,<br>Syncrip, TLS                                  |
| Autres             | Protéine associé au récepteur Ser/Thr kinase,<br>TRIM2, TRIM3                          |
| Hypothétiques      | CGI-99, HSPC-117, FLJ38426, zfp385   |

Adapté de (Kanai et al., 2004)

Cependant, le type d'analyse par RNAi et transcrit rapporteur utilisé par les auteurs ne peut que démontrer l'importance des six protéines susmentionnées dans le transport dendritique du transcrit rapporteur surexprimé et non celui de tous les ARNm dendritiques. Ainsi un rôle dans le transport d'ARNm dendritiques pour DDX3 et SYNCRIP ne peut pas être éliminé par ce genre d'étude.

#### 1.3.4 Granules dans les neurones

Les résultats présentés dans les sections précédentes permettent de proposer le modèle suivant : dans les neurones, le transport d'ARNm sous la forme de granules ou de complexes RNP permettrait d'obtenir une traduction locale au niveau des synapses ou près de celles-ci. Cette traduction locale sous-tendrait des changements morphologiques

---

et électrophysiologiques à l'origine des phénomènes de LTP, de la mémoire et de l'apprentissage ainsi que de la neuritogenèse.

## 1.4 Staufen

Un des sujets de cette thèse consiste en la caractérisation des complexes RNP de Staufen<sup>2</sup>. Le choix de cette protéine pour nos études sera justifié dans les parties suivantes.

### 1.4.1 Identification et fonctions

Chez la drosophile, *staufen* fut identifié lors d'un criblage pour des gènes à effet maternel ayant des phénotypes sur le développement embryonnaire (St Johnston et al., 1991). Une délétion dans la séquence du gène entraîne une perte de fonction de la protéine résultante et a des conséquences désastreuses sur l'établissement des structures anatomiques telles que la tête, le thorax, l'abdomen et le plasma polaire des embryons (St Johnston et al., 1991). La mutation de Staufen affecte la localisation et l'expression des transcrits *oskar* (structures postérieures), *bicoïd* (structures antérieures) et *prospero* (système nerveux). Staufen et ces ARNm s'associent en complexes RNP et migrent le long du cytosquelette de microtubules (*oskar* et *bicoïd*) (Theurkauf et al., 1993; Theurkauf, 1994) ou d'actine (*prospero*) (Shen et al., 1998).

Des interactions protéine/ARNm et protéine/protéine sont essentielles à la fonction de Staufen. Par exemple, lors de la division asymétrique des neuroblastes lors du développement du système nerveux, les associations entre Staufen, Miranda et Inscutable sont essentielles à la localisation du transcrit *prospero* (Broadus et al., 1998; Li et al., 1997; Shen et al., 1998).

#### *1.4.2 Staufen chez les mammifères*

Afin de mieux comprendre les phénomènes de transport d'ARN chez les mammifères, notre laboratoire de recherche a cloné et caractérisé deux gènes Staufen de mammifère, Staufen1 et Staufen2 (Duchaine et al., 2002; Wickham et al., 1999).

#### *1.4.3 Clonage et caractérisation moléculaire de Staufen1*

Chez les mammifères, le gène *Staufen1* (*Stau1*) est exprimé dans tous les types cellulaires testés et génère au moins deux isoformes avec des poids moléculaires apparents de 63 kDa et 55 kDa (Marion et al., 1999; Wickham et al., 1999). *Stau1* possède un domaine de liaison à la tubuline homologue à celui de MAP1B qui est suffisant pour lier la tubuline in vitro (Wickham et al., 1999). Dans des lysats cellulaires enrichis en EDTA, l'isoforme de 55kDa (*Stau1<sup>55</sup>*) est associé aux deux sous-unités ribosomiques 40S et 60S (Luo et al., 2002). *Stau1<sup>55</sup>* co-sédimente avec les polysomes (Luo et al., 2002; Marion et al., 1999), mais lorsque les cellules sont traitées avec du  $\text{NaN}_3$ , qui épuise le bassin d'ATP de la cellule et inhibe la ré-initiation de la traduction, les polysomes sont détruits et *Stau1<sup>55</sup>* est enrichie au niveau des complexes 80S libres (Dugré-Brisson, S., Elvira, G., Boulay, K., Chatel-Chaix, L., Mouland, A. et DesGroseillers, L., manuscrit en préparation).

#### *1.4.4 Rôles potentiels de Stau1*

Plusieurs études suggèrent que *Stau1* serait une protéine multi-fonctionnelle. *Stau1* serait impliquée dans l'encapsidation de l'ARN génomique du HIV-1 dans les particules virales (Mouland et al., 2000). De plus, *Stau1* interagit avec l'ARN de la télomérase, ce qui suggère une fonction dans la réplication de l'ADN, la division cellulaire ou les deux

(Bachand et al., 2001; Le et al., 2000). Enfin, des rôles dans le transport, la traduction et/ou la stabilité d'ARNm imputés à Stau1 sont décrits ici-bas.

#### 1.4.4.1 Régulation de la traduction

Deux approches protéomiques par des équipes de recherche indépendantes ont permis l'identification de plusieurs protéines présentes dans des immunoprécipitats de Stau1 surexprimée dans des cellules HEK293 (Tableau 2).

La première équipe a utilisé une fusion Stau1<sup>55</sup>-PDZ afin de purifier par chromatographie d'affinité les complexes RNP de Stau1<sup>55</sup> (Brendel et al., 2004). Les auteurs ont exploité l'affinité du domaine PDZ de la protéine SSTRIP/Shanks, fusionné à la protéine Stau1<sup>55</sup>, envers le domaine C-terminal de la protéine GKAP/SAPA1, fusionné à des billes de sépharose (Kim et al., 1997; Naisbitt et al., 1999). Bien que présentant un certain intérêt scientifique, cette étude préliminaire présente une lacune majeure : les associations potentielles obtenues n'ont pas été validées dans un contexte biologiquement significatif. En effet, les auteurs ont choisi de valider toutes les interactions potentielles à l'aide d'essais d'immunoprécipitation avec des protéines de fusion surexprimées. Aussi, nous considérons ces associations comme potentielles, mais non vérifiées.

Les résultats suggèrent une association de Stau1<sup>55</sup>-PDZ avec les ribosomes ce qui était déjà connu pour Stau1<sup>55</sup> endogène (Luo et al., 2002; Marion et al., 1999). D'autres interactions potentielles avec des protéines impliquées dans la régulation de la traduction/élongation ou la stabilité des ARNm sont suggérées par cette étude : FMRP (Antar and Bassell, 2003; Sung et al., 2003; Zalfa et al., 2003), NFAR/NF45 (Shim et al., 2002), PABP (Kahvejian et al., 2001). Les moteurs moléculaires kinésine et dynéine,

spécifiques au réseau de microtubules (Mallik and Gross, 2004) sont également des partenaires potentiels de Stau1<sup>55</sup>-PDZ.

La deuxième équipe de recherche a identifié par analyse protéomique les protéines présentes dans les complexes RNP d'une fusion Stau1<sup>55</sup>-TAP surexprimée dans des HEK293 (Tableau 2) (Villace et al., 2004). Le domaine TAP contient deux domaines qui permettent la purification de protéines par deux étapes subséquentes : un domaine de liaison à la calmoduline ainsi qu'un domaine de la protéine A de haute affinité pour les IgG, séparés par un site de clivage spécifique à la protéase TEV (Rigaut et al., 1999). Au contraire de l'étude précédente (Brendel et al., 2004), certaines de ces associations potentielles ont été validées avec les protéines endogènes. L'étude de Villace et collaborateurs suggère qu'il existe une association entre Stau1<sup>55</sup> et les ribosomes, PABP, FMRP, kinésine et la chaîne intermédiaire des dynéines.

De plus, elle suggère une association entre Stau1<sup>55</sup> et le cytosquelette : la chaîne lourde de la myosine, l'actine et la tubuline se retrouvent dans l'immunoprécipitat. Bien que préliminaires, ces deux études suggèrent un rôle pour Stau1<sup>55</sup> dans la régulation de la traduction d'ARNm qui pourraient être transportés par des moteurs dynéine et kinésines.

Un résultat intéressant de cette étude est la présence dans les complexes Stau1<sup>55</sup>-TAP, de protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette et la motilité cellulaire : IQGAP1 (Briggs and Sacks, 2003), Cdc42 (Cerione, 2004; Erickson et al., 1997) et Rac1 (Nobes and Hall, 1999). Selon les auteurs, ces interactions Stau1<sup>55</sup>/IQGAP/Cdc42/Rac1 sont corroborées par des images de co-localisation des protéines endogènes dans des neurites de neuroblastes différenciés ainsi que par des immunoprécipitations. Cependant :

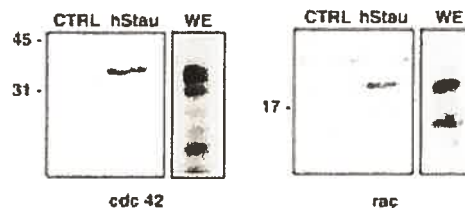
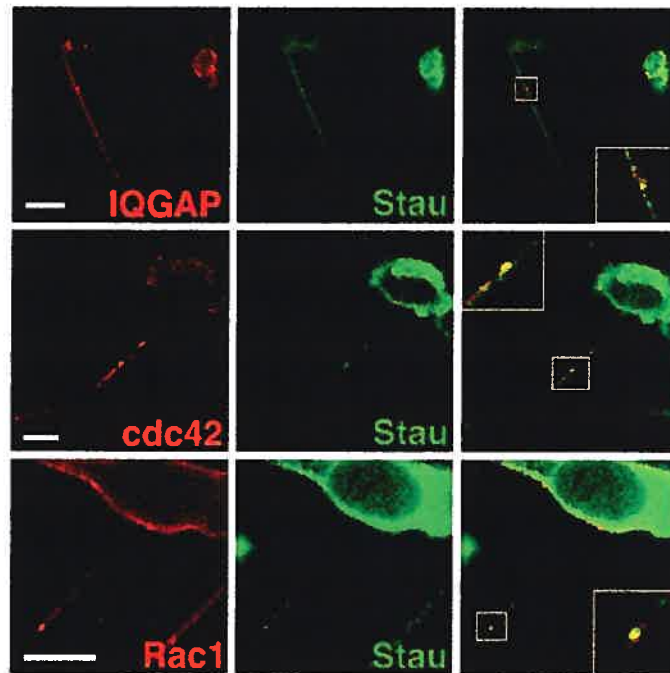
- 
1. Les anticorps utilisés montrent peu de spécificité par immunobuvardage (Figure 6A). Les signaux observés en fluorescence pourraient être générés par d'autres protéines que celles proposées par les auteurs.
  2. Les signaux obtenus par immunofluorescence dans les neurites des neuroblastes semblent être saturés ce qui pourrait provoquer une superposition de signaux fortuits (Figure 6B).
  3. La superposition des images dans les différents canaux rouge et vert offre une co-localisation très partielle qui pourrait être expliquée par un renflement du neurite à l'endroit du « granule » observé. Une meilleure résolution serait ici souhaitable. Une image en phase serait également nécessaire afin d'évaluer la contribution éventuelle d'un renflement anatomique (Figure 6B).



**Tableau II : Protéines associées avec Stau1<sup>55</sup>  
surexprimée dans des HEK293**

| Protéine   | Stau1 <sup>55</sup> -PDZ<br>(Brendel et al) | Stau1 <sup>55</sup> TAP<br>(Villace et al) |
|--|---|--|
| <b>Kinésine, chaîne lourde</b>                         | *   | *  |
| <b>Dynéine, chaîne intermédiaire</b>                   | *   | X  |
| <b>Myosine, chaîne lourde</b>                          |   | X  |
| <b>hnRNPU</b>  | X   | X  |
| <b>NF45</b>  | X   |  |
| <b>RNAH</b>  | X   | X  |
| <b>PABP</b>  | *   | X  |
| <b>FMRP</b>  | *   | *  |
| <b>Nucléoline</b>                                      | X   | X  |
| <b>PP1<math>\alpha</math></b>                          | *   |  |
| <b>hStau2</b>  |   | X  |
| <b>IQGAP1</b>  |   | X  |
| <b>Cdc 42</b>  |   | *  |
| <b>Rac1</b>  |   | *  |
| <b>Ras GAP</b>   |   | X  |
| <b>Protéine kinase II associée à <math>\rho</math></b> |   | X  |
| <b><math>\beta</math>5- tubuline</b>                   |   | X  |
| <b><math>\beta</math>-actine</b>                       |   | *  |
| <b><math>\beta</math>4- tubuline</b>                   | X   |  |
| <b><math>\alpha</math>-tubuline</b>                    | *   | *  |
| <b><math>\alpha</math>-internexine</b>                 |   | X  |
| <b>Tau</b>   |   | *  |
| <b>Protéines du ribosome 40S</b>                       | X   | X  |
| <b>Protéines du ribosome 60S</b>                       | X   | X  |

Légende : X = détectée par protéomique, \* = détectée par immunobuvardage

**A****B**

**Figure 6. Évidences d'une interaction entre Rac1/cdc42 et Stau1**

**A)** Immunoprécipitation de Stau-TAP surexprimé dans des HEK293. Le précipitat (hStau) est révélé avec de l'Anti-cdc42 et de l'anti-rac1. Notez les nombreuses bandes détectées par le sérum dans l'extrait cytoplasmique pré-immunoprécipitation (WE). Les marqueurs moléculaires sont indiqués à la gauche de chaque panneau en kDa. **B)** Neuroblastes différenciés, fixés et traités pour immunofluorescence avec les anticorps utilisés en (A). Images obtenues avec un microscope confocal. Les panneaux de droite représentent la juxtaposition des images de gauche et du centre. Les images dans l'encart sont un agrandissement des régions indiquées. La barre de calibration représente 10  $\mu$ m.

Tiré de (Villace et al., 2004).

#### 1.4.4.2 Dégradation d'ARNm spécifiques

Une étude récente réalisée dans notre laboratoire, en collaboration avec l'équipe de Lynne Maquat (Kim et al., 2005), suggère un nouveau rôle pour Stau1 dans la régulation de la stabilité d'ARNm. Cette étude démontre de façon très élégante que la dégradation de l'ARNm médiée par Stau1 (SMD : *Staufen mediated decay*) implique la protéine du NMD Upf1 (*non sense mediated decay*), mais pas les autres facteurs du NMD. Chez les mammifères, le NMD est un mécanisme qui dépend généralement de l'épissage et dégrade des ARNm aberrants nouvellement synthétisés qui contiennent un codon STOP prématuré (Maquat, 2004; Maquat and Serin, 2001). Cette dégradation spécifique empêche ainsi la synthèse de protéines tronquées dont l'effet serait désastreux au niveau du métabolisme cellulaire (Inoue et al., 2004).

Le complexe EJC (*exon junction complex*) se dépose 20-24 nucléotides en amont de jonctions exon-exon générées par l'épissage (Le Hir et al., 2000). Ce complexe EJC comprend entre autre les facteurs du NMD Upf3 ou Upf3X, Upf2 et possiblement Upf1 (Gehring et al., 2003; Kim et al., 2001; Lykke-Andersen et al., 2001). Le positionnement du complexe EJC agit ainsi en tant que marqueur d'introns; un STOP retrouvé en amont d'un complexe EJC est ainsi reconnu comme prématuré (Carter et al., 1996; Nagy and Maquat, 1998; Zhang et al., 1998a; Zhang et al., 1998b).

L'interaction de Stau1 avec Upf1 et une séquence du 3'UTR de l'ARNm Arf1 (ADP-ribosylation factor) entraîne la dégradation du transcrit par un mécanisme indépendant du NMD puisqu'il n'implique pas l'épissage ou les autres facteurs du EJC. En effet, la sous-expression d'Upf2 et d'Upf3X par RNAi n'affecte pas le SMD. De plus, un transcrit chimérique contenant la séquence qui recrute Stau1 en aval d'un STOP

normalement situé est également dégradé par un mécanisme indépendant du NMD ou du EJC, mais dépendant de Upf1 et Stau1.

La régulation du phénomène de SMD pourrait s'effectuer au travers des mécanismes exposés ci-dessous. Bien que la protéine Stau1 soit détectée dans tous les tissus testés, les niveaux d'expression semblent varier d'un tissu à l'autre (Marion et al., 1999; Wickham et al., 1999). Dans ce même sens, l'expression de Stau1 est induite suite à la différenciation myogénique (lors de la formation du tissu musculaire), à l'innervation et au traitement de cellules du muscle avec des facteurs trophiques (Belanger et al., 2003). De plus, le transcrit de *Stau1*, soumis à des événements d'épissage alternatif, génère différentes isoformes qui s'expriment selon des patrons d'expression spécifiques au tissu. Enfin, la protéine possède plusieurs sites de phosphorylation potentiels qui pourraient réguler sa fonction. Dans ce même sens la protéine phosphatase-1 (PP1) interagit avec Stau1 (Monshausen et al., 2002). Ainsi, les fonctions de Stau1 pourraient être modulées au niveau transcriptionnel, co-transcriptionnel (épissage) et post-transcriptionnel (phosphorylation, etc.). Enfin, le SMD pourrait également être régulé au niveau de la modulation de l'interaction Stau1 / Upf1.

#### 1.4.4.3 Transport de l'ARNm

Chez la drosophile, des études génétiques ont révélé l'importance de la protéine *Staufen* dans le transport et la localisation d'ARNm maternels durant l'ovogenèse et d'ARNm embryonnaire durant l'embryogenèse (Li et al., 1997; St Johnston et al., 1991). Chez les mammifères, la présence de deux gènes *Staufen* distincts, dont la structure primaire de la protéine a été conservée au cours de l'évolution suggère également une

conservation de la fonction de la protéine dans des processus de transport et de localisation d'ARNm.

Plusieurs évidences expérimentales supportent une telle fonction pour Stau1 chez les mammifères. Dans des neurones d'hippocampe de rat en culture, la protéine Stau1 endogène co-localise avec des granules SYTO14-positifs contenant vraisemblablement de l'ARN et une protéine de fusion Stau1-GFP se déplace dans les dendrites de neurones vivants avec des vitesses similaires à celles observées pour les granules d'ARN SYTO14-positifs (Kiebler et al., 1999; Knowles et al., 1996; Kohrmann et al., 1999). Des images acquises par microscopie électronique d'échantillons issus d'un fractionnement sub-cellulaire de neurones en cultures démontrent la présence de Stau1 dans des complexes RNP de haute densité (Krichevsky and Kosik, 2001) qui représenteraient les granules de transport de l'ARN identifiés par Knowles et al (1996). La présence de nombreux types de complexes RNP-Stau1 est également montrée par un fractionnement par chromatographie sur colonne d'un lysat soluble (fraction S100; surnageant après centrifugation à haute vitesse, 100 000g) de cerveau de rat (Mallardo et al., 2003). Enfin, l'utilisation de siARN anti-Stau1 diminue la localisation dendritique d'un ARN rapporteur chimère qui contient le 3'UTR de l'ARNm de la CaMKII $\alpha$  (section 1.2.3) dans des neurones d'hippocampe de rat en culture ce qui suggère que Stau1 est un facteur essentiel à la localisation de transcrits dont la localisation dendritique dépend des signaux contenus dans le 3'UTR de la CaMKII $\alpha$  (Kanai et al., 2004).

#### 1.4.5 Clonage et caractérisation moléculaire de *Stau2*

Chez les mammifères un second gène code pour un autre orthologue de *Staufen* : *Staufen2* (Stau2) (Buchner et al., 1999). Dans des neurones en culture, la quantité de Stau2 présente dans les dendrites corrèle avec celle de l'ARN, ce qui suggère que Stau2 serait impliqué dans le transport d'ARN dendritique (Tang et al., 2001). Un épissage alternatif génère au moins deux isoformes de 62 kDa et 59 kDa qui diffèrent par leur séquence en N-terminal (Duchaine et al., 2002). Dans un gradient de sucrose, Stau2<sup>62</sup> est présent dans des complexes légers alors que Stau2<sup>59</sup> est associé avec les ribosomes. Cette association est également corroborée par des essais d'immunoprécipitation. L'imagerie par immunofluorescence des protéines endogènes, des essais de fractionnement sub-cellulaire ainsi que des essais d'immunoprécipitation suggèrent que dans le cerveau, Stau1 et Stau2 font partie de complexes RNP différents (Duchaine et al., 2002; Mallardo et al., 2003). Ainsi leurs rôles pourraient être différents et/ou complémentaires.

#### 1.4.6 La navette nucléo-cytoplasmique de *Staufen2*

Cette protéine est retrouvée principalement dans le compartiment somato-dendritique de neurones (Duchaine et al., 2002; Tang et al., 2001). Cependant, des mutations dans le domaine de Stau2 responsable de la liaison à l'ARN (dsRBD3) ont révélé l'importance de la liaison à l'ARN pour l'établissement d'une navette entre le cytoplasme et le noyau dont le mécanisme d'action est spécifique à chaque isoforme (Macchi et al., 2004; Miki and Yoneda, 2004). L'isoforme de 59 kDa suit deux voies : la première est CRM1 (exportine-1)-dépendante et la seconde est dsRBD3-dépendante.

L'export nucléaire de l'isoforme de 62 kDa utilise une seule voie qui dépend de l'exportine-5 et d'un dsRBD3 fonctionnel.

#### 1.4.6.1 Import nucléaire

La transfection dans des cellules humaines HeLa ou de hamster BHK (*baby hamster kidney*) de mutants de délétions de Stau2 fusionnés à la GFP suggère que la séquence comprise entre le dsRBD3 et le dsRBD4 est suffisante pour l'import nucléaire de la protéine de fusion (Macchi et al., 2004; Miki and Yoneda, 2004). Le signal bipartite (en gras) responsable de l'import nucléaire serait compris dans la séquence **KK(A.A.)<sub>14</sub>KKR** (où A.A. sont des acides aminés différents) puisque la mutation des lysines (K) pour des alanines (A) exclut la protéine de fusion du noyau de cellules BHK (Macchi et al., 2004).

#### 1.4.6.2 Export nucléaire exportine-5 dépendant

Des essais de liaison *in vitro* (*GST pool down*) suggèrent que la protéine exportine-5 peut lier Stau2 de façon ARN-dépendante au niveau du dsRBD3. Exportine-5 est impliquée dans l'export nucléaire RAN-GTP-dépendant de shARN et de pré-miARN (Bohnsack et al., 2004; Kim, 2004; Yi et al., 2003; Zeng and Cullen, 2004). Ces résultats suggèrent que la liaison à de l'ARNdb par le dsRBD3 de Stau2, présent dans les deux isoformes de 59 et de 62 kDa, permet la liaison à l'exportine-5, puis son export hors du noyau. Dans ce même sens, la sous-expression d'exportine-5 par siARN corrèle avec l'enrichissement nucléaire de Stau2<sup>62</sup>-GFP, démontrant ainsi la dépendance de l'isoforme de 62 kDa pour l'exportine-5 afin de sortir du noyau (Macchi et al., 2004).

De façon très surprenante, la localisation sub-cellulaire de Stau2<sup>59</sup> n'est pas affectée par le siARN anti-exportine-5 (Macchi et al., 2004).

#### 1.4.6.3 Export CRM1-dépendant

Ce résultat surprenant est expliqué par l'étude de Miki et Yoneda (2004). En effet, l'introduction d'une mutation dans le dsRBD3 qui le rend incapable de lier de l'ARNdb, dévoile l'existence d'une seconde voie d'export nucléaire pour Stau2<sup>59</sup>. Ainsi, lorsque Stau2<sup>59</sup> possède un dsRBD3 muté la protéine devient sensible à un traitement avec de la leptomycine B (LMB). Ce qui révèle que cette isoforme de 59 kDa emprunte une voie d'export nucléaire qui est indépendante d'une liaison à l'ARNdb.

La LMB, est un inhibiteur de la voie d'export nucléaire CRM1/exportine-1 (Fukuda et al., 1997; Nishi et al., 1994). Dans ce même sens, la sous-expression de CRM1/exportine-1 par l'utilisation de siARN inhibe l'export nucléaire de Stau2<sup>59</sup> muté au niveau du dsRBD3. Le signal d'export nucléaire (NES, *nuclear export signal*) serait contenu dans la séquence en N-terminale spécifique à l'isoforme de 59 kDa : MLQINQMFSVQLSL. En effet, la mutation d'I4, L12 ou L14 (en gras dans la séquence) empêche l'export nucléaire de Stau2<sup>59</sup> muté au niveau du dsRBD3, mais non de Stau2<sup>59</sup> avec un dsRBD3 fonctionnel. Ces résultats corroborent un modèle où deux voies d'export nucléaire seraient utilisées par Stau2.



# 2

## HYPOTHÈSES DE TRAVAIL

---

Au moment d'entreprendre les travaux de cette thèse, il n'existait pas de résultats décrivant le protéome des granules d'ARN dendritiques de neurones du cerveau de mammifères. En partant des évidences expérimentales suivantes :

1. Les granules d'ARN sont des complexes RNP qui forment des complexes de haute densité (section 1.2)
2. Lors du développement embryonnaire, la neuritogenèse est un processus très actif (section 1.3)
3. Le transport d'ARN est essentiel à la neuritogenèse (section 1.3)

Nous avons proposé l'hypothèse suivante :

*Des fractionnements sub-cellulaires de cerveaux embryonnaires en développement devraient permettre d'isoler des complexes RNP de transport de l'ARN de façon suffisamment homogène afin de permettre une caractérisation de type protéomique.*

---

Nous avons également utilisé une approche plus classique afin d'identifier des partenaires protéiques de Stau2 qui pourraient faire partie des granules d'ARN dendritiques de Stau2. Nous avons donc proposé l'hypothèse suivante :

*Des protéines pouvant lier Stau2 par des interactions protéine/protéine devraient être détectables par un essai de double-hybride chez la levure.*

3

**RÉSULTATS**

---

**3.1 ARTICLE 1 :**

**Characterization of a putative RNA granule from developing brain**

### Mise en contexte au chapitre 3.1

Nous avons envisagé l'enrichissement de complexes RNP de transport de l'ARN durant le développement embryonnaire du cerveau à la suite de la détection de contaminants dans une préparation de macromolécules de haute densité de CCV (*chlattrin coated vesicles*) qui ressemblaient à des granules d'ARN (Wasiak et al., 2002).

Durant nos études, d'autres équipes de recherche ont utilisé des approches de type protéomique afin de mener à terme leurs études. Ces résultats dévoilent en partie les constituants protéiques de granules d'ARN spécifiques à la sous-famille des kinésines Kif5 (Kanai et al., 2004) ou à la présence de la protéine Stau1 (Brendel et al., 2004; Villace et al., 2004).

L'approche de type protéomique permet la connaissance exhaustive des composants protéiques d'un échantillon donné. Ainsi, l'homogénéité de l'échantillon est un élément critique afin de déterminer l'authenticité des complexes identifiés.

Cet article présente la préparation et la caractérisation biochimique de cette préparation, puis la validation des protéines identifiées comme composants de granules d'ARN dendritiques de même que la caractérisation d'une de ces protéines, Deadbox 3 (DDX3).

---

**Note**

-Contribution de chacun des auteurs :

G. Elvira : Culture primaire et transfection de neurones d'hippocampe. Hybridation in situ et immunofluorescence. Microscopie confocale et imagerie de neurones vivants. Statistiques de mouvements de granules et écriture du manuscrit.

S. Wasiak : Fractionnement sub-cellulaire, statistiques de co-localisation, microscopie électronique et écriture du manuscrit.

X.-K. Tong : Fractionnement sub-cellulaire

A. Serrano : Imagerie des neurones vivants.

V. Blandford : Fractionnement sub-cellulaire. Purification et caractérisation de sera par immunobuvardage. Immunobuvardages

A.W. Bell : Écriture du manuscrit.

J.C. Lacaille : Écriture du manuscrit.

D. Boismenu : Écriture du manuscrit.

P. McPherson : Supervision générale et écriture du manuscrit.

L. DesGroseillers : Supervision générale et écriture du manuscrit.

W. Sossin : Supervision générale, recherche en base de données, écriture du manuscrit.

Article soumis à : Journal of Biological Chemistry, (M5:05516) le 20 mai 2005.

---

**CHARACTERIZATION OF A PUTATIVE RNA GRANULE FROM  
DEVELOPING BRAIN.**

---

George Elvira<sup>1</sup>, Sylwia Wasiak<sup>2</sup>, Vanessa Blandford<sup>2</sup>, Xin-Kang Tong<sup>2</sup>, Alexandre Serrano<sup>3</sup>, Xiaotang Fan<sup>2</sup>, Alexander W. Bell<sup>4</sup>, Daniel Boismenu<sup>4</sup>, Jean-Claude Lacaille<sup>3,5</sup>, Peter S. McPherson<sup>2</sup>, Luc DesGroseillers<sup>1,5</sup>, and Wayne S. Sossin<sup>2,5</sup>

1. Département de Biochimie, Université de Montréal, 2900 Edouard-Montpetit, Montreal, Quebec, Canada H3C3J7 2. Montreal Neurological Institute, McGill University, 3801 University, Montreal, Quebec Canada H3A2B4 3. Département de Physiologie, Université de Montréal, 2900 Edouard-Montpetit, Montreal, Quebec, Canada H3C3J7 4. Canada Montreal Proteomics Centre, McGill University, 740 Dr. Penfield, Montreal, Quebec, Canada, H3A1A4 5. Centre de Recherches en Sciences Neurologiques, Université de Montréal, 2900 Edouard-Montpetit, Montreal, Quebec, Canada H3C3J7

Address correspondence to :

Dr. Wayne S. Sossin

Dept. of Neurology and Neurosurgery,

McGill University Montreal Neurological Institute,

BT 110 3801 rue University

Montreal, Quebec Canada

H3A 2B4

Tel. 1-514-398-1486

Fax.: 1-514-398-8106

████████████████████

**Article soumis à : Molecular Cell Proteomics, Juin 2005.**

---

---

**Abstract**

In brain, mRNAs are transported from the cell body to the processes, allowing for local protein translation at sites distant from the nucleus. Using subcellular fractionation, we have isolated a fraction from developing brain enriched for structures that resemble amorphous collections of ribosomes, similar to what have been described as RNA granules. This fraction was enriched for the mRNA encoding b-actin, an mRNA that is transported in dendrites and axons of developing neurons. Abundant protein components of this fraction, determined by tandem mass spectrometry, include ribosomal proteins, RNA-binding proteins, microtubule-associated proteins, and several proteins described only as potential open reading frames. Expression of a subset of the identified proteins in cultured hippocampal neurons confirmed that proteins identified in the proteomics were present in neurites associated with ribosomes and mRNAs. Moreover, many of the expressed proteins co-localized together. Time-lapse video microscopy indicated that complexes containing one of these proteins, the DEAD Box 3 helicase, migrated in dendrites of hippocampal neurons at the same speed as that reported for RNA granules. These studies define the isolation and composition of RNA granules expressed in developing brain

**Introduction**

Most mRNAs encoding soluble proteins are targeted to ribosomes and translated in a non-localized manner in the cytoplasm (1). In contrast, mRNAs encoding secretory proteins have their translation halted and are transported (in concert with the ribosome) to the endoplasmic reticulum (ER) so translation can be coupled with import of the protein into the ER (2). In contrast to these two well-studied mechanisms of translation, some mRNAs are targeted to specific regions of the cell, where they undergo localized

translation (3-5). These mRNAs contain elements, usually located in their 3'-untranslated region (3'-UTR), that bind to RNA-binding proteins that direct mRNA targeting. Translation of transported mRNAs is repressed during transport and the repression is removed after arrival at the proper location (5,6). This mechanism is important for determining cell fate and cell polarity (6). In neurons, transport of mRNA may allow for local translation at or near synapses (7). Indeed, there is evidence for specific targeting and translation of a newly synthesized mRNA to activated synapses (8). Another use for mRNA transport in developing neurons is for localized translation in growth cones during neurite outgrowth (9-11).

The mechanism by which mRNAs are transported to axons and dendrites is unclear. One hypothesis is that mRNAs are transported by RNA granules that corresponded at an ultrastructural level to large amorphous collection of ribosomes (12). Although these granules have been characterized at the cellular level, there has been little molecular characterization of the granules. The mRNA-binding proteins Staufen (Stau1 and Stau2) are localized to granules and levels of transported mRNAs are decreased by dominant negative mutants of Staufen (13-15), or by siRNA to Staufen (16). However, specific mRNAs enriched in these RNA granules have not been described. Recently, using association with the motor protein KIF5a, components of an RNA granule that appears to be important for the transport of CaMKII $\alpha$  mRNA have been identified (16), but while this granule was quite large, there was no evidence that it was associated with ribosomes.

Some specific mRNA-binding proteins have been implicated in RNA transport in neurons. Zip code binding proteins (ZBP1 and ZBP2) are transported to neurites in chicken and mammalian neuronal cultures and help localize b-actin mRNA to dendrites



and growth cones (17-19). Disrupting this transport blocks growth cone motility (17). HnRNP-A2 has been shown to recognize a motif present in some transported mRNAs and disruption of this interaction blocks some mRNA transport (20). Again, it is unclear whether the transport of b-actin or hnRNP-A2 bound mRNAs is in the presence or absence of ribosomes. CaMKII $\alpha$  mRNA transport was blocked by RNAi to a number of granule proteins including Pur-a and Staufen (16). We report here the enrichment and proteome of a structure consisting of amorphous collections of ribosomes enriched for a transported mRNA isolated from developing brain. Many of the proteins identified in the proteome are involved in RNA transport and localize together in neurites together with ribosomes and mRNA.

### Experimental Procedures

#### *RNA granule purification*

The outline of the purification strategy is shown in Figure 1A. It is a modification of a standard protocol used to purify CCVs from adult brain (21). 300 E18 rat brains were homogenized in 10 volumes buffer A (10 mM MES, pH 6.8, 0.5 mM EGTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>) using glass-Teflon homogenizer (10 strokes, 1500 rpm) and the homogenate (H) centrifuged for 20 min at 17,000 x g in SS-34 rotor (Sorvall DuPont). The resulting supernatant (S1) was collected and centrifuged at 56,000 x g for 1 hour in T-865 rotor (Sorvall). The pellet from this spin is P1. The pellets were resuspended with a glass-Teflon homogenizer (5 strokes, 1500 rpm) in a total volume of 10 ml buffer A, followed by dispersion through a 25 5/8 gauge needle. The suspension was then mixed with 10 ml of buffer A containing 12.5% (wt/vol) of each Ficoll and sucrose and centrifuged for 20 min at 43,000 x g in a SS-34 rotor. The pellet from this spin is SGp. The supernatant was removed, diluted 1:5 in buffer A and centrifuged for 1 hour at 91,000 x g in T-865 rotor.

The pellet was resuspended with a glass-Teflon homogenizer (5 strokes, 1500 rpm) in a total volume of 15 ml buffer A and cleared by centrifugation at 19,000 x g for 10 min. The supernatant (SGs) was equally divided in two 7.5 ml aliquots and each placed into a 13 ml thin-wall centrifuge tube for Sorvall AH-629 rotor. Each tube was then underlayered with 2.5 ml of buffer A prepared with D2O containing 8% (wt/vol) sucrose and centrifuged for 2 hours at 116,000 x g in AH-629 rotor. The resulting pellet (called the clathrin-coated vesicle (CCV) fraction) was resuspended in 0.5 ml of buffer A and the samples were loaded onto 20-50% linear sucrose gradients prepared in buffer A. The gradients were centrifuged in a AH-629 rotor at 145,000 x g for 45 min and then fractionated from the bottom into 12 fractions of 1 ml each. Fraction 1 and the pellet were collected (called the RNA granule fraction), diluted 2-fold in buffer B (buffer A plus 60 mM EDTA), and placed on a second 20-50% linear sucrose gradient in buffer C (buffer A plus 30 mM EDTA). This gradient was centrifuged in a AH-629 rotor at 145,000 x g for 180 min and 12 fractions of 1 ml each were collected. The total protein complement of each fraction was then run on an SDS-PAGE gel following precipitation of the proteins with trichloroacetic acid.

#### *Proteomic Techniques*

Fractions were separated by SDS-PAGE, stained with Coomassie Blue and cut into 48 horizontal gel slices, with each slice processed for in-gel trypsin digestion and peptide extraction (22). The extracted peptide mixtures were separated and analyzed in an automated system by nanoscale liquid chromatography quadrupole time-of-flight (LC Q-ToF) MS/MS as described (22). After fragmentation in the MS/MS mode, the resulting spectra were analyzed in-house online by the software analysis program MASCOT (Matrix Science Ltd.) to identify tryptic peptide sequences that matched to the NCBI

non-redundant mammalian protein database. Protein identification was based on one or more peptides assigned with 95% confidence level (95% confidence limit for MASCOT ranged between identity scores of 35 and 40). For borderline assignments ( $\pm 10$  of identity score), spectra were manually inspected for the presence of 4 clearly identified consecutive y ions as described (23). All retained proteins matched approximately to the molecular weight of the gel slice that the identification originated from. Unique peptides were assigned to proteins only if those peptides were the best match to the assigned protein based on MS/MS fragmentation. A similar rule was used for peptides that matched an accepted identification but were from an adjoining gel slice. While peptide counts are semi-quantitative and depend on the number of tryptic peptides/protein and other technical issues (such as peptide extractability from the gel slice), when enough peptides are present, quantitative predictions can be made (23).

#### *Immuno-Electron Microscopy*

For pre-embedding immunogold labeling, the CCV pellet was resuspended in buffer A containing the primary antibody. After an overnight incubation at 4°C, the sample was diluted 30-fold with buffer A, centrifuged at 91,500 x g for 1 hour, resuspended in buffer A and fixed in 0.05% glutaraldehyde/buffer A for 30 minutes on ice. After fixation, the suspension was filtered onto Millipore membranes (0.1 micrometer pores). Membranes were then washed three times for 15 minutes in buffer A, incubated three times for 15 minutes in 3% bovine serum albumin/buffer A and subsequently incubated with protein A-gold or goat anti-mouse-gold secondary antibody in buffer A for 30 minutes with mild agitation at room temperature. Membranes were washed 4 times for 15 minutes in buffer A and fixed in 2.5% glutaraldehyde/buffer A overnight at 4°C. After three washes of 15 minutes in 0.1 M Na Cacodylate, pH 7.4, membranes were fixed with reduced osmium,

dehydrated and processed for EM. Pictures were taken at sections with gold particles present. All pictures were quantitated in a blinded fashion. First, all structures on the picture were identified as either RNA granule, CCV, or other and the area of these regions calculated using NIH IMAGE. Regions with no structures were then assigned by default to empty. Gold particles were then assigned to one of the four categories based on proximity to the identified structures.

#### *Plasmid construction*

IMAGE clones were obtained for mouse SYNCRIP (IMAGE: 5293527), mouse hnRNP C (IMAGE: 3492858), mouse CGI-99 (IMAGE: 3656382), mouse G3BP1 (IMAGE: 3152563), human ELAV-like 4/HU-D (IMAGE: 5286347), human DEAD box 3 (IMAGE: 3617040) and human Interleukin enhancer binding protein 2 (IEB-2) (IMAGE: 4778612). Enhanced cyan fluorescent protein (ECFP) and enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) (Clontech) were cloned into the pCDNA-RSV vector. Primers were designed to amplify the entire reading frame of the IMAGE clones and these were inserted at the C-terminal of ECFP and EYFP. Clones were sequenced and expressed in HEK293T cells to confirm that proteins were produced at the correct molecular weight using blotting with anti-fluorescent protein antibodies (data not shown).

#### *Localization of fluorescent protein-tagged proteins in hippocampal cultures*

Primary hippocampal neuron cultures derived from E17-E19 Sprague Dawley rat embryos (Charles River laboratories) were cultured on 0.1% poly-D-lysine-coated round 18 mm diameter glass coverslips (Fisher) according to the standard protocol (24). Culture media consisted in Neurobasal medium supplemented with 1X GlutaMax, 25

$\mu$ M glutamate and 2% B27 supplements (Gibco Invitrogen). On day 3 after plating, one half of the culture media was removed and replaced with fresh media without glutamate. On day 4-6 after plating, transfections were carried out with CaPO<sub>4</sub>-DNA/HBS (pH 7.04) precipitate in fresh medium with 1  $\mu$ g total DNA/cover slip. Protein expression was assessed 16-20 hours later. All DNA used for transfections were double-banded CsCl purified. The transfected neurons were fixed in 4% paraformaldehyde/PBS containing 4% sucrose treated for immunocytochemistry and mounted with Prolong Antifade reagent (Molecular Probes). Images were acquired on a Nikon TE2000U inverted microscope using a 60x 1.4 NA objective, magnified 1.5x, standard fluorescence cubes and a Photometrics CoolSnap HQ (Roper Scientific) camera. Images were deblurred off-line by a deconvolution protocol using a nearest neighbour point spread function (Metamorph, Universal Imaging).

#### *Immunocytochemistry and Immunoblotting*

The following primary antibodies were used: hnRNPA1 (generous gift of Dr. Gideon Dreyfus), SYNCRIP (generous gift of Dr. Akihiro Mizutani), IMP2 (generous gift of Dr. Jan Christiansen), YB-1 (generous gift of Dr. Nahum Sonenberg) rabbit anti-S6 antibodies (Cell Signaling Technology), mouse monoclonal anti-Staufen2 antibodies (25), human anti-P0 antibodies (a generous gift of M. Reichlin, Oklahoma Medical Research Foundation, USA), FMRP (Chemicon), Pur alpha/beta (a generous gift of Dr. Kelm; (26), dynein (Santa Cruz). The antibody to DEAD Box 3 was raised against the peptide (CDKSDEDDWSKPLPPSER-amide) after coupling to KLH-maleimide (Pierce). As secondary antibodies, Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG, goat anti-mouse IgG and goat anti-human IgG (dilution 1:1000; Molecular Probes) were used. For

immunoblotting, secondary antibodies linked to peroxidase (Pierce) were used and imaging was obtained by enhanced chemiluminescence.

*Fluorescence in situ hybridization with digoxigenin-labeled probes.*

23-mer poly(dT) were 3' end-labeled with digoxigenin (DIG) as indicated by the manufacturer (Roche Molecular Biochemicals). DIG incorporation was checked by dot blot. Fixed cells were subjected to fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with the DIG-labeled poly(dT) probes as described (Bassel et al, 1998). Hybridized probes and xFP-fusion protein were detected by IF using a sheep anti-DIG antibody (1:200; Roche Molecular Biochemicals) and a mouse anti-GFP (1:200; Roche Molecular Biochemicals). Secondary antibodies used were Alexa 594-conjugated anti-sheep IgG and Alexa 488-conjugated anti-mouse IgG (1:1000; Molecular Probes).

*Live cell imaging of RNA granules.*

Sixteen hours after transfection, YFP-Dead Box 3 expressing neurons were imaged with an upright laser scanning confocal microscope (Olympus BX51W1 and BioRad MRC-600) and a long-range water-immersion objective (60x/0.90). Transfected cells were transferred to an opened perfusion chamber and maintained submerged at 35°C into oxygenated (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) physiologic ACSF buffer (NaCl 124 mM, KCl 5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25mM, D-Glucose 10 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 26 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM and Trolox 0,05 mM) or depolarizing buffer (ACSF supplemented with 45 mM KCl) for never longer than 50 min, perfused at 2 ml/min. Images were acquired every 30s.

*Purification of mRNA and RT-PCR*

RNA was purified using the RNAqueous-4PCR kit (Ambion, Austin, TX) according to the protocol provided by the manufacturer and converted to cDNA using Superscript. Specific forward primers and reverse primers were generated to the 3'-UTR of  $\beta$ - and  $\gamma$ -actin, dendrin, glucose-6-phosphatase and CaMKII $\alpha$ . The template was titrated until amplification was linear (i.e. 2-fold more template led to 2-fold more amplified product). Dilutions of cDNA in this range were then amplified for 35 cycles, run on agarose gels and stained with ethidium bromide. Images of gels were quantified with NIH Image. For each fraction (e.g. E18 brain, CCV and RNA granule), a value was calculated based on the density of the band/ml of template added. The average value of this number over the three most linear dilutions was used for each fraction. For each fraction the value for  $\beta$ -actin was standardized to that of  $\gamma$ -actin (i.e. the value for  $\beta$ -actin was divided by the value for  $\gamma$ -actin). Finally, the standardized value of  $\beta$ -actin for CCV and RNA granules were divided by the standardized value of  $\beta$ -actin from the E18 brain extract to determine the fold-enrichment of  $\beta$ -actin mRNA compared to  $\gamma$ -actin mRNA during the purification.

## Results

### *Purification of putative RNA Granules*

This work initiated from a comparison of purified clathrin-coated vesicles (CCVs) from either embryonic E18 or adult brains. Examination of Coomassie stained gels of these two preparations identified a number of bands that were enriched in E18 brains (Fig. 1B). These bands were isolated and sequenced using tandem-mass spectrophotometry. They consisted of ribosomal proteins and of RNA-binding proteins including hnRNP A1, A2, SYNCRIP and IMP-2, the rat homologue of ZCBP. To

investigate the possibility that these proteins were from a source distinct from CCVs, we performed electron microscopy on these preparations. The preparation from E18 brain contained a large number of structures that resembled amorphous collections of ribosomes, similar to what had earlier been described as RNA granules in brains (12,14,27)(Fig. 1C). The size (100-300 nM) and number of ribosomes per aggregate (20-100) match other characterization of these granules (27). These collections of ribosomes observed in the EM pictures did not resemble polyribosomes (beads on a string), although there are few defining features that are known to differentiate between polyribosomes and RNA granules other than size. The essentially identical protocol used on adult brain homogenates or liver preparations contained 80-90% clathrin-coated vesicles (21,23), and in these preparations we did not detect any amorphous collections of ribosomes. The presence of both mRNA-binding proteins involved in transport and ribosomal proteins suggest that in E18 brain this preparation may be enriched in an RNA granule. The morphology of the EM structures observed in this preparation is consistent with this hypothesis.

To further purify this putative RNA granule preparation from the CCVs and eliminate any possible polyribosomes, we used a 20-50% sucrose density gradient centrifugation and followed the RNA-binding protein fraction with antibodies to SYNCRIP. It has been demonstrated that RNA granules are separated from polyribosomes by this procedure (14). Western blotting analysis of each fraction of the gradient and of the pellet showed approximately 18 +/- 3 % (SEM, n=4 preparations) of the SYNCRIP immunoreactivity in the pellet (Fig. 1D). Similar results were seen with other antibodies to RNA-binding proteins (data not shown), consistent with the sedimentation of RNA granules. Quantitative EM analysis (Fig. 1E) of the pellet from



this sucrose gradient revealed that  $47\% \pm 2\%$  of the area had structures that resembled amorphous collections of ribosomes (See inset of Fig. 1E),  $45 \pm 2\%$  CCVs and  $7 \pm 1\%$  of other profiles; S.E.M;  $n = 20$  pictures, quantification by area). These experiments strongly suggest that the collections of ribosomes are not polysomes.

*Transported mRNAs enrich in the putative RNA granule fraction*

If the pellet is indeed enriched in putative RNA granules, it should also be enriched in mRNAs undergoing transport. While there are a number of mRNAs such as those coding for dendrin, MAP-2 and CaMKII $\alpha$  that are enriched in dendrites of adult brain, few of these are known to be transported in developing brain. An exception is the mRNA for b-actin that is transported both in axons and dendrites of developing neurons (11,18,19). This mRNA was also shown to co-localize with RNA granules (12). To determine if b-actin mRNA is enriched in the purified RNA granules, we compared RNA levels in homogenates from E18 brain, in the CCV fraction and in the pellet after sedimentation through the sucrose gradient (RNA granule). b-actin mRNA levels were determined in these fractions using semi-quantitative RT-PCR, normalizing its expression to that of g-actin mRNA, a non-transported mRNA (11). Much less template was needed to amplify b-actin mRNA from the RNA granule fraction than from the starting material, while there was no difference in the amount of template required to amplify gamma-actin (Fig. 2A-B). Thus, b-actin mRNA is enriched in the purified granule preparation compared to a non-transported mRNA g-actin (Fig. 2A-B). We also examined a number of other mRNAs in the CCV fraction including those coding for CaMKII $\alpha$ , dendrin, and glucose-6-phosphate. mRNA encoding dendrin was partially enriched in the CCV fraction (2-fold relative to g-actin), while mRNA encoding

glucose-6-phosphate showed a profile similar to mRNA for g-actin. The relative level of mRNA for CaMKII $\alpha$  was decreased in the CCV fraction (5-fold less than gamma actin), perhaps due to the fact that at E18 very little CaMKII $\alpha$  mRNA is expressed in neurons.

#### *Final purification of the putative RNA granules*

To generate the most enriched fraction with the least amount of contaminants, we further fractionated the pellet of the first sucrose gradient (RNA granule in Fig. 1A) on a second 20-50% sucrose gradient in the presence of EDTA. We noticed that under these conditions RNA granules components migrated slower into the gradient than did the CCVs. Indeed, Coomassie staining and Western blotting (Fig. 3A) of the final fractionation demonstrated a peak of several RNA-binding proteins in fractions 9 and 10 with good separation from the peak of CCVs in fractions 3 and 4. It is interesting to note that protein bands that peak in fractions 9 and 10 range from 10 to 500 kDa. The concentration of proteins of such variable size is consistent with the idea that they are associated in a large molecular mass complex.

#### *Abundant Components of the RNA Granule*

Altogether, our experiments to this point were consistent with the possibility that we had isolated a putative RNA granule, it was difficult to definitively identify the structure as an RNA granule since there is no defining feature for this structure. Therefore, we decided first to identify the abundant protein components of this fraction using tandem MS, and then characterize the identified proteins as components of RNA granules in neurons. Their presence in processes in the form of puncta, their co-localization in common structures with ribosomes, the co-localization of mRNA and

their movement in dendrites would be further proofs for our isolation of an RNA granule.

Fraction 10 from the final purification (Fig. 3A) was used to identify the abundant protein components of the RNA granule fraction. In total, using tandem MS, we identified 205 proteins (Supplementary Tables S1-5). Approximately 80% of the proteins were ribosomal proteins or ribosome-associated proteins, RNA-binding proteins and cytoskeletal proteins, consistent with a relatively pure preparation of putative RNA granules (Fig. 3B). Approximately 20% of the peptides identified were from CCV components, as expected from our EM studies. The proteome of the CCV having recently been described (23), it is relatively easy to separate these proteins from the RNA granule proteins. Importantly, there were very few known contaminants: no mitochondrial proteins and no obvious nuclear contaminants (i.e. abundant histones, splicing factors, lamins) were observed. Two proteins from the ER (BIP and an N-acetyltransferase) were observed.

The largest percentage of peptides in the proteomics derived from the ribosome (Fig. 3B), consistent with the appearance of the granule as a collection of ribosomes in EM (Fig. 1C,E). The large number of RNA-binding proteins identified (46, see Supplementary Table S2) attest to the fact that these structures are not just pure ribosomes, but also contain mRNA particles. Notably, a number of these have been previously demonstrated to be present in transporting RNA structures in the brain (Table 1; top). There are also a number of RNA-binding proteins that were identified that have never been associated with transporting structures (Table 1; bottom). A large number of cytoskeletal components, including dynein and associated proteins were identified, as might be expected for a transporting organelle. It should be noted that some of the

cytoskeletal components (especially actin and tubulin) are also present on CCVs from adult brain (supplementary table S3; (23)). A number of novel proteins that were previously identified only as open reading frames (Supplementary Table 4) were also identified in the granule fraction.

The ribosome is a good indicator of the completeness of the proteomics since its composition is well defined. We isolated 61 out of 64 total ribosomal proteins over 10 kD (proteins under 10 kD were probably run off the gel), demonstrating the relative completeness of our analysis, but also indicating that proteins that are undoubtedly present in our subcellular fraction were missed in the analysis. Two of the known RNA-binding proteins involved in transport were missing in our proteomics, FMRP and Pur a/b (16,28,29). The lack of FMRP is especially surprising since CYFIP, a known FMRP partner (30), was identified in the proteomics. To determine if these proteins were indeed present in the granule fraction, we compared levels of FMRP and Pur a/b to several proteomically-identified proteins in Western blotting of E18 brain homogenate, the CCV fraction and the RNA granule (Fig. 3C). Pur a/b and FMRP were enriched to the same extent as other proteomically-identified proteins suggesting the lack of peptides for these proteins was due to technical reasons, perhaps due to their presence in bands with abundant CCV components such as adaptins, poor tryptic cleavage, or other unknown factors.

#### *Localization of Proteins to Granules using Immuno-EM*

To validate the assumption that the EM profiles that resemble amorphous collections of ribosomes are the source of the proteomically-identified proteins, we used

immuno-EM to assign specific proteins to CCVs, ribosome aggregates, or other components of the CCV fraction. The CCV fraction was incubated with primary antibodies, filtered onto nitrocellulose membranes, and then processed using secondary antibodies. It should be noted that since CCVs can pass through the filter used, the abundance of CCVs relative to ribosome aggregates and large membranous contaminants was reduced compared to that seen before filtration. The procedure also appeared to fragment the ribosome aggregates, as the collections of ribosomes were generally smaller after the procedure than seen earlier (i.e. Figure 1C). As controls, antibodies to the ribosomal protein S6 (for putative RNA granules) and to the protein a-adaptin (for CCVs) were used (Fig. 4A, G). All micrographs were quantitated using density of gold/structure as well as % of gold/structure. As expected, the ribosomal protein S6 was enriched in granule-like structures (Fig. 4A; quantitated in I). Similarly, the RNA-binding proteins SYNCRIP, hnRNP A1 and YB-1 were enriched on structures resembling RNA granules (Fig. 4B, C, E; quantitated in I). RACK was also highly associated with these structures (Fig. 4F), confirming earlier reports suggesting that RACK is a ribosome-associated protein in developing neurons (31) and that RACK and its homologue in yeast are associated with ribosomes (32,33). Dynein showed the same degree of enrichment on the putative RNA granules as the RNA-binding proteins (Fig. 4 D, quantitated in I), demonstrating that dynein is a component of these structures. This result validates the identification of other members of the dynein complex (dynactin, centractin, dynamitin) as abundant components of the RNA granules (Supplementary Table S3). This is consistent with evidence for dynein-dependent transport of RNA in other systems (34-36). As expected, a-adaptin was enriched in the CCVs (Fig. 4G) whereas protein A was not enriched in either structure (Fig. 4H). These experiments

show that several of the proteomically-identified proteins are associated with ribosome aggregates, supporting the possibility that they are components of RNA granules.

*Proteomically-identified proteins form puncta in dendrites of hippocampal neurons*

To further characterize the putative RNA granule preparation, we expressed CFP- or YFP-tagged versions of seven of the proteomically-identified proteins in hippocampal neurons. We chose a number of proteins that had not previously been shown to be part of RNA granules at the time of this analysis and that yielded relatively large numbers of peptides during tandem MS analysis, including DEAD box 3, SYNCRIP, hnRNP C, G3BP1, ELAV-like 4, IEB2, and CGI-99 (Fig. 5A). We used a relatively weak promoter (RSV) and looked early after transfection (16-20 h) to minimize effects of overexpression. We used hippocampal cultures that were still in a growth phase (4-5 DIV) to match the developmental state from which the granules were isolated (E18). Whereas YFP (Fig. 5B) or CFP (data not shown) were completely diffuse, the tagged proteins revealed strong staining in cell bodies as well as prominent puncta in neurites (Fig 5D-Q). YFP-DEAD box 3 showed the most neuritic puncta in dendrites. Most of the other expressed proteins showed clear nuclear staining as well. One of them, hnRNP C, was mainly nuclear (Fig. 5 N,O), although in some neurons there were neuritic puncta visible after over-exposure of the picture (see inset in Fig. 5 N, O).

To extend these results to the endogenous proteins, we raised antibodies to DEAD Box 3 and to CGI-99. These antibodies each recognized a single band after Western blotting of brain extracts and this band was greatly enriched in the CCV and RNA granule fractions (Fig 6 A-C). When used for immunocytochemistry, puncta were observed in cell body (Fig. 6, D, H) and neurites (Fig. 6, E, I) with the immune sera for

each antibody, but not with the preimmune sera (Fig. 6 F, G, J, K). Thus, endogenous DEAD Box 3 and CGI-99 are also found as puncta in neurites of hippocampal neurons.

*Proteomically-identified proteins co-localize in puncta*

To determine whether proteomically-identified proteins are components of common structures/puncta, CFP- or YFP-tagged-proteins were co-expressed in hippocampal neurons and their localization was observed by confocal microscopy. YFP-DEAD Box 3 puncta contained most of the other proteomically identified proteins, although the levels of co-localization varied with different proteins (Fig. 7 A-F; Table 2). The lowest level of co-localization was observed with DEAD box 3 and CGI-99. However, CGI-99 strongly co-localized with several of the other proteomically-identified proteins (Fig. 7 G-J; Table 2). The DEAD box 3 puncta showed only partial co-localization with Staufen2 (Fig. 8 G-I; Table 2), a well characterized RNA-binding protein involved in RNA transport. CGI-99 also showed only partial co-localization with Staufen 2 (Table 2; data not shown). Our results show that several proteomically-identified proteins are components of the same puncta, consistent with the possibility that they form RNA granules. In addition, these experiments indicate that there are multiple types of RNA transport structures with overlapping subsets of the identified proteins.

*Dead-Box 3 co-localizes with RNA and ribosome-containing structures in processes*

To determine if these puncta resemble the structures we had isolated and form RNA granules, we determined whether proteomically-identified proteins co-localize with ribosomes in processes of hippocampal neurons and whether they contain RNA.

For the first task, an antibody to P0, a protein component of the large ribosomal subunit, was used as a marker for ribosomes. We focused on DEAD Box 3 as it is the most punctate of the expressed proteins and is co-localized with most of the other proteomically-identified proteins. Expressed DEAD box 3 protein co-localized with P0 (Fig 8A-C) although this co-localization was not complete. There were clearly subsets of DEAD Box 3 puncta that did not contain P0 suggesting that the formation of RNA granule is dynamic and/or that DEAD box 3 play multiple roles in neurons. Similarly, subsets of P0 puncta did not contain DEAD Box 3 (Table 2), consistent with the heterogeneity of the RNA granule population. The DEAD box 3 granules also co-localized with S6, a protein of the small ribosomal subunit (data not shown). Using the anti-DEAD Box 3 antibody, we found that the endogenous DEAD-Box 3 protein also co-localized with P0, although to a lesser extent than did the expressed protein (Fig 8 D-F; Table 2).

To determine whether DEAD box 3 puncta also contained poly(A) mRNA, hippocampal neurons were transfected with YFP-DEAD Box 3 and labelled with poly(dT) probe using FISH. As shown in Figure 8 (J-L), both signals co-localized demonstrating that DEAD Box 3-containing puncta carry poly(A) mRNA. The presence of puncta containing DEAD Box 3, ribosomes and poly(A) mRNA is strong evidence that this protein is a component of RNA granules. The co-localization of DEAD Box 3 with the other proteomically-identified proteins in these puncta argue strongly that the structures used for the identification of these proteins were indeed RNA granules.



---

*DEAD BOX 3 Puncta Move in Dendrites but Are Not Affected by Activity*

RNA transport structures have been characterized extensively using their speed and direction of transport (13,16,19,37-39). Using YFP-tagged DEAD box 3, we imaged granule movement in living dendrites of cultured hippocampal neurons. As described for RNA granules, some DEAD box 3 granules moved in an oscillatory manner and others moved in a single direction, anterogradely or retrogradely (Fig. 9A-C). The speed of the YFP-DEAD box 3 granules (0.03-0.1 m/sec; Fig. 8D) was similar to that measured for Staufen1 granules (13) and CaMKII $\alpha$  mRNA containing granules (39), but slower than that measured for granules containing ZCBP (19). Similar to other measurement of RNA granules (19,39), most of the puncta were nevertheless immobile. To test a putative regulation in the transport of these granules by cell activity, we compared the movement and speed of the granules when transfected hippocampal neurons were treated or not with KCl. KCl depolarizes neurons and mimics neuronal cell activity. Activity induced by KCl did not change the overall speed of the granules (Fig. 9D) nor the percentage of granules that moved in an anterograde direction (Fig. 9E).

**Discussion***Proteome of a putative RNA granule from developing brain*

Proteomics is usually thought of as a tool to use on highly purified fractions to determine the protein components of that fraction. Indeed, this strategy has been used effectively to determine novel protein constituents of well-characterized subcellular compartments such as CCVs, phagosomes, the nuclear pore and many other aspects of cellular machinery (40,41). However, in this case we are using proteomics to gain additional

tools for exploring the hypothesis that we had successfully isolated an RNA granule from E18 brains. Identification of proteins allowed us to characterize putative RNA granule components in hippocampal neurons at the cellular and molecular levels. Although highly enriched in structures described as amorphous collections of ribosomes, the fraction used for the proteomic analysis was not completely pure and contained another type of structures, the CCVs. Since the proteome of the CCV is well-known, we could then determine the components of the amorphous collection of ribosomes and see if our results were consistent with the purification of an RNA granule. The proteomics eliminated several alternative possibilities for the structures due to the absence of nuclear matrix or spliceosome components. This was important since hnRNPs, the most abundant class of RNA-binding proteins found in the proteomics are also components of nuclear granules involved in splicing. Moreover, the abundance of ribosomal proteins confirmed that the structures we have isolated are consistent with the previous descriptions of RNA granules (12,14,27). The lack of markers for other abundant subcellular compartments such as ER and mitochondria demonstrated the relative enrichment of this fraction over an extract. The abundance of RNA-binding proteins already implicated in transport (hnRNP-A1, A2 and ZCBP) and of the transport motor dynein strongly supports the identification of this structure as an RNA granule. Finally, using a subset of the proteomically identified proteins, we demonstrated that these proteins are present in the structures putatively identified in the EM as RNA granules (Fig. 4). All of these findings are consistent with the purification of an RNA granule.

Our confidence that these structures were indeed RNA granules was increased when several of the proteomically-identified proteins were characterized in neurons. Their presence in neurites in the form of puncta, their co-localization in structures that also

contain ribosomes and poly(A) RNA and their movement in processes at the same speed as previous studies on RNA granules all add strong support to the assumption that we have isolated and studied an RNA granule population. Other support come from the comparison of our proteome with other published analyses of RNA granules. First, proteins initially not implicated in RNA transport before our proteomic analysis was done were subsequently implicated in RNA transport in neurons. This includes specific identifications such as SYNCRIP (42) and RNAGranule105 (43). Second, comparison with an RNA granule purified from adult brain on the basis of its association with the motor protein kinesin KIF5a (16) shows that many components are shared by the two preparations, including hnRNPs A0, A1, A/B, D and U, SYNCRIP, nucleolin, FMRP, Pur  $\alpha/\beta$ , DEAD box 1, 3 and 5, Staufen, EF 1-a and CGI-99. Several of the components were shown to be required for transport of CaMKII $\alpha$  mRNA in dendrites (16). This overlap serves as a validation for both screens due to the independent identification of a number of proteins not previously involved in RNA transport. However there were also some differences in the compositions of these granules. The granules we have isolated from developing brain are greatly enriched in ribosomes, while the KIF5a-containing granules from adult brain appear to lack a ribosomal component. Accordingly, our EM studies did not detect amorphous collections of ribosomes in CCV preparations from adult brains (data not shown) suggesting that the RNA granules that we have identified are greatly enriched during development. However, it does not exclude the presence of ribosome-associated RNA granules in adult brains since other studies, using different purification protocols, identify RNA granules consisting of ribosomes from adult brain (27). It should be noted that despite the lack of detection of RNA granules using

ultrastructural techniques, tandem MS results still identified some of the RNA granule proteins in adult CCV preparations (23).

Other differences were noted in the composition of our granule preparation and the KIF5a preparation (16). The granules that we isolated were enriched in proteins of the dynein complex, while the granule isolated by Kanai and colleagues (16) was based on its association with kinesin. The granule we isolated contains the actin-binding protein ZCBP, consistent with the enrichment for b-actin mRNA in the preparation and a number of additional RNA-binding proteins not identified in the KIF5a granule including IEBP2 and 3, ELAVs, G3BP1 and 2. On the other hand, CaMKII $\alpha$  mRNA was shown to be a major RNA associated with the KIF5a granules. This RNA was not enriched in our granules. We hypothesize that the granules isolated from developing brain may be more involved in neurite growth, while the granules isolated from adult brains are more devoted to transporting dendritic specific messages like CaMKII $\alpha$  mRNA to the dendrites. This may be why neuronal activity mimicked by KCl did not affect the speed or direction of the granules, since neurons at this stage are not highly electrically active. This is in contrast to granules that transport CaMKII $\alpha$  mRNA that are regulated by activity (39). Since we showed that the granules form a heterogenous population, we do not exclude the possibility that other RNA granules may be regulated by neuronal activity in developing brains. Indeed, ZCBP recruitment and movement in dendrites of cultured embryonic neurons was affected by KCl (19). Its transport is faster than that observed in our study, but it was observed at a later stage of neuronal culture (>14div) (19).

One alternative possibility for the structures that we have isolated is aggregates of translating polyribosomes. Many of the RNA-binding proteins that we have identified

are also seen when proteomes of translating ribosomes are examined, including many of the hnRNPs, DEAD box proteins and abundant RNA-binding proteins such as IEB2, 3 and G3BPs (31,44,45). One of the models for RNA transport is that RNAs are transported as aggregates of stalled polyribosomes that can be broken up into translating polyribosomes by activity. Thus, it would be difficult to distinguish between these two structures by proteomics. However, one argument against the presence of translating polyribosomes is the isolation of the ribosome aggregates only from developing brain and not from adult brain or other tissues. Since the purification conditions were identical to those used in E18 preparations, aggregated polyribosomes should also have been isolated from these preparations as well if aggregation of polysomes was simply an artefact of the purification strategy. In addition, one of the proteins identified in our proteome, RNAgranule105, has been proposed to separate from the RNA granule during the activation of the granule for translation.(43), consistent with the assumption that we have purified RNA granules and not polysomes. The enrichment for transported mRNAs but not general RNAs also argues strongly for a transport structure instead of simply aggregated polysomes.

#### *Multiple Types of mRNA granules*

The lack of complete co-localization for the proteins and/or markers we have tested suggests that there may be multiple types of mRNA granules. For example, DEAD Box 3 and CGI-99 mainly localized to distinct puncta. Moreover, neither of those two markers was highly co-localized with Staufen 2, another marker used for RNA granules. It is not clear at this point, whether there are indeed distinct types of granules, whether granules by their nature are heterogeneous depending on the specific mRNAs

that they contain, whether the composition of these granules is dynamic or whether these differences simply reflect technical issues in our localization studies.

DEAD box 3 is an RNA helicase that has been implicated in both nuclear export and translation initiation (46-48). DEAD box 3-containing puncta contain both the small and large ribosomal subunits, as well as poly(A) RNA and thus can be clearly designated as RNA granules. Its movement in dendrites confirm this possibility. Although both ribosomal subunits may be independently stored in the granules and only reassembled once localized, it is likely that they are transported in the granules as 80S ribosomes or polysomes. Therefore, how is the translation of their associated mRNA repressed? Regulation of translation in these granules is presumably at the stage of elongation, either by preventing initiation of elongation or by halting a translating step.

The identification in the proteomics of the TCP1 chaperone complex and NAC-a (supplementary Table 1) that are implicated in the stabilization of nascent proteins (49), is consistent with the latter hypothesis. There are a number of examples where mRNAs appear to be blocked in elongation at the polysome stage (50-52) and possible mechanisms could be through microRNAs, interaction between 5' and 3' binding proteins, or similar mechanisms as those involved in translocating mRNA/ribosomes to the ER. Indeed the correct repression of Oskar mRNA in *Drosophila* oogenesis depends on proteins important for stabilization of nascent chains (50). Interestingly, many of these proteins that we identified (e.g. G3BP1, ELAVs, PA1-1, PTB and others) are also associated with polyribosomes isolated from brains (31,44), consistent with a model where transport at this stage is in the form of stalled polyribosomes.

---

**Conclusion**

We have generated a biochemical fraction from developing brain enriched for a putative RNA granule. The abundant components of this fraction have been identified suggesting a structure made up of ribosomes, RNA-binding proteins and RNAs attached to the cytoskeleton. We would suggest that the granules we have isolated, enriched in  $\beta$ -actin mRNA, are involved in growth while the KIF5a granule is involved in constitutive transport of dendritic mRNAs such as CaMKII $\alpha$ . Elucidating how these distinct granules are regulated and transported will allow for a detailed understanding of the specificity and regulation of RNA transport in neurons.

---

## References

---

1. Gingras, A. C., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annual Rev Biochem* 68, 913-963
2. Walter, P., and Johnson, A. E. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annual Rev Cell Biol* 10, 87-119
3. Jansen, R. P. (2001). mRNA localization: message on the move. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2, 247-256
4. Kiebler, M. A., and DesGroseillers, L. (2000). Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron* 25, 19-28
5. Bassell, G. J., Oleynikov, Y., and Singer, R. H. (1999). The travels of mRNAs through all cells large and small. *FASEB J* 13, 447-454
6. Lasko, P. (1999). RNA sorting in *Drosophila* oocytes and embryos. *FASEB J* 13, 421-433
7. Schuman, E. M. (1999). mRNA trafficking and local protein synthesis at the synapse. *Neuron* 23, 645-648
8. Steward, O., Wallace, C. S., Lyford, G. L., and Worley, P. F. (1998). Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* 21, 741-751
9. Brittis, P. A., Lu, Q., and Flanagan, J. G. (2002). Axonal protein synthesis provides a mechanism for localized regulation at an intermediate target. *Cell* 110, 223-235
10. Crino, P. B., and Eberwine, J. (1996). Molecular characterization of the dendritic growth cone: regulated mRNA transport and local protein synthesis. *Neuron* 17, 1173-1187
11. 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, 251-265
12. Knowles, R. B., Sabry, J. H., Martone, M. E., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Bassell, G. J., and Kosik, K. S. (1996). Translocation of RNA granules in living neurons. *J Neurosci* 16, 7812-7820



13. 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, 2945-2953
14. Krichevsky, A. M., and Kosik, K. S. (2001). Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron* 32, 683-696
15. Tang, S. J., Meulemans, D., Vazquez, L., Colaco, N., and Schuman, E. (2001). A role for a rat homolog of staufen in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron* 32, 463-475
16. Kanai, Y., Dohmae, N., and Hirokawa, N. (2004). Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 43, 513-525
17. 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
18. Gu, W., Pan, F., Zhang, H., Bassell, G. J., and Singer, R. H. (2002). A predominantly nuclear protein affecting cytoplasmic localization of beta-actin mRNA in fibroblasts and neurons. *J Cell Biol.* 156, 41-51
19. Tiruchinapalli, D. M., Oleynikov, Y., Kelic, S., Shenoy, S. M., Hartley, A., Stanton, P. K., Singer, R. H., and Bassell, G. J. (2003). Activity-dependent trafficking and dynamic localization of zipcode binding protein 1 and beta-actin mRNA in dendrites and spines of hippocampal neurons. *J Neurosci.* 23, 3251-3261
20. Shan, J., Munro, T. P., Barbarese, E., Carson, J. H., and Smith, R. (2003). A molecular mechanism for mRNA trafficking in neuronal dendrites. *J Neurosci* 23, 8859-8866
21. Maycox, P. R., Link, E., Reetz, A., Morris, S. A., and Jahn, R. (1992). Clathrin-coated vesicles in nervous tissue are involved primarily in synaptic vesicle recycling. *J Cell Biol* 118, 1379-1388
22. Wasiak, S., Legendre-Guillemin, V., Puertollano, R., Blondeau, F., Girard, M., de Heuvel, E., Boismenu, D., Bell, A. W., Bonifacino, J. S., and McPherson, P. S. (2002). Enthoprotin: a novel clathrin-associated protein identified through subcellular proteomics. *J Cell Biol* 158, 855-862

23. Blondeau, F., Ritter, B., Allaire, P. D., Wasiak, S., Girard, M., Hussain, N. K., Angers, A., Legendre-Guillemain, V., Roy, L., Boismenu, D., Kearney, R. E., Bell, A. W., M., B. J. J., and McPherson, P. S. (2004). Tandem mass spectrometry analysis of brain clathrin-coated vesicles reveals their critical involvement in synaptic vesicle recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3833-8
24. Banker, G., and Goslin, K. (1988). Developments in neuronal cell culture. *Nature* 336, 185-186
25. Duchaine, T. F., Hemraj, I., Furic, L., Deitinghoff, A., Kiebler, M. A., and DesGroseillers, L. (2002). Stauf2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J Cell Sci* 115, 3285-3295
26. Kelm, R. J., Jr., Cogan, J. G., Elder, P. K., Strauch, A. R., and Getz, M. J. (1999). Molecular interactions between single-stranded DNA-binding proteins associated with an essential MCAT element in the mouse smooth muscle alpha-actin promoter. *J Biol Chem* 274, 14238-14245
27. Aschrafi, A., Cunningham, B. A., Edelman, G. M., and Vanderklish, P. W. (2005). The fragile X mental retardation protein and group I metabotropic glutamate receptors regulate levels of mRNA granules in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2180-2185
28. Ohashi, S., Kobayashi, S., Omori, A., Ohara, S., Omae, A., Muramatsu, T., Li, Y., and Anzai, K. (2000). The single-stranded DNA- and RNA-binding proteins pur alpha and pur beta link BC1 RNA to microtubules through binding to the dendrite-targeting RNA motifs. *J Neurochem* 75, 1781-1790
29. De Diego Otero, Y., Severijnen, L. A., van Cappellen, G., Schrier, M., Oostra, B., and Willemsen, R. (2002). Transport of fragile X mental retardation protein via granules in neurites of PC12 cells. *Mol Cell Biol* 22, 8332-8341
30. Schenck, A., Bardoni, B., Moro, A., Bagni, C., and Mandel, J. L. (2001). A highly conserved protein family interacting with the fragile X mental retardation protein (FMRP) and displaying selective interactions with FMRP-related proteins FXR1P and FXR2P. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8844-8849
31. Angenstein, F., Evans, A. M., Settlege, R. E., Moran, S. T., Ling, S. C., Klintsova, A. Y., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., and Greenough, W. T. (2002). A receptor for activated

- C kinase is part of messenger ribonucleoprotein complexes associated with polyA-mRNAs in neurons. *J Neurosci* 22, 8827-8837
32. Shor, B., Calaycay, J., Rushbrook, J., and McLeod, M. (2003). Cpc2/RACK1 Is a Ribosome-associated Protein That Promotes Efficient Translation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 278, 49119-49128
33. Ceci, M., Gaviraghi, C., Gorrini, C., Sala, L. A., Offenhauser, N., Marchisio, P. C., and Biffo, S. (2003). Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature* 426, 579-584
34. Wilkie, G. S., and Davis, I. (2001). *Drosophila* wingless and pair-rule transcripts localize apically by dynein-mediated transport of RNA particles. *Cell* 105, 209-219
35. Tekotte, H., and Davis, I. (2002). Intracellular mRNA localization: motors move messages. *Trends Genet* 18, 636-642
36. Huang, Y. S., Carson, J. H., Barbarese, E., and Richter, J. D. (2003). Facilitation of dendritic mRNA transport by CPEB. *Genes Dev* 17, 638-653
37. Bannai, H., Fukatsu, K., Mizutani, A., Natsume, T., Iemura, S. I., Ikegami, T., Inoue, T., and Mikoshiba, K. (2004). An RNA-interacting protein, SYNCRIP (hnRNP Q1/NSAP1) is a component of mRNA granule transported with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 mRNA in neuronal dendrites. *J Biol Chem*
38. 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, 261-275
39. Rook, M. S., Lu, M., and Kosik, K. S. (2000). CaMKII $\alpha$  3' untranslated region-directed mRNA translocation in living neurons: visualization by GFP linkage. *J Neurosci* 20, 6385-6393
40. Brunet, S., Thibault, P., Gagnon, E., Kearney, P., Bergeron, J. J., and Desjardins, M. (2003). Organelle proteomics: looking at less to see more. *Trends Cell Biol* 13, 629-638
41. Ritter, B., Blondeau, F., Denisov, A. Y., Gehring, K., and McPherson, P. S. (2004). Molecular mechanisms in clathrin-mediated membrane budding revealed through subcellular proteomics. *Biochem Soc Trans* 32, 769-773

42. Bannai, H., Fukatsu, K., Mizutani, A., Natsume, T., Iemura, S., Ikegami, T., Inoue, T., and Mikoshiba, K. (2004). An RNA-interacting protein, SYNCRIP (heterogeneous nuclear ribonuclear protein Q1/NSAP1) is a component of mRNA granule transported with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 mRNA in neuronal dendrites. *J Biol Chem* 279, 53427-53434
43. Shiina, N., Shinkura, K., and Tokunaga, M. (2005). A novel RNA-binding protein in neuronal RNA granules: regulatory machinery for local translation. *J Neurosci* 25, 4420-4434
44. Khandjian, E. W., Huot, M. E., Tremblay, S., Davidovic, L., Mazroui, R., and Bardoni, B. (2004). Biochemical evidence for the association of fragile X mental retardation protein with brain polyribosomal ribonucleoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13357-13362
45. Angenstein, F., Evans, A. M., Ling, S. C., Settlage, R. E., Ficarro, S., Carrero-Martinez, F. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., and Greenough, W. T. (2005). Proteomic characterization of messenger ribonucleoprotein complexes bound to nontranslated or translated poly(A) mRNAs in the rat cerebral cortex. *J Biol Chem* 280, 6496-6503
46. Chuang, R. Y., Weaver, P. L., Liu, Z., and Chang, T. H. (1997). Requirement of the DEAD-Box protein ded1p for messenger RNA translation. *Science*. 275, 1468-1471
47. Askjaer, P., Rosendahl, R., and Kjems, J. (2000). Nuclear export of the DEAD box An3 protein by CRM1 is coupled to An3 helicase activity. *J Biol Chem* 275, 11561-11568
48. Yedavalli, V. S., Neuveut, C., Chi, Y. H., Kleiman, L., and Jeang, K. T. (2004). Requirement of DDX3 DEAD Box RNA Helicase for HIV-1 Rev-RRE Export Function. *Cell* 119, 381-392
49. McCallum, C. D., Do, H., Johnson, A. E., and Frydman, J. (2000). The Interaction of the Chaperonin Tailless Complex Polypeptide 1 (TCP1) Ring Complex (TRiC) with Ribosome-bound Nascent Chains Examined Using Photo-Cross-linking. *J. Cell Biol.* 149, 591-602
50. Braat, A. K., Yan, N., Arn, E., Harrison, D., and Macdonald, P. M. (2004). Localization-dependent oskar protein accumulation; control after the initiation of translation. *Dev Cell* 7, 125-131

51. Ruegsegger, U., Leber, J. H., and Walter, P. (2001). Block of HAC1 mRNA translation by long-range base pairing is released by cytoplasmic splicing upon induction of the unfolded protein response. *Cell* 107, 103-114
52. Clark, I. E., Wyckoff, D., and Gavis, E. R. (2000). Synthesis of the posterior determinant Nanos is spatially restricted by a novel cotranslational regulatory mechanism. *Curr Biol* 10, 1311-1314
53. Mizutani, A., Fukuda, M., Iбата, K., Shiraishi, Y., and Mikoshiba, K. (2000). SYNCRIP, a cytoplasmic counterpart of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R, interacts with ubiquitous synaptotagmin isoforms. *J Biol Chem* 275, 9823-9831
54. Lau, P. P., Chang, B. H., and Chan, L. (2001). Two-hybrid cloning identifies an RNA-binding protein, GRY-RBP, as a component of apobec-1 editosome. *Biochem Biophys Res Comm* 282, 977-983
55. Gallouzi, I. E., Parker, F., Chebli, K., Maurier, F., Labourier, E., Barlat, I., Capony, J. P., Tocque, B., and Tazi, J. (1998). A novel phosphorylation-dependent RNase activity of GAP-SH3 binding protein: a potential link between signal transduction and RNA stability. *Mol Cell Biol* 18, 3956-3965
56. Good, P. J. (1995). A conserved family of elav-like genes in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4557-4561
57. Good, P. J. (1997). The role of elav-like genes, a conserved family encoding RNA-binding proteins, in growth and development. *Semin Cell Dev Biol* 8, 577-584
58. Kao, P. N., Chen, L., Brock, G., Ng, J., Kenny, J., Smith, A. J., and Corthesy, B. (1994). Cloning and expression of cyclosporin A- and FK506-sensitive nuclear factor of activated T-cells: NF45 and NF90. *J Biol Chem* 269, 20691-20699
59. Langland, J. O., Kao, P. N., and Jacobs, B. L. (1999). Nuclear factor-90 of activated T-cells: A double-stranded RNA-binding protein and substrate for the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *Biochem* 38, 6361-6368
60. Nakagawa, T. Y., Swanson, M. S., Wold, B. J., and Dreyfuss, G. (1986). Molecular cloning of cDNA for the nuclear ribonucleoprotein particle C proteins: a conserved gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 2007-2011

---

61. Huarte, M., Sanz-Ezquerro, J. J., Roncal, F., Ortin, J., and Nieto, A. (2001). PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. *J Virol* 75, 8597-8604

---

## Figure Legends

---

**Figure 1.** Isolation of an enriched RNA granule fraction. A) Schematic for the purification of the RNA granule fraction; details are in experimental procedures. B) 100 mg of the CCV fraction from E18 and adult brains were separated on a 5-15% gradient SDS-PAGE gel and Coomassie stained. Bars represent bands excised from the E18 gel and pertinent proteins identified by mass spectrophometry are shown beside the bar. C) EM micrograph of the CCV fraction from E18 brain. The dark arrowhead points to a putative RNA granule and the clear arrowhead to a CCV. Scale bar is 100 nm. D) The CCV fraction was separated on a sucrose gradient prepared in 100 mM MES, pH 6.5, 1 mM EGTA and 0.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Buffer A). Fractions from the gradient were separated by SDS-PAGE (1=pellet and 12=top), transferred to nitrocellulose and processed for Western blot using antibodies against granule markers SYNCRIP and hnRNP R as well as a CCV marker, the clathrin heavy chain (CHC). E) EM micrograph of the pellet after sucrose gradient fractionation of the CCV fraction from E18 brains. Arrowheads point to putative RNA granules and arrows to CCVs; inset shows higher magnification of a putative RNA granule.

**Figure 2.** Enrichment of b-actin in the RNA granule fraction. A) RT-PCR reactions were performed using RNA purified from E18 brains, CCV fractions or isolated RNA granule fractions. Template cDNAs were serially diluted until a linear relationship between template amount and product amplification was observed. The range of template cDNA used for the four lanes from each fraction to obtain a linear

amplification (mL) is indicated. Note that much more template obtained from E18 brains was required for amplification of the b-actin cDNA compared to the g-actin cDNA, whereas similar amounts were needed for templates purified from the RNA granule fraction. (B) Quantification of three independent experiments as described in (A). The enrichment of each mRNA was calculated independently, based on E18 brain as a standard and then a ratio of the enrichments was calculated to determine differences between levels of b-actin and g-actin cDNA (see Methods for detailed calculations).

**Figure 3.** Proteomics of the RNA granule fraction. (A) The pellet from the first sucrose gradient run in buffer A (RNA granule) was resuspended in buffer A containing 30 mM EDTA and separated on a second gradient for 180 min (see Experimental Procedures). Proteins from all fractions were precipitated and separated by SDS-PAGE. Coomassie staining (upper panel) revealed a series of protein bands enriched in fractions 9 and 10. The dot marks the lane used for proteomic analysis. Positions of the clathrin heavy chain (CHC) and molecular weight markers are indicated. Immunoblots of the final fractionation (lower panel) against granule markers revealed enrichment of RNA-binding proteins in fraction 10. B) Peptide counts for each class of proteins are shown in a pie chart. C) Immunoblots for proteins identified in the proteomics and two proteins in RNA granules that were not identified in the proteomics (FMRP and Pur alpha/ $\beta$ ) demonstrated their enrichment in the RNA granule fraction. 10 mg of H (E18 homogenate), CCV (CCV pellet), RG (RNA granule)

**Figure 4.** Localization of selected proteins in crude CCV fractions using immuno-EM. (A-H) Granules are evident as clusters of round dots, while CCVs are obvious due to



their coats. Arrows point to gold particles. The antibody used is given underneath the EM plate. Protein A-gold alone was used as a control for rabbit polyclonal antibodies. The goat anti-mouse-gold secondary antibody showed no background (not shown). The scale bar represents 200 nm. (I) Quantitation of immuno-EM. Values are SEM of 10 to 30 EM micrographs from 1-3 different purifications.

**Figure 5.** Expression of tagged fusion proteins in rat hippocampal neurons. (A) Proteins were selected based on their abundance in the proteomics and their representation of a specific class. (B-Q) YFP- or CFP-tagged proteins were transfected into six-day hippocampal neuron cultures and then fixed the next day. Images were overexposed to visualize puncta in the processes. Inset in panels N and O show CFP-hnRNP C in neurites when overexposed. The scale bar represents 20 mm.

**Figure 6.** Expression of endogenous DEAD-Box 3 and CGI-99. A) Ten mg from steps of the purification of RNA granules were separated on SDS-polyacrylamide, transferred to nitrocellulose and stained with Ponceau Red (A) or immunoblotted with antibodies raised to DEAD box 3 (B) or CGI-99 (C). H; homogenate, P1, pellet 1, S2, supernatant 2, SGp (sucrose gradient pellet), SGs (sucrose gradient supernatant), CCV (clathrin coated vesicles), RG (RNA granules, pellet after 20-50% sucrose gradient in Buffer A. For schematic and definition of fractions see Fig. 1A and methods. The blots illustrate the enrichment of DEAD Box 3 and CGI-99 in CCVs and RNA granules as well as the labeling of only a single band. Immunostaining of day 6 hippocampal cultures illustrates cell body and neuritic staining with the DEAD Box 3 antibody (D, E), the CGI-99

antibody (H, I) and no staining when using the appropriate pre-immune serum (F-G, J-K) under the same conditions. The scale bar represents 20  $\mu$ m.

**Figure 7.** Co-localization of novel RNA granule components. (A-J) Cultured hippocampal neurons were co-transfected with YFP-DEAD Box 3 (A, C, E and a, c, e) and either CFP-ELAV-like 4 (B, b), CFP-IEB2 (D, d) or CFP-CGI-99 (F, f). Neurons were co-transfected with CFP-CGI-99 (G, g, I, i) and either YFP-G3BP1 (H, h) or YFP-IEB2 (I, i). Boxed regions are in green (YFP; panels a, c, e, h, j), cyan (CFP; panels b, d, f, g, i) to show co-localization in aqua, (merge). The scale bar represents 20  $\mu$ m.

**Figure 8.** Co-localization of DEAD Box 3 puncta with previously identified granule components. Cultured hippocampal neurons at 6 D.I.V expressing tagged-DEAD Box 3 (A, G, J) or immunostained with endogenous DEAD Box 3 (D) were stained with P0 (B, E), Stauf2 (H) or processed with FISH for poly(dT) (K). Blended images show co-localization in purple (merge; panels C, I) or yellow (merge; panels F, L). The scale bar represents 20  $\mu$ m.

**Figure 9.** Movement of YFP-tagged DEAD box 3 granules. (A) A 7 DIV hippocampal neuron transfected with YFP-DEAD box 3. Scale bar = 10  $\mu$ m. (B) Time-lapse movies of the two rectangular regions of interest indicated in (A). Example of granule movements for 270 s with 30 s intervals. (Top) Granules moving retrogradely (arrow) and anterogradely (arrowhead). (Bottom) A granule moving in an oscillatory fashion is also illustrated. Scale bar = 2  $\mu$ m. (C) Graph of the displacement over time for the three granules from panel (B). Maximal speeds are shown by vertical arrows. (D) Maximal

---

speed from 20 granules in ACSF (left; gray) or 45 mM KCl (right; white). (E)  
Histogram of granule movement from 5 different neurons in ACSF (black) or 45 mM  
KCl (white).

Table 1: RNA binding proteins identified in the proteomics.

The table consists of RNA-binding proteins identified in the proteomics divided by class (hnRNPs, DEAD Box helicases, ELAV-like proteins and other). The upper table lists proteins for which some published evidence implicates their presence in RNA granules (references given). The lower table includes RNA-binding proteins for which there is no published evidence indicating their presence in RNA granules. Bolded proteins represent those examined in this study, either by immuno-EM or localization of tagged proteins in hippocampal cultures.

#### RNA-Binding Proteins previously identified in RNA granules

|                            |   |
|----------------------------|---|
| hnRNPs                     | hnRNP D (Auf 1) (16)<br><b>hnRNP A1(16)</b><br>SYNCRIP/hnRNP Q1/Gry-RBP(16,42)<br>hnRNP R1 (16)<br>hnRNP A/B(16)<br>hnRNP A2/B1(20)<br>hnRNP A0(16),<br>hnRNP U(16) |
| DEAD Box Helicases         | <b>DEAD box 3(16)</b><br>DEAD box 1/DDX1(16)<br>DEAD box 5/17(16),  |
| Other RNA-Binding Proteins | ZCBP/IMP-2 (19)<br>Nucleolin(16)<br><b>Staufen2 (14,16)</b><br>RNA granule protein 105 (43)   |

#### RNA binding proteins not previously identified in RNA granules

|                    |   |
|--------------------|---|
| hnRNPs             | hnRNP K<br><b>hnRNP C</b><br>TAR DNA binding<br>hnRNP L<br>hnRNP X(E2)<br>hnRNP H<br>hnRNPA3<br>hnRNP M |
| DEAD Box Helicases | DEAD box 6<br>DEAD box 9<br>NORP1 (regulator of nonsense)<br>eIF4A<br>DEAD box BAT-1                    |

---

|                            |   |
|----------------------------|---|
| Other RNA-Binding Proteins | Zip code Binding Protein 2/MARTA1<br><b>G3BP1</b><br>Nucleophosmin<br>Activator of dsRNA kinase<br><b>interleukin enhancer binding factor 2</b><br>Interleukin enhancer binding factor 3<br>G3BP2<br>PTB<br>Poly-A Binding Protein<br>Matrin-3<br>PAI-1 RNA binding<br><b>Y box binding protein 1(mYB-1b)</b> |
| ELAV-like Proteins         | CYFIP2<br>ELAV-like 2 (Hu-B)<br><b>ELAV-like 4 (Hu-D)</b><br>ELAV-like 3 (Hu-C)<br>ETR-R3B  |

**Table 2 Co-localization of Proteomically Identified Proteins.**

For each co-localization, 5-25 cells were examined. The first column show the co-expressed marker; fluorescently tagged expressed protein for the all except for Poly(dT) where FISH was used and for Staufen 2 and P0 where antibodies were used. The second column shows percentage of expressed DEAD Box 3 puncta that contained staining for the other marker. The reciprocal column represents the percentage of puncta with the other marker that co-localized with expressed DEAD Box 3. The next two columns show simialr results for expressed CGI-99. ++, >60% co-localization; +, 30-60% co-localization; +/-, 10-30% co-localization; -, <10% co-localization; NA; not applicable, ND, not determined.

| Co-localized marker | Expressed CFP or YFP DEAD Box 3   | Expressed CFP or YFP DEAD Box 3 reciprocal | Expressed CFP CGI-99 | Expressed CFP CGI-99 reciprocal |
|---------------------|-----------------------------------|--|----------------------|---------------------------------|
| ELAV-like 4         | ++                                | ++   | +/-                  | +/-                             |
| G3BP1               | ++                                | ++   | ++                   | ++                              |
| hnRNP C             | +/-                               | ++   | ND                   | ND                              |
| IEB2                | ++                                | +  | ++                   | ++                              |
| CGI-99              | +/-                               | +/-  | NA                   | NA                              |
| Poly(dT) (FISH)     | ++                                | +  | ND                   | ND                              |
| Staufen2            | +/-                               | +/-  | +/-                  | +/-                             |
| DEAD Box 3          | NA                                | NA   | +/-                  | +/-                             |
| P0                  | + (+/- for endogenous DEAD Box 3) | +/- (+/- for endogenous DEAD Box 3)        | ND                   | ND                              |

## Proteomics of RNA granules in developing brain

TABLE S1

| Ribosomal Proteins | MW | Peptides | Gi       | Band App. MW | Peptide/MW ratio |
|--------------------|----|----------|----------|--------------|------------------|
| P0                 | 34 | 7        | 228176   | 36-39        | 0.21             |
| P2                 | 11 | 3        | 57676    | 14.5-15      | 0.27             |
| L4                 | 47 | 11       | 1363989  | 47-53        | 0.23             |
| L5                 | 35 | 17       | 13592051 | 35-36        | 0.49             |
| L6                 | 33 | 23       | 1490384  | 35-36        | 0.70             |
| L7                 | 30 | 14       | 27660180 | 31-32        | 0.47             |
| L7A                | 30 | 2        | 4506661  | 31-32        | 0.07             |
| L8                 | 28 | 4        | 27685597 | 33-34        | 0.14             |
| L9                 | 22 | 5        | 133033   | 28-29        | 0.23             |
| L10                | 25 | 7        | 2143959  | 28-29        | 0.28             |
| L10a               | 24 | 2        | 2143564  | 30-31        | 0.08             |
| L11                | 15 | 1        | 71106    | 19-21        | 0.07             |
| L12                | 18 | 4        | 34864776 | 19-21        | 0.22             |
| L13                | 24 | 3        | 510552   | 30-31        | 0.13             |
| L13a               | 24 | 3        | 27545438 | 28-29        | 0.13             |
| L14                | 24 | 5        | 2500360  | 29-30        | 0.21             |
| L15                | 24 | 9        | 12846287 | 29-30        | 0.38             |
| L17                | 21 | 5        | 132805   | 25-26        | 0.24             |
| L18                | 22 | 6        | 132733   | 26-28        | 0.27             |
| L18a               | 21 | 5        | 47059006 | 23-25        | 0.24             |
| L19                | 23 | 4        | 1154899  | 29-30        | 0.17             |
| L21                | 18 | 3        | 57686    | 25-26        | 0.17             |
| L22                | 15 | 2        | 13938046 | 14.5-15      | 0.13             |
| L23                | 15 | 1        | 27689189 | 14.5-15      | 0.07             |
| L23A               | 17 | 6        | 404015   | 19-21        | 0.35             |
| L24                | 18 | 1        | 11968096 | 23-25        | 0.06             |
| L26                | 17 | 3        | 27729769 | 19-21        | 0.18             |
| L27                | 16 | 6        | 11968094 | 15-17        | 0.38             |
| L27A               | 16 | 3        | 34858914 | 15-17        | 0.19             |
| L28                | 16 | 2        | 19353451 | 15-17        | 0.13             |
| L30                | 13 | 3        | 28189753 | ≤14          | 0.23             |
| L31                | 14 | 3        | 57115    | 14.5-15      | 0.21             |
| L32                | 16 | 4        | 71335    | 15-17        | 0.25             |
| L35A               | 12 | 2        | 71347    | ≤14          | 0.17             |
| L35                | 14 | 5        | 71362    | 15-17        | 0.34             |
| L36                | 12 | 2        | 730560   | ≤14          | 0.17             |
| SA                 | 33 | 14       | 466439   | 45-47        | 0.42             |

## Proteomics of RNA granules in developing brain

|                                       |     |    |          |         |      |
|---------------------------------------|-----|----|----------|---------|------|
| S2                                    | 27  | 16 | 2920831  | 33-34   | 0.59 |
| S3                                    | 29  | 21 | 70850    | 33-34   | 0.72 |
| S3A                                   | 30  | 15 | 7441114  | 34-35   | 0.50 |
| S4                                    | 27  | 14 | 70870    | 31-32   | 0.52 |
| S5                                    | 25  | 4  | 34854534 | 26-28   | 0.16 |
| S6                                    | 29  | 2  | 54010    | 33-34   | 0.07 |
| S7                                    | 22  | 7  | 49065830 | 26-28   | 0.32 |
| S8                                    | 22  | 12 | 57141    | 30-31   | 0.55 |
| S9                                    | 22  | 12 | 20178311 | 25-26   | 0.55 |
| S10                                   | 19  | 6  | 27669179 | 19-21   | 0.32 |
| S11                                   | 20  | 5  | 13592071 | 19-21   | 0.25 |
| S12                                   | 15  | 4  | 12805235 | ≤14     | 0.27 |
| S13                                   | 17  | 8  | 15029927 | 15-17   | 0.47 |
| S14                                   | 15  | 9  | 7440317  | 14.5-15 | 0.60 |
| S15a                                  | 15  | 1  | 16758882 | ≤14     | 0.07 |
| S16                                   | 16  | 4  | 200796   | 14.5-15 | 0.25 |
| S17                                   | 17  | 2  | 34877956 | 15-17   | 0.12 |
| S18                                   | 17  | 13 | 70965    | 15-17   | 0.76 |
| S19                                   | 15  | 4  | 133857   | 14.5-15 | 0.27 |
| S20                                   | 14  | 2  | 70925    | 14.5-15 | 0.14 |
| S23                                   | 16  | 4  | 543449   | ≤14     | 0.25 |
| S24                                   | 15  | 7  | 71038    | ≤14     | 0.47 |
| S25                                   | 14  | 9  | 71047    | ≤14     | 0.64 |
| S26                                   | 13  | 1  | 27666352 | 14.5-15 | 0.08 |
|                                       |     |    |          |         |      |
| <b>Translation Factors</b>            |     |    |          |         |      |
| eIF3 subunit 2                        | 36  | 5  | 6014677  | 39-41   | 0.14 |
| eIF3 subunit 3                        | 40  | 2  | 38454242 | 39-41   | 0.05 |
| eIF3 subunit 4                        | 35  | 2  | 23503073 | 47-53   | 0.06 |
| eIF3 subunit 5                        | 37  | 4  | 23396621 | 53-55   | 0.11 |
| eIF3 subunit 6                        | 52  | 4  | 34866211 | 47-53   | 0.08 |
| eIF3 subunit 7                        | 65  | 4  | 2992164  | 65-68   | 0.06 |
| eIF3 subunit 10                       | 167 | 22 | 4503509  | 165-175 | 0.13 |
| eIF3 subunit 11                       | 25  | 2  | 23396620 | 28-29   | 0.08 |
| eIF3 subunit 6<br>interacting protein | 67  | 12 | 7705433  | 60-65   | 0.18 |
|                                       |     |    |          |         |      |
| EF1 alpha                             | 50  | 23 | 34862972 | 47-53   | 0.46 |
| EF1 beta                              | 47  | 3  | 5902663  | 33-35   | 0.06 |
| EF1 gamma                             | 50  | 4  | 51261278 | 47-53   | 0.08 |
| EF1 delta                             | 31  | 2  | 27662108 | 39-41   | 0.06 |
|                                       |     |    |          |         |      |
| eEF2                                  | 96  | 4  | 56082    | 15-17   | 0.04 |



## Proteomics of RNA granules in developing brain

|  |     |    |          |         |      |
|--|-----|----|----------|---------|------|
| eIF5A                                  | 17  | 3  | 12847616 | 36-39   | 0.18 |
| eIF2A                                  | 64  | 2  | 15080229 | 97-100  | 0.03 |
| eIF2 alpha                             | 44  | 2  | 9506571  | 65-68   | 0.05 |
| GCN1                                   | 255 | 5  | 34872627 | 200-210 | 0.02 |
| <b>Ribosomal Chaperones</b>            |     |    |          |         |      |
| Chaperonin TCP1 alpha                  | 61  | 3  | 220915   | 68-70   | 0.05 |
| Chaperonin TCP1 beta                   | 57  | 2  | 6671700  | 55-60   | 0.04 |
| Chaperonin TCP1 gamma                  | 61  | 9  | 40018616 | 65-68   | 0.15 |
| Chaperonin TCP1 delta                  | 58  | 3  | 6753322  | 68-70   | 0.05 |
| Chaperonin TCP1 epsilon                | 51  | 3  | 603955   | 68-70   | 0.06 |
| Chaperonin TCP1 theta                  | 50  | 2  | 9988062  | 68-70   | 0.04 |
| Chaperonin TCP1 zeta                   | 58  | 6  | 5295933  | 68-70   | 0.10 |
| <b>NAC</b>                             |     |    |          |         |      |
| NAC alpha                              | 23  | 5  | 7513740  | 36-39   | 0.22 |
| <b>Other Ribosome-Associated</b>       |     |    |          |         |      |
| Receptor for Activated C Kinase (RACK) | 35  | 11 | 1083582  | 33-34   | 0.31 |

## Proteomics of RNA granules in developing brain

TABLE S2

| <b>a) RNA-binding proteins</b>        |     |          |          |                 |                       |
|---------------------------------------|-----|----------|----------|-----------------|-----------------------|
| <b>hnRNPs</b>                         |     |          |          |                 |                       |
|                                       | MW  | Peptides | Gi       | Bands<br>App MW | Peptides/<br>MW ratio |
| hnRNP D (Auf 1)                       | 38  | 16       | 9588096  | 45-47           | 0.42                  |
| hnRNP A1                              | 34  | 12       | 70819    | 36-39           | 0.35                  |
| SYNCRIP/hnRNP Q1/Gry-RBP              | 53  | 16       | 6576815  | 68-70           | 0.30                  |
| hnRNP A/B                             | 38  | 11       | 5052976  | 35-33           | 0.29                  |
| hnRNP A2/B1                           | 35  | 9        | 6647752  | 35-33           | 0.26                  |
| hnRNP K                               | 51  | 8        | 16923998 | 65-68           | 0.16                  |
| hnRNP A0                              | 31  | 5        | 12859567 | 36-39           | 0.16                  |
| hnRNP R                               | 71  | 9        | 28212266 | 84-90           | 0.13                  |
| hnRNP U                               | 89  | 8        | 284156   | 120-125         | 0.09                  |
| hnRNP C                               | 32  | 3        | 34869692 | 41-45           | 0.09                  |
| TAR DNA binding                       | 45  | 4        | 26350443 | 45-47           | 0.09                  |
| hnRNP L                               | 64  | 5        | 34855641 | 60-65           | 0.08                  |
| hnRNP X(E2)                           | 37  | 3        | 495128   | 39-41           | 0.08                  |
| hnRNP H                               | 49  | 3        | 26353116 | 53-55           | 0.06                  |
| hnRNPA3                               | 38  | 2        | 34327779 | 39-41           | 0.05                  |
| hnRNP M                               | 78  | 3        | 34862395 | 70-75           | 0.04                  |
| <b>DEAD Box Helicases</b>             |     |          |          |                 |                       |
| DEAD box 3                            | 73  | 17       | 6753620  | 80-82           | 0.23                  |
| DEAD box 1/DDX1                       | 83  | 10       | 26390412 | 84-90           | 0.12                  |
| DEAD box 6                            | 55  | 4        | 34879288 | 55-60           | 0.07                  |
| NORPI (regulator of nonsense)         | 124 | 6        | 11993646 | 125-140         | 0.05                  |
| DEAD box 5/17                         | 69  | 3        | 27690065 | 65-68           | 0.04                  |
| DEAD box 9                            | 142 | 4        | 34880497 | 140-160         | 0.03                  |
| eIF4A                                 | 46  | 1        | 34869306 | 47-53           | 0.02                  |
| DEAD box BAT-1                        | 49  | 1        | 19773876 | 53-55           | 0.02                  |
| <b>Other RNA-binding proteins</b>     |     |          |          |                 |                       |
| Poly-A Binding Protein                | 70  | 17       | 19705459 | 70-80           | 0.24                  |
| G3BP1                                 | 52  | 12       | 1902907  | 68-70           | 0.23                  |
| Zip code Binding protein/IMP-2        | 54  | 9        | 27464838 | 68-70           | 0.17                  |
| Nucleophosmin                         | 33  | 4        | 205786   | 39-41           | 0.12                  |
| PAI-1 RNA binding                     | 45  | 5        | 12836024 | 55-60           | 0.11                  |
| Activator of dsRNA kinase             | 35  | 4        | 12849779 | 35-36           | 0.11                  |
| nucleolin                             | 77  | 6        | 92559    | 110-115         | 0.08                  |
| interleukin enhancer binding factor 2 | 45  | 3        | 26346897 | 45-47           | 0.07                  |
| interleukin enhancer binding factor 3 | 98  | 7        | 6911241  | 90-97           | 0.07                  |
| G3BP2                                 | 54  | 3        | 34876568 | 65-68           | 0.06                  |
| PTB                                   | 75  | 4        | 17136071 | 100-110         | 0.05                  |
| RNA granule protein 105               | 130 | 3        | 2137361  | 110-115         | 0.04                  |
| CYFIP2                                | 147 | 5        | 19526988 | 125-140         | 0.03                  |
| Y box binding protein 1(mYB-1b)       | 59  | 2        | 9653686  | 47-53           | 0.03                  |

## Proteomics of RNA granules in developing brain

|                                 |    |                |          |         |      |
|---------------------------------|----|----------------|----------|---------|------|
| Matrin 3                        | 95 | 3              | 111944   | 120-125 | 0.03 |
| Zip code Binding Protein 2/MART | 74 | 2              | 19424312 | 84-90   | 0.03 |
| Staufen2                        | 62 | 1              | 19526444 | 68-70   | 0.02 |
|                                 |    |                |          |         |      |
| <b>ELAV-like proteins</b>       |    |                |          |         |      |
|                                 |    |                |          |         |      |
| ELAV-like 2 (Hu-B)              | 40 | 6 <sup>1</sup> | 6754264  | 39-41   | 0.15 |
| ELAV-like 4 (Hu-D)              | 43 | 5              | 2500580  | 39-41   | 0.12 |
| ELAV-like 3 (Hu-C)              | 40 | 2              | 27229298 | 36-39   | 0.05 |
| ETR-R3b                         | 52 | 2              | 3451291  | 53-55   | 0.04 |

1. ELAV-like 2 has only two peptides not shared with ELAV-like 4 so total unique ELAV peptides number 12.

## Proteomics of RNA granules in developing brain

TABLE S3

| <b>Cytoskeletal</b>           | MW  | Peptides | Gi       | Bands<br>App MW | Peptides/<br>MW ratio |
|-------------------------------|-----|----------|----------|-----------------|-----------------------|
| <b>Tubulin-related</b>        |     |          |          |                 |                       |
| Tubulin (beta) <sup>1</sup>   | 50  | 40       | 2665736  | 55-60           | 0.80                  |
| Tubulin (alpha) <sup>1</sup>  | 50  | 17       | 71574    | 55-60           | 0.34                  |
| <b>MAPs</b>                   |     |          |          |                 |                       |
| MAP 1A light chain 3          | 15  | 4        | 1083715  | 15-17           | 0.27                  |
| MAP-1B                        | 250 | 58       | 1083716  | ≥250            | 0.23                  |
| Doublecortin                  | 40  | 7        | 28913279 | 28-29           | 0.18                  |
| Doublecortin-kinase           | 85  | 9        | 20137987 | 84-90           | 0.11                  |
| MAP-2                         | 199 | 13       | 57620    | 240-250         | 0.07                  |
| Hook3                         | 84  | 2        | 14165274 | 84-90           | 0.02                  |
| <b>Dynein complex</b>         |     |          |          |                 |                       |
| Centractin <sup>1</sup>       | 42  | 3        | 256178   | 45-47           | 0.07                  |
| Dynamitin                     | 50  | 3        | 51948450 | 53-55           | 0.06                  |
| Dynactin                      | 142 | 6        | 1743380  | 140-160         | 0.04                  |
| Dynein (MAP-1C) <sup>1</sup>  | 524 | 18       | 402528   | ≥250            | 0.03                  |
| <b>Actin-related</b>          |     |          |          |                 |                       |
| Actin <sup>1</sup>            | 42  | 13       | 71620    | 45-47           | 0.31                  |
| Marcks                        | 30  | 8        | 111322   | 80-82           | 0.27                  |
| MacMarcks                     | 19  | 4        | 13540687 | 41-45           | 0.21                  |
| Septin                        | 42  | 5        | 16924010 | 45-47           | 0.12                  |
| VAT 1                         | 33  | 2        | 26330206 | 53-55           | 0.06                  |
| Sec 23 hom                    | 87  | 4        | 21961650 | 82-84           | 0.05                  |
| Ezrin/Moesin <sup>1</sup>     | 60  | 3        | 17902245 | 82-84           | 0.05                  |
| CRUMP-2 (TOAD64) <sup>1</sup> | 52  | 2        | 599966   | 65-68           | 0.04                  |
| Spectrin-alpha fodrin         | 285 | 3        | 31543764 | 210-230         | 0.01                  |

1. Also identified in adult CCV preparation (Blondeau et al., 2004)

## Proteomics of RNA granules in developing brain

TABLE S4

| <b>Other</b>                             | MW  | Peptides | Gi       | Bands<br>App MW | Peptides/<br>MW ratio |
|--|-----|----------|----------|-----------------|-----------------------|
| <b>Novel</b>                             |     |          |          |                 |                       |
| CGI-99 (Megagranin)                      | 28  | 6        | 27722175 | 29-30           | 0.21                  |
| FLJ13110                                 | 22  | 2        | 34855979 | 23-68           | 0.09                  |
| KIAA014                                  | 115 | 4        | 1469870  | 140-160         | 0.03                  |
| similar to SD08037p                      | 58  | 2        | 34856672 | 45-47           | 0.03                  |
| hypothetical protein                     | 75  | 2        | 34860217 | 60-65           | 0.03                  |
| KIAA0982(WD 40 repeat)                   | 52  | 1        | 34876297 | 68-70           | 0.02                  |
| FLJ12890                                 | 84  | 1        | 13123772 | 84-90           | 0.01                  |
| <b>Other Proteins</b>                    |     |          |          |                 |                       |
| N-acetyltransferase like                 | 52  | 8        | 34856912 | 97-100          | 0.15                  |
| EBP-1 (proliferation associated p38-2G4) | 38  | 5        | 51948384 | 47-53           | 0.13                  |
| PDGF associated phosphoprotein           | 20  | 2        | 1136586  | 29-30           | 0.10                  |
| progesterone receptor component          | 25  | 2        | 6572674  | 29-30           | 0.08                  |
| GTP binding (DRG)                        | 40  | 3        | 346685   | 41-45           | 0.08                  |
| Glucose related protein 78 (BiP)         | 72  | 5        | 109893   | 80-82           | 0.07                  |
| protein disulfide isomerase              | 48  | 3        | 2501206  | 53-55           | 0.06                  |
| RNAse L inhibitor                        | 68  | 3        | 7657518  | 65-68           | 0.04                  |
| IKAP, IKK Inhibitor                      | 150 | 3        | 18266706 | 140-160         | 0.02                  |

## Proteomics of RNA granules in developing brain

TABLE S5

| <b>b) Clathrin-Coated Vesicles</b>       | MW  | Peptides | Gi       | Bands<br>App MW | Peptides/<br>MW ratio |
|--|-----|----------|----------|-----------------|-----------------------|
| <b>Coats</b>                             |     |          |          |                 |                       |
| Clathrin heavy chain                     | 193 | 92       | 71564    | 200-210         | 0.48                  |
| Hsc70                                    | 71  | 15       | 347019   | 70-80           | 0.21                  |
| Clathrin light chain A                   | 27  | 4        | 71562    | 35-36           | 0.15                  |
| AP2 beta                                 | 105 | 6        | 34876358 | 110-115         | 0.06                  |
| <b>Signaling</b>                         |     |          |          |                 |                       |
| G-alpha o 2                              | 40  | 11       | 71907    | 39-41           | 0.28                  |
| G protein beta 1                         | 38  | 4        | 51338711 | 36-39           | 0.11                  |
| G-alpha i 2                              | 41  | 4        | 204440   | 39-41           | 0.10                  |
| <b>Integral Plasma Membrane</b>          |     |          |          |                 |                       |
| Reticulon 3                              | 25  | 4        | 17066677 | 28-29           | 0.16                  |
| NCAM                                     | 180 | 24       | 72067    | 230-240         | 0.13                  |
| Reticulon 1                              | 30  | 4        | 456550   | 23-25           | 0.13                  |
| Na/K ATPase alpha 3                      | 113 | 8        | 29839750 | 100-109         | 0.07                  |
| Na/K ATPase beta                         | 36  | 2        | 6978549  | 47-53           | 0.06                  |
| NOGO A receptor                          | 126 | 5        | 13929188 | 175-180         | 0.04                  |
| thioredoxin containing                   | 28  | 1        | 34865352 | 31-32           | 0.04                  |
| <b>Adaptors</b>                          |     |          |          |                 |                       |
| FK506 Binding protein 3                  | 24  | 7        | 27664664 | 31-32           | 0.29                  |
| Cyclophilin A                            | 18  | 3        | 68405    | 14.5-15         | 0.17                  |
| 14-3-3 (undefined subtype)               | 30  | 3        | 477448   | 31-32           | 0.10                  |
| Cyclophilin B                            | 23  | 2        | 11968126 | 19-21           | 0.09                  |
| 14-3-3 zeta                              | 28  | 2        | 13487931 | 31-32           | 0.07                  |
| <b>Synaptic Vesicle</b>                  |     |          |          |                 |                       |
| Munc-18 (Nsec-1)                         | 58  | 8        | 1944322  | 68-70           | 0.14                  |
| syntaxin 7                               | 30  | 2        | 3152727  | 39-41           | 0.07                  |
| NSF                                      | 84  | 4        | 13489067 | 80-82           | 0.05                  |
| SCAMP                                    | 38  | 2        | 487057   | 35-36           | 0.05                  |
| <b>Metabolic Enzymes</b>                 |     |          |          |                 |                       |
| Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | 36  | 4        | 56188    | 36-39           | 0.11                  |
| Aldolase A                               | 40  | 4        | 6978487  | 39-41           | 0.10                  |
| Phosphofructokinase                      | 85  | 4        | 400095   | 80-82           | 0.05                  |
| <b>Trafficking</b>                       |     |          |          |                 |                       |
| Rab 14                                   | 24  | 4        | 420272   | 29-30           | 0.17                  |
| Rab 2                                    | 23  | 4        | 10946940 | 25-26           | 0.17                  |
| Rab 5-C                                  | 23  | 3        | 27689505 | 29-30           | 0.13                  |
| Rab 11B                                  | 24  | 3        | 14249144 | 29-30           | 0.13                  |
| Rab 10                                   | 23  | 3        | 420269   | 29-30           | 0.13                  |
| Rab 7                                    | 23  | 2        | 92022    | 29-30           | 0.09                  |
| VSP35                                    | 87  | 2        | 1354050  | 82-84           | 0.02                  |

Figure 1

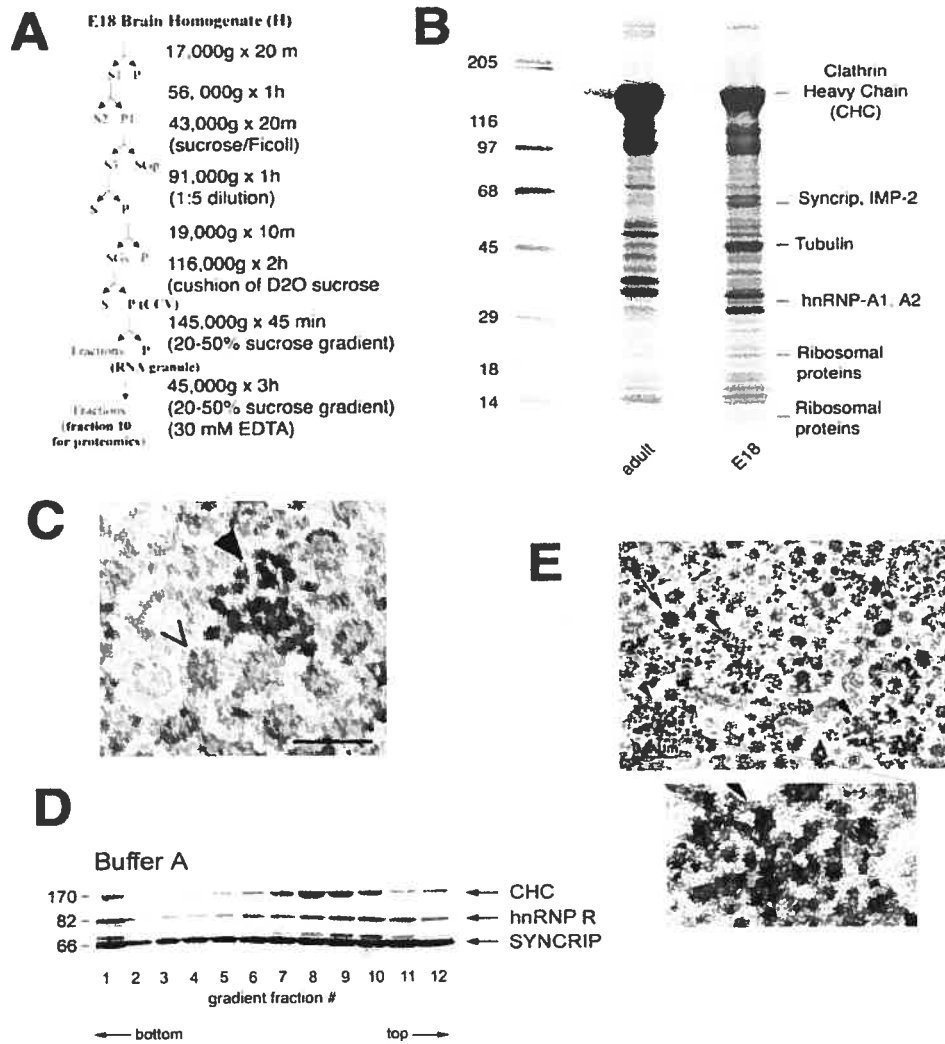


Figure 2

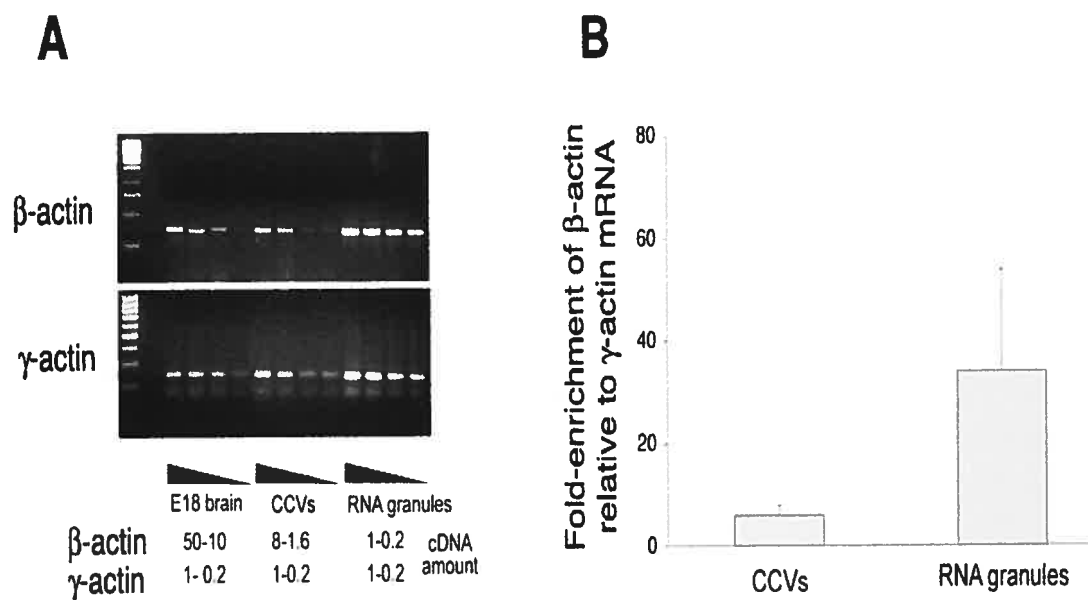




Figure 3

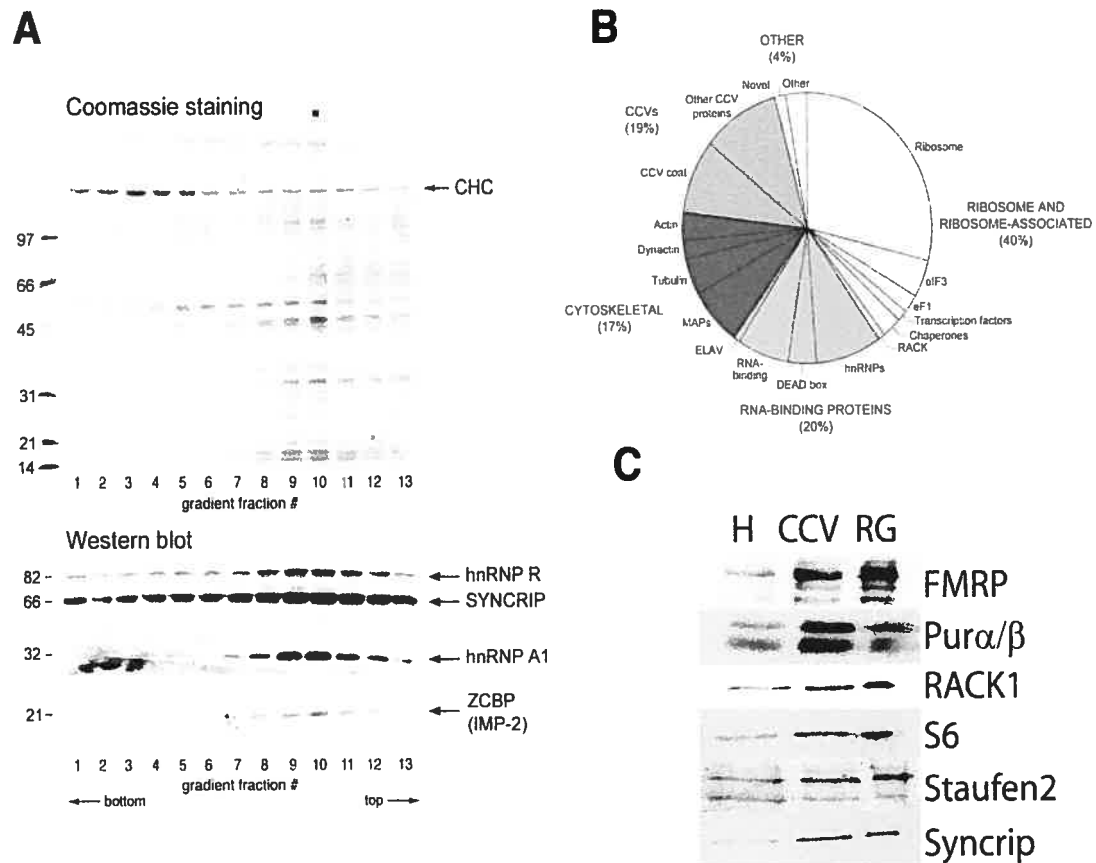
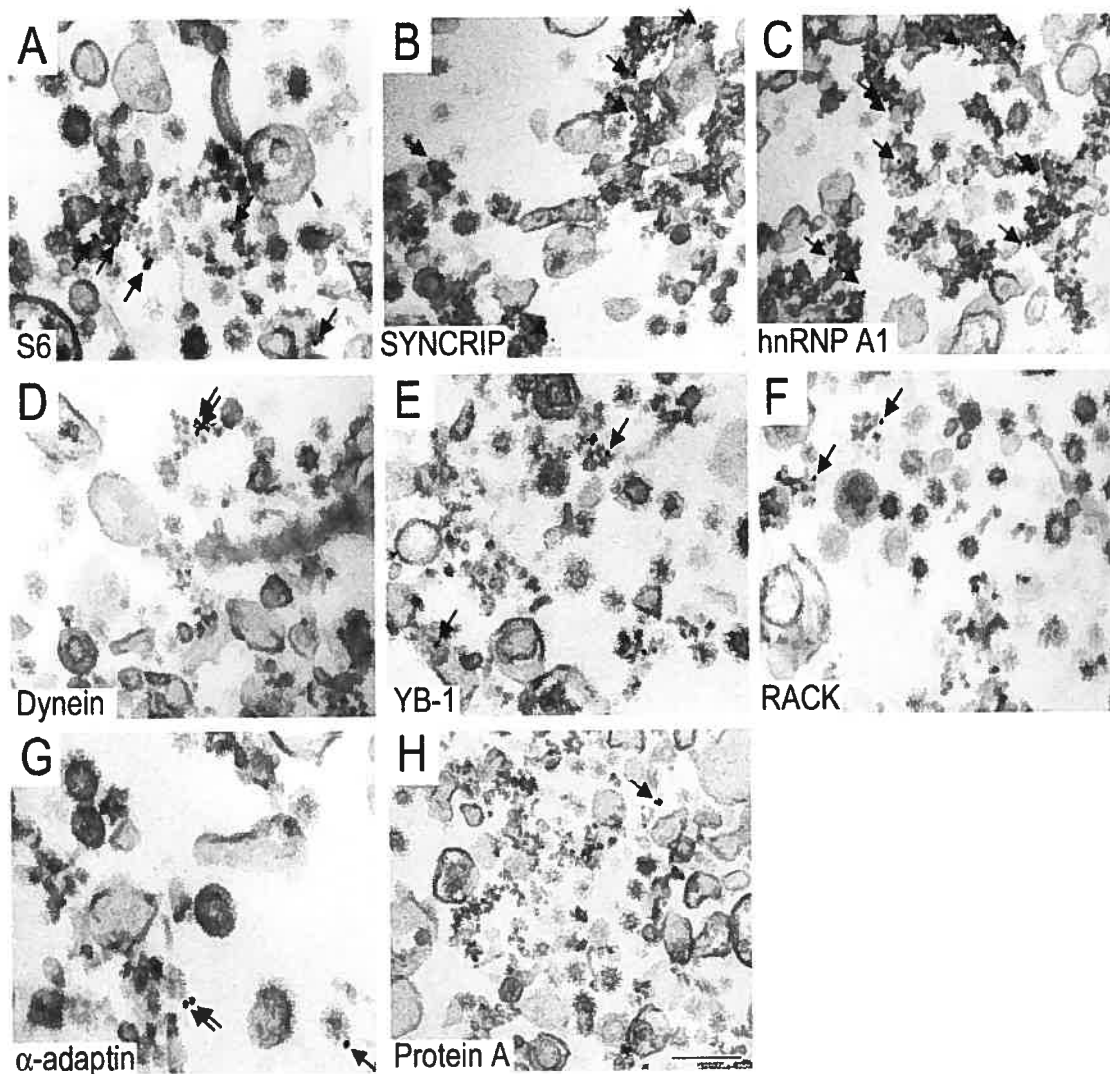


Figure 4



| Antibody  | RNA Granules        |           | CCVs                |           |
|-----------|---------------------|-----------|---------------------|-----------|
|           | Density (Gold/Area) | % of Gold | Density (Gold/Area) | % of Gold |
| S6        | 14 ± 4              | 52 ± 5    | 0.4 ± 0.2           | 8 ± 3     |
| SYNCRIP   | 10 ± 2              | 55 ± 9    | 0.7 ± 0.3           | 6 ± 4     |
| hnRNP A1  | 7 ± 2               | 48 ± 6    | 2 ± 0.9             | 15 ± 4    |
| Dynein    | 12 ± 2              | 46 ± 5    | 1 ± 0.5             | 4 ± 1     |
| YB-1      | 15 ± 2              | 34 ± 5    | 1.3 ± 0.4           | 8 ± 3     |
| RACK      | 5 ± 1               | 51 ± 4    | 0 ± 0               | 0 ± 0     |
| α-adaptin | 1 ± 0.4             | 6 ± 3     | 10 ± 1              | 68 ± 6    |
| Protein A | 1 ± 1               | 15 ± 5    | 0.6 ± 0.4           | 4 ± 2     |

Figure 5

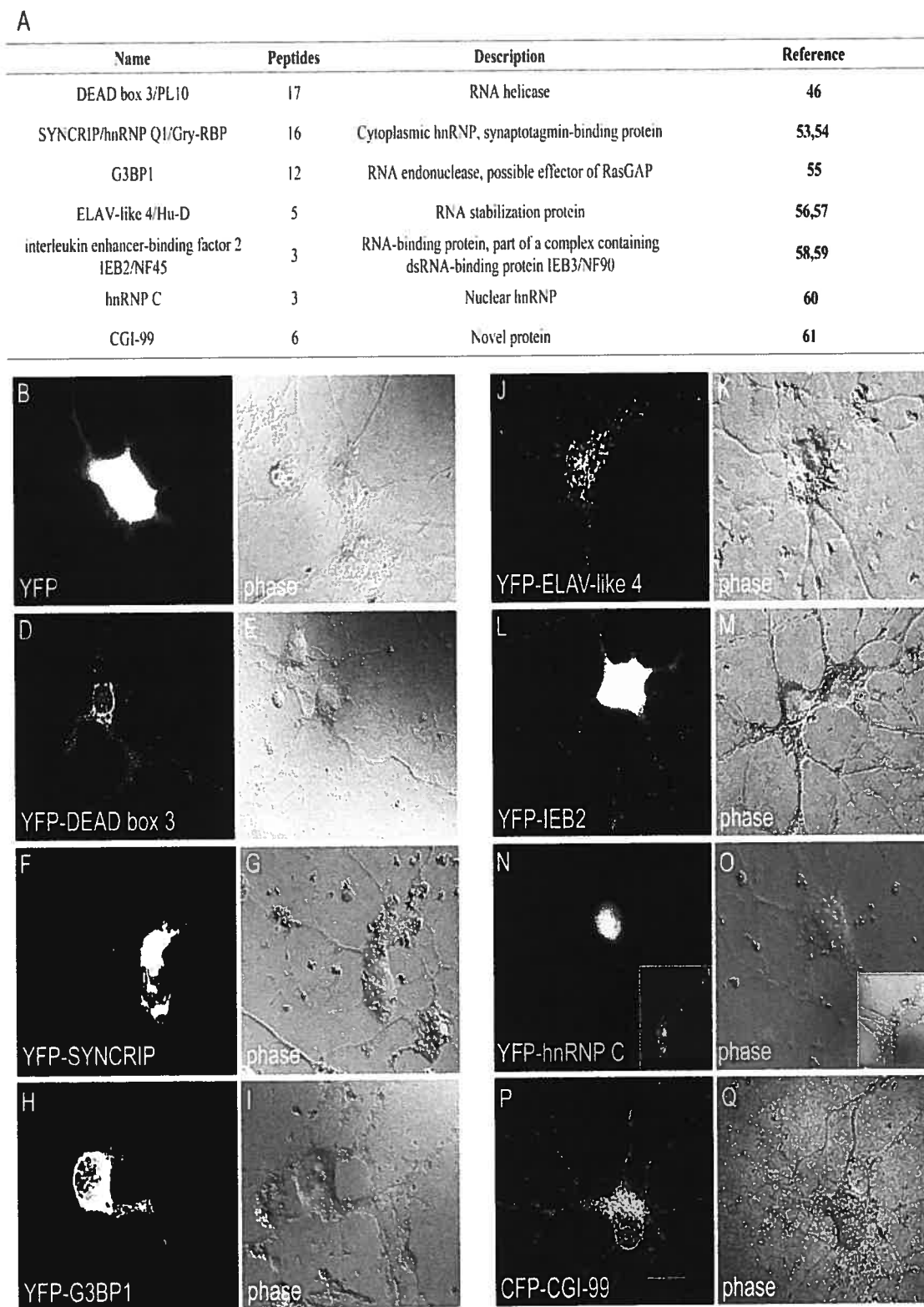


Figure 6

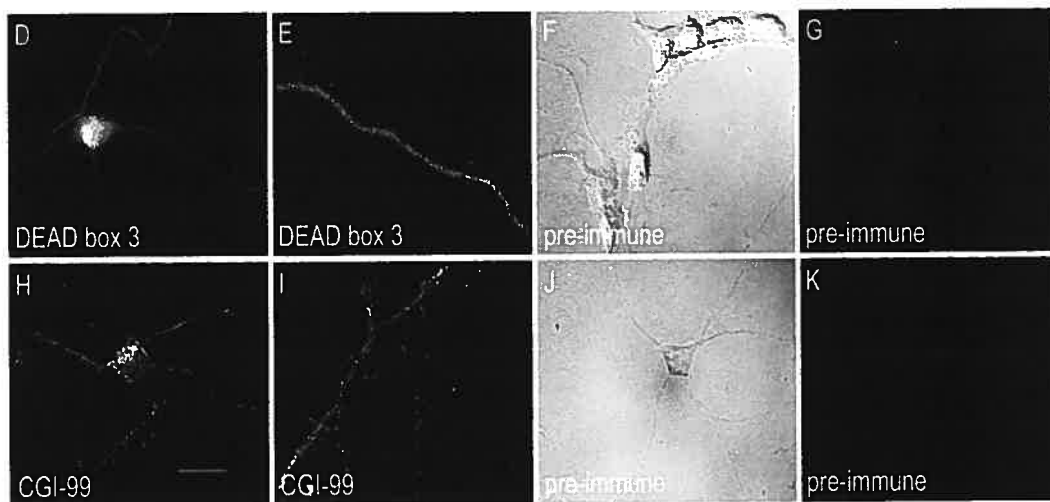
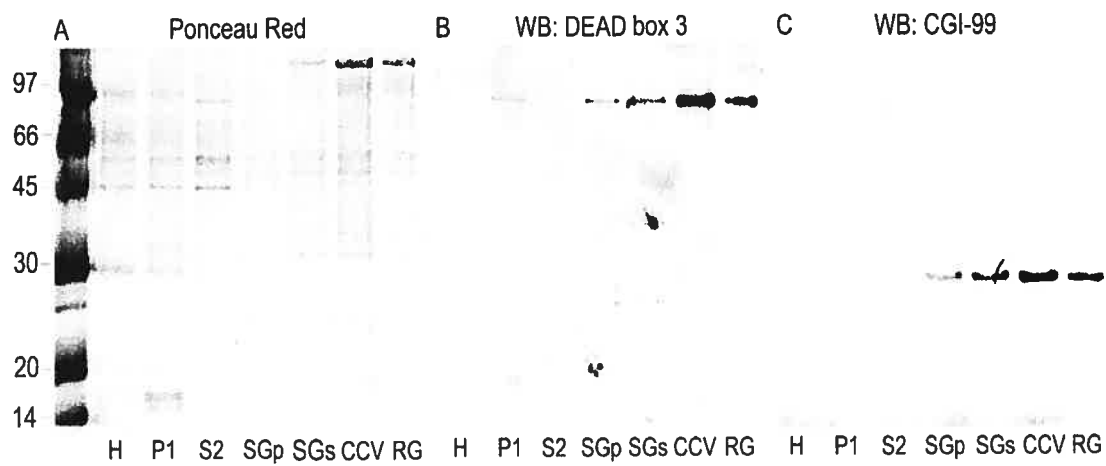


Figure 7

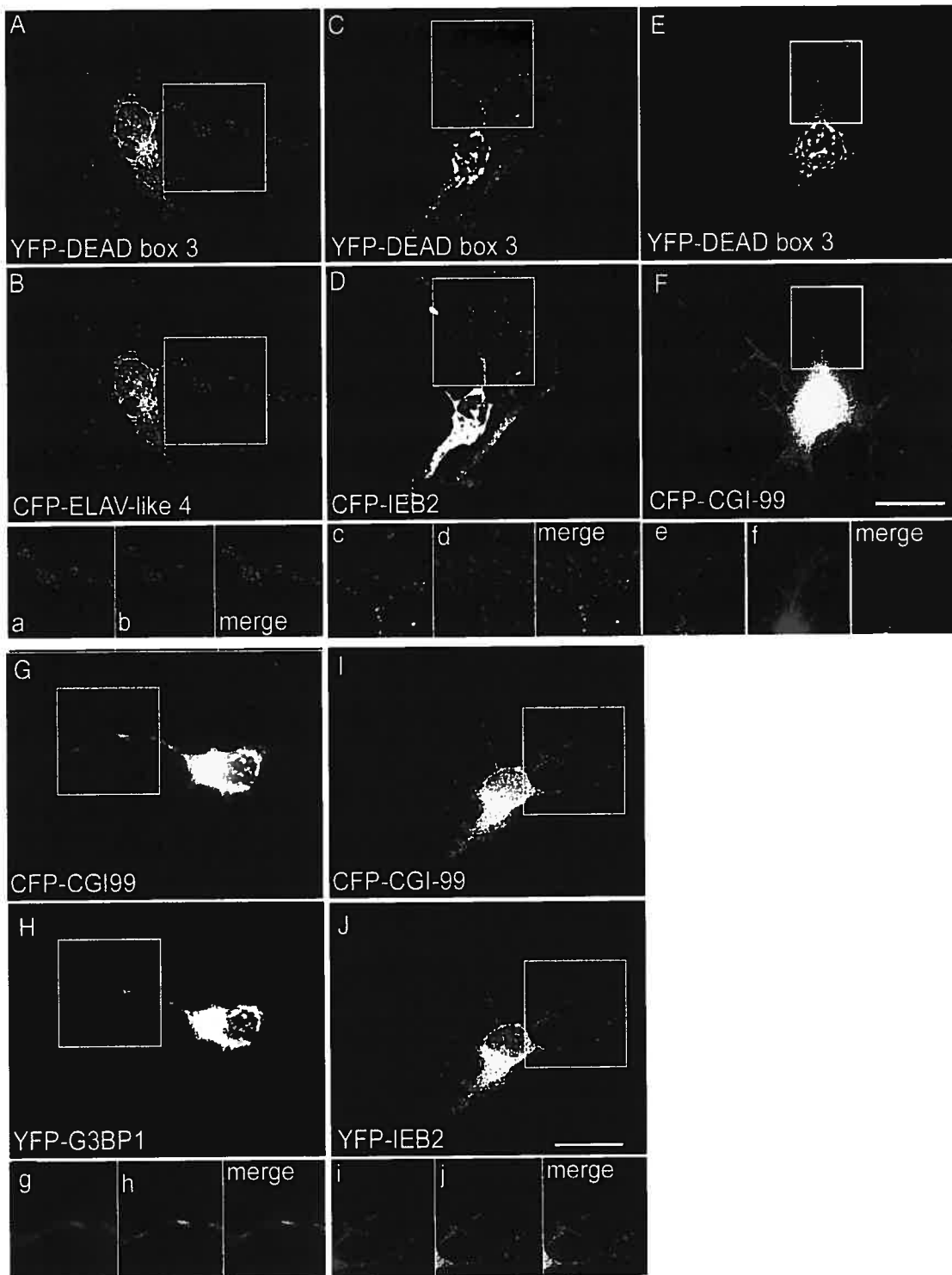


Figure 8

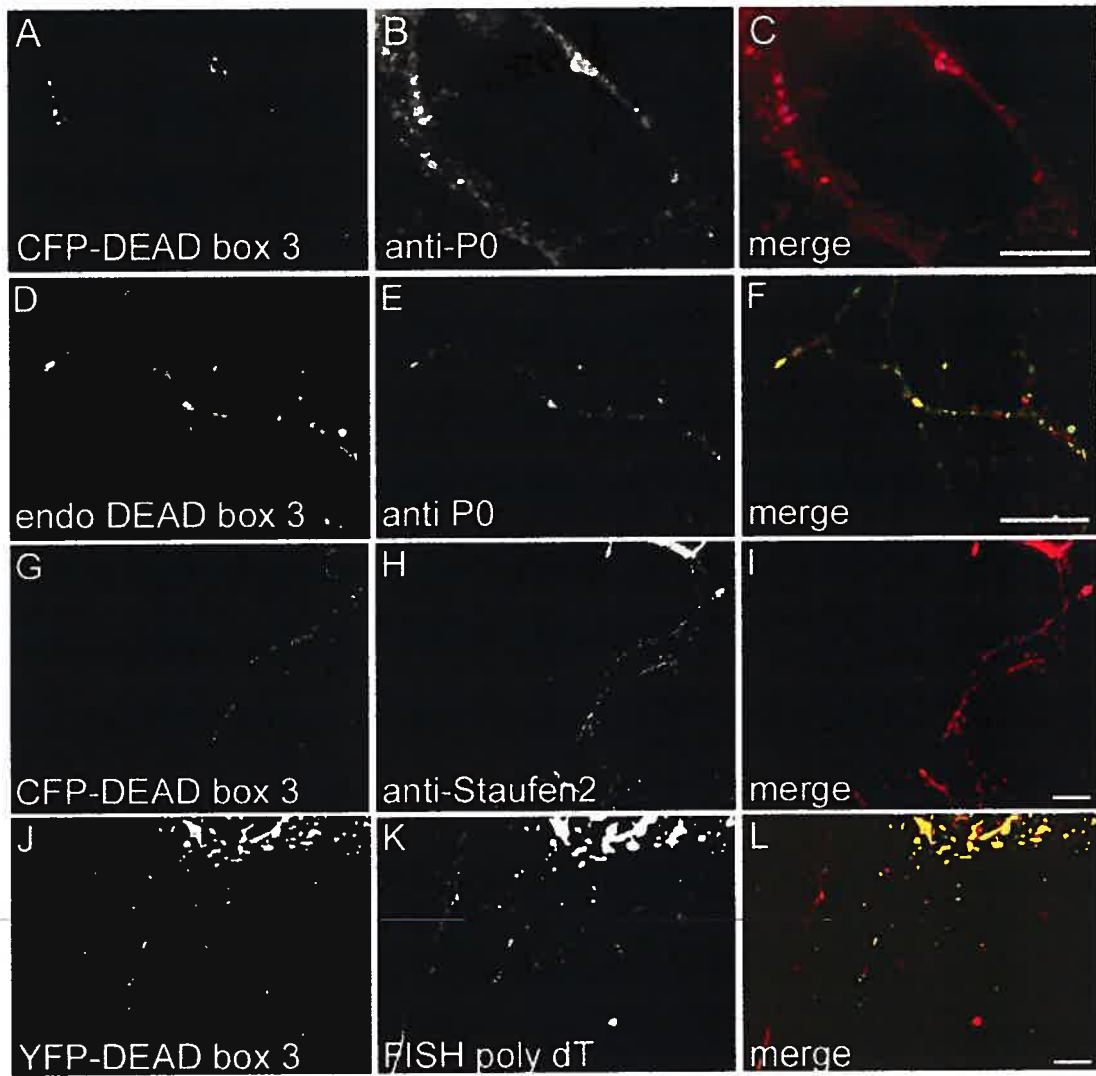
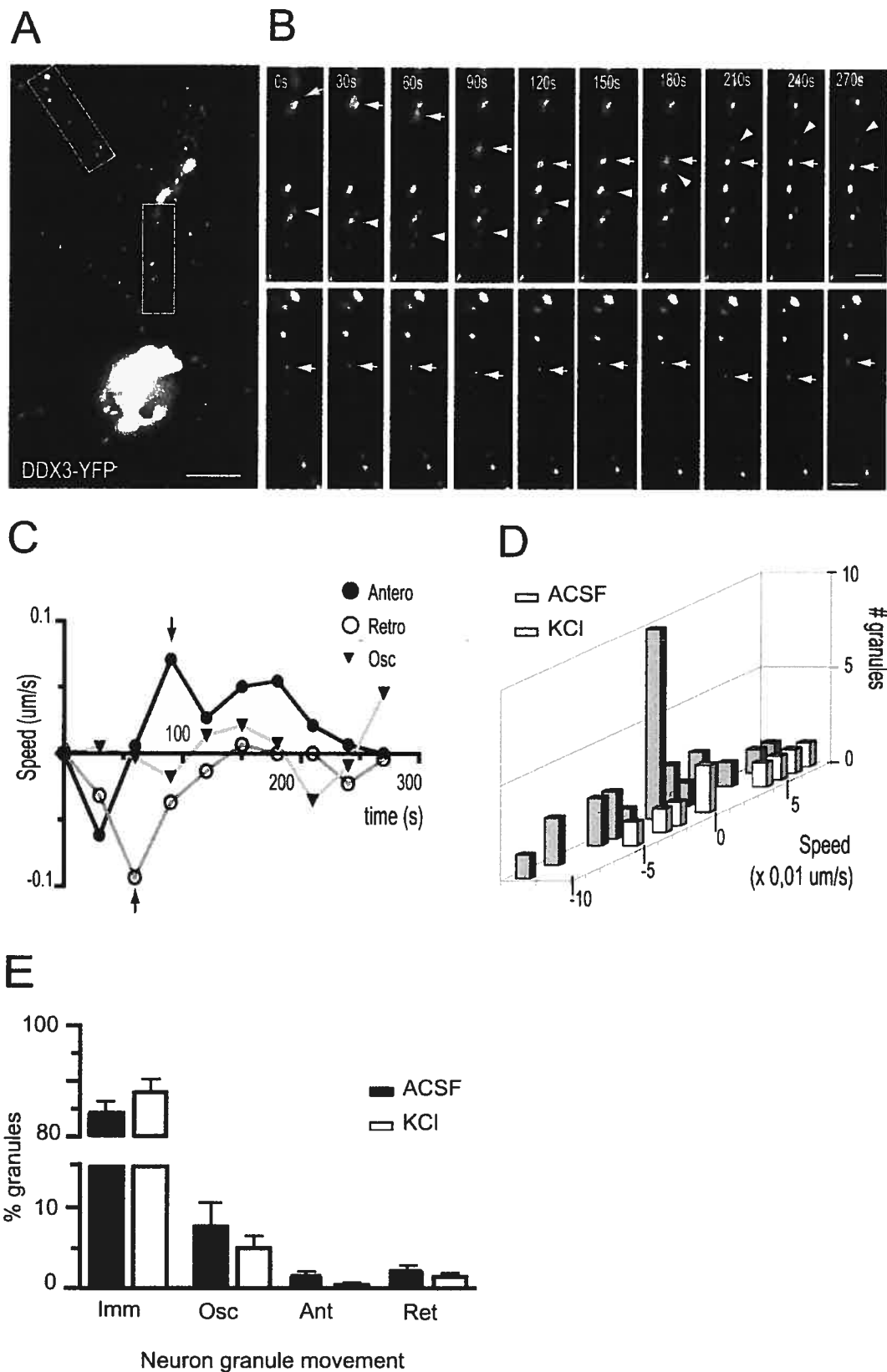


Figure 9



**3.2 ARTICLE 2 : The zinc-finger protein ZFR is critical for Staufen2 isoform specific nucleocytoplasmic shuttling in neurons**



---

**Mise en contexte au chapitre 3.2**

Nous avons utilisé une approche classique afin d'identifier des partenaires protéiques de Stau2 qui pourraient faire partie des granules d'ARN dendritiques contenant Stau2. Afin d'augmenter la probabilité de retrouver une protéine importante pour le transport Stau2, nous avons utilisé une banque d'ADNc de cerveau foetal de souris et un fragment protéique de Stau2 qui contient le dsRBD2, domaine essentiel au transport microtubule-dépendant des RNP de Staufen chez la drosophile.

Durant nos études, l'utilisation de molécules pouvant induire une sous-expression protéique par la voie du RNAi est devenue chose courante afin de démontrer l'importance fonctionnelle d'une protéine. Dans ce manuscrit nous présentons trois techniques différentes afin d'obtenir un RNAi et observer un phénotype dans des cultures primaires de neurones.

---

**Note**

-Contribution de chacun des auteurs :

G. Elvira : Double-hybride chez la levure, imagerie par microscopie confocale, immunoprécipitation, fractionnement sub-cellulaire, RNAi anti-ZFR, culture primaire et transfection de neurones d'hippocampe, immunofluorescence. Écriture du manuscrit.

B. Massie : Développement du système d'expression mammifère CTA-dépendant

L. DesGroseillers : Supervision générale. Écriture du manuscrit.

Article soumis dans : Journal of Neurochemistry

---

**THE ZINC-FINGER PROTEIN ZFR IS CRITICAL FOR STAUFEN 2  
ISOFORM SPECIFIC NUCLEOCYTOPLASMIC SHUTTLING IN NEURONS**

---

George Elvira<sup>1</sup>, Bernard Massie<sup>2</sup> and Luc DesGroseillers<sup>1,3</sup>

Département de Biochimie<sup>1</sup>, and Centre de Recherche en Sciences Neurologiques<sup>3</sup>,  
Université de Montréal, Montréal, Canada H3C 3J7, and Conseil National de Recherche  
Canada<sup>2</sup>, Institut de Recherche en Biotechnologie, Montréal, Canada H4P 2R2

**Address correspondence 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

**Abbreviations used:** dsRBD, double-stranded RNA-binding domain; esiRNA, endoribonuclease-prepared siRNA; GFP, green fluorescent protein; RNAi, RNA interference; RNP, ribonucleoprotein; shRNA, short hairpin RNA; siRNA, short interfering RNA; Stau2, Staufen2; YFP, yellow fluorescent protein.

**Article soumis à : Journal of Neurochemistry, 24 mai 2005**

---

In mammalian neurons, transport and translation of mRNA at individual potentiated synapses is believed to proceed via a heterogeneous population of RNA granules. To identify components of Staufen2-containing granules, we used the yeast two hybrid system. A mouse fetal cDNA library was screened with the N-terminal fragment of Staufen2 as bait. ZFR, a three zinc finger protein, was identified as an interacting protein. Confocal microscopy showed that ZFR, although mainly nuclear, was also found in the somatodendritic compartment of primary hippocampal neurons where it localized as granule-like structures. Co-localization with Staufen2 was observed in several granules. Biochemical analyses (immunoprecipitation, cell fractionation) further confirmed the ZFR/Staufen2 association. ZFR was shown to interact with at least two Staufen2 isoforms but not with Staufen1. ZFR co-fractionated with both Staufen2 isoforms in a sucrose gradient. Interestingly, knockdown expression of ZFR through RNA interference in neurons relocated specifically the Staufen2<sup>62</sup>, but not the Staufen2<sup>59</sup>, isoform to the nucleus. Our results demonstrate that ZFR is a native component of several types of Staufen2-containing granules and likely plays its role during early steps of RNA transport and localization. They also suggest that one of these roles may be linked to Staufen2<sup>62</sup>-containing RNA granule formation in the nucleus and/or to their nucleocytoplasmic shuttling.

**Keywords:** Ribonucleoprotein; RNA transport; RNA granule; dendrite; nuclear localization;

In neurons, although most of the mRNAs are restricted to cell bodies, some are found in the somatodendritic compartment. As synthesis of proteins occurs in dendrites, dendritic localization of a specific subset of mRNAs and their local translation are thought to allow neurite growth and plasticity at sites distant from the cell body and the differential plasticity of each individual dendrite in response to neighbouring cells (Kiebler and DesGroseillers, 2000; Steward and Worley, 2001). In dendrites, RNA and/or RNA-binding proteins have a punctuated distribution and their movement can be observed in living neurons using the RNA-binding dye SYTO14 (Knowles et al., 1996). These observations lead to a model in which differential delivery of new mRNAs occurs in motile structures called RNA granules. RNA granules are large clusters of ribosomes to which RNAs, translation factors and other proteins are associated (Krichevsky and Kosik, 2001). Evidences suggest that they are translationally incompetent and represent reservoirs of silent RNA, which upon cell stimulation release RNAs for local translation on polyribosomes (Krichevsky and Kosik, 2001).

Staufen, a double-stranded RNA binding protein plays central role(s) in mRNA transport and localization in *Drosophila* (St Johnston et al., 1991). It is also required for the de-repression of translation of oskar mRNA in oocytes (Kim-Ha et al., 1995; Micklem et al., 2000). In mammals, two genes coding for Staufen paralogues have been described (Duchaine et al., 2002; Kiebler et al., 1999; Marion et al., 1999; Tang et al., 2001; Wickham et al., 1999). In neurons, Stau1 and Stau2 are found in the somatodendritic compartment in independent punctuated structures that do not colocalize. They are both associated with a heterogeneous population of RNA granules and smaller ribosome-free RNA particles (Duchaine et al., 2002; Mallardo et al., 2003) and are believed to play important role(s) in the delivery of RNA to neurites (Kohrmann

et al., 1999; Tang et al., 2001; Thomas et al., 2004). Several isoforms of Stau2 that define different RNP complexes have been described but their respective physiological roles are still unclear (Duchaine et al., 2002; Mallardo et al., 2003; Thomas et al., 2004).

Proteomic approaches have recently been used to identify protein components of RNA granules (Bannai et al., 2004; Brendel et al., 2004; Kanai et al., 2004; Ohashi et al., 2002; Villace et al., 2004) but the role of identified proteins and their interaction within the granules are still unclear. Therefore, the heterogeneous composition of RNA granules and particles, their site of formation, the mechanism of recognition of specific RNAs and the mechanism of their transport/localization are still to be understood. Identification and characterization of mammalian Staufen binding protein(s) should provide more information on the mechanisms of RNA transport in neurons. Using the yeast two-hybrid assay, a first Stau2-binding protein was identified: the zinc finger protein ZFR. Biochemical characterization demonstrated that ZFR is associated with both the Stau2<sup>62</sup>-containing RNP complexes and the Stau2<sup>59</sup>/Stau2<sup>52</sup> ribosome-associated complexes, but not with Stau1-containing granules. Down regulation of ZFR by RNA interference caused the retention of the Stau2<sup>62</sup> isoform in the nucleus suggesting that ZFR may play an early role in Stau2-granule formation.

## Materials and methods

### *Yeast two-hybrid screen*

An N-terminal cDNA fragment encoding the mouse Stau2 dsRBD1 and dsRBD2 (amino acids 1 to 179; GeneBank Accession Number AF459099) was subcloned into the pLexA plasmid (Clontech, Palo Alto, CA) and used as bait to screen 2 x 10<sup>7</sup> clones from

a foetal mouse brain cDNA library (Clontech). Positive clones were selected for both their growth on Leu- medium and lacZ expression. All measurements were done according to Clontech protocols. Plasmids were rescued from positive clones, subcloned and individual plasmids checked by back transformation with the bait. Sequence of the cDNA clones was determined with a LI-COR 4000L automated DNA sequence analyzer using end-labelled primers and a cycle-sequencing protocol (LI-COR, Lincoln, NE, USA).

#### *cDNA constructs*

pLexAD-Stau2<sup>62</sup>-N fusion protein was generated by PCR amplification using the pCDNA3-RSV-Stau2<sup>62</sup> cDNA as template (Duchaine et al., 2002) and the Vent DNA polymerase (New England BioLabs, Mississauga, ON, Canada). Sense and antisense primers were: 5' TATAGAATTCAAAATGGCAAACCCCAAAGAG (underlined: *EcoRI* restriction site) and 5' TATACTCGAGTGGTTTCTGAACTGGTTTGGGAAGCG (underlined: *XhoI* restriction site), respectively. The resulting PCR product was cloned into *EcoRI* and *XhoI* sites of the pLexA plasmid.

To generate Stau2<sup>62</sup>-HA and Stau2<sup>59</sup>-HA, the *KpnI/XbaI* fragments of pCDNA3-RSV/Stau2<sup>62</sup>-HA and of pCDNA3-RSV/Stau2<sup>59</sup>-HA, respectively (Duchaine et al., 2002) were isolated and their extremities blunted with T4 DNA polymerase. Similarly, pCDNA3-RSV/Stau1-HA was digested with *HindIII* and *XbaI* and treated with T4 DNA polymerase. Resulting fragments were subcloned at the *EcoRV* site of the pAdPS-CR5-IRES-GFP vector in which the gene of interest is co-expressed from the Cumate-Regulated promoter (CR5) along with GFP through an internal ribosome entry site. The

activity of CR5 is controlled by the hybrid transactivator cTA made of the DNA binding domain of the bacterial repressor CymR, fused to VP16 activation domain. High-level expression was achieved by co-transfection of pAdPS-CR5-IRES-GFP encoding Stau2<sup>62</sup>-HA, Stau2<sup>59</sup>-HA or Stau1-HA with pAdCMV-cTA (Massie, B., Mullick, A., Lau P., and Konishi, Y. A system for regulated expression in eukaryotic cells. Patent pending).

For antibody production, the ZFR<sup>400-596</sup> insert was subcloned in pGEX-4T2 plasmid, using *EcoR*I and *Xho*I restriction sites, and the resulting fusion protein was induced and purified as indicated by the manufacturer (Amersham Bioscience Corp, Piscataway, NJ, USA) and injected in mice as described (Wickham et al., 1999).

#### *Cell culture and transfection*

Primary hippocampal and cortical neurons were collected from E17-E19 Sprague Dawley rat embryos (Charles River Laboratories, Ottawa, ON, Canada) and cultured at low or high density as described (Duchaine et al., 2002). Cells were plated on poly-D-lysine- (Sigma, Oakville, ON, Canada) coated glass coverslips (18 CIR-1D, Fisher Nepean, ON, Canada) at 800 cells/mm<sup>2</sup> according to standard protocols (Banker and Goslin, 1988). Culture media consisted in Neurobasal medium supplemented with 1X GlutaMax, 25 µM glutamate and 2% B27 supplements (Invitrogen Life Technologies, Burlington, ON, Canada). On day 3-4 after plating, one half of the culture media was removed and replaced with fresh media without glutamate. On day 5 after plating, neurons were transfected using 2 µg/ml Lipofectamine2000 and 1 µg/ml plasmid DNA in fresh medium during 2 hours as described by the manufacturer (Invitrogen Life Technologies). Following transfection, neurons were put back into conditioned media



for 48h. Less than 0,1% of initially plated cells were transfected. Neurons were fixed in 4% PFA/4% sucrose in PBS for 15 min, quenched 3 times 5 min in PBS/glycine 0,1M and finally washed in PBS. All plasmid DNA used for transfection were CsCl double-banded purified.

### *RNA interference*

RNAi experiments were conducted with either random DICER-esiRNA, short hairpin RNA (shRNA)-encoding PCR products or siRNA. Random esiRNA were generated from in vitro digestion of ZFR<sup>400-596</sup> dsRNA with a recombinant human DICER protein according to the manufacturer instructions (DICER siRNA Generation kit, Gene Therapy Systems, San Diego, CA, USA). ZFR<sup>400-596</sup> dsRNA was obtained by in vitro transcription using the T7 RNA polymerase (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON, Canada) and the Qiaquick (Qiagen) purified T7-ZFR<sup>400-596</sup>-T7 PCR product as template. The T7-ZFR<sup>400-596</sup>-T7 PCR product was obtained by PCR amplification (20 cycles, 30 sec at 95°C, 30 sec at 55°C and 1 min at 72°C) using the Vent DNA polymerase, the B42AD-ZFR<sup>400-596</sup> cDNA as template and the sense and antisense primers:

GCGTAATACGACTCACTATAGGGGAGACTCTCCTTCAAGTATTGGC and 5'  
GCGTAATACGACTCACTATAGGGGAGAGAAGTCTATGTCTTCGTCC

(underlined: T7 promoter sequence), respectively. Neurons were transfected with 2 µg/ml Lipofectamine2000 using 0,5 µM esiRNA.

Short hairpin RNAs (shRNA) directed against the rat and mouse ZFR mRNA were produced in cells following transfection of an shRNA-encoding PCR product under the control of the U6 snRNA promoter (Paddison et al., 2004). Three mouse ZFR

shRNA PCR products were generated with the Taq DNA polymerase (Applied Biosystems Canada, Streetsville, ON, Canada) using the human U6 locus-pGEM1 plasmid (Promega Corp) as template, a common sense primer 5'GGTGTTCGTCCTTTCCACAA 3' and three antisense primers, respectively.

shRNA I : 5' AAAAAAGGCCGCTGCCGCCGAACCTCTGAACCCTCACAAGCTTCTGAGAGTTC AGAGTTCAGCAGCAGCAGCCGGTGTTCGTCCTTTCCACAA 3', shRNA II : 5'AAAAAAGTGCATCTGACGGAACGCAAGAAGCCTCACAAGCTTCTGAGACT CCTTGCATTCCGTCAGATACACGGTGTTCGTCCTTTCCACAA 3' and shRNA III:

5'AAAAAAGATAGTACCACAGTAACTGCAACTACCACCAAGCTTCGTGGCAG CTGCGGCTACTGTGGTACCATCGGTGTTCGTCCTTTCCACAA 3' (underlined: U6 complementary sequence). Neuroblastoma N2A cell line were transfected with 2 µg/ml Lipofectamine2000 and 200 ng/ml of shRNA PCR product (gel purified and extracted with Qiaex II, Qiagen).

siRNA was designed against the rat and mouse ZFR mRNA. Sense 5' CUCCUUGCAUUCGUCAGAUACA 3' and antisense 5'UGUAUCUGACGGAAUGCAAGGAG 3'. RNAs were annealed as indicated by the manufacturer (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA). siRNA (10 nM) were transfected in N2A or rat hippocampal neurons (5 D.I.V.) using Lipofectamine2000 as in (Krichevsky and Kosik, 2002).

### *Cell cytoplasmic extract*

Cell cytoplasmic extracts were prepared as described (Duchaine et al., 2002) with the following modifications. Briefly, brain cortices from Balb/C mice were homogenized with a type B Teflon-glass homogenizer in detergent-free ice-cold low-salt buffer (20 mM Hepes-KOH, pH 7.5, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.3% Triton-X100, 0.05M sucrose) supplemented with EDTA-free COMPLETE protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science, Laval, Canada). Similarly, 12-15 D.I.V. cultures of E17-E19 rat embryo cortical neurons were washed with ice-cold PBS and directly scraped off the dishes with ice-cold low-salt buffer supplemented as above. Homogenates were centrifuged twice at 1500 X g for 10 min at 4°C. Supernatants containing cytoplasmic extracts were adjusted to 170 mM NaCl and 13 mM MgCl<sub>2</sub> and centrifuged at 10 000 X g for 15 min at 4 °C. Protein content was determined by the Bio-Rad protein assay according to manufacturer's instructions (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada).

#### *Sedimentation studies*

S100-P100 fractionation and sucrose sedimentation studies were performed as described previously (Duchaine et al., 2002; Krichevsky and Kosik, 2001) except that 20 OD260 units of cytoplasmic protein extract were loaded on a discontinuous 20-60% sucrose gradient and ultracentrifuged at 175 000 X g in a SW41ti rotor at 4°C for 3h. Resulting fractions (0,8 ml) were hand collected. Proteins were acetone precipitated and loaded onto an SDS-polyacrylamide gel and assayed by Western blotting.

#### *Western blotting and immunoprecipitation*

Western blotting was carried out as previously described (Wickham et al., 1999). Antibodies used were rabbit (1:2500) (Generous gift of R.E. Braun, Washington, USA) or mouse (1:10000) polyclonal anti-ZFR, affinity immunopurified rabbit polyclonal anti-Stau1 and anti-Stau2 (Duchaine et al., 2002), anti-calnexin (StressGen, Vancouver, BC, Canada), mouse polyclonal anti-L7/SPA (1:10000, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), human autoimmune anti-ribosomal protein P (1:1000) (generous gift from Dr M. Reichlin, Oklahoma Medical Research Foundation, USA) and mouse monoclonal anti-Stau2 1C6 (1:750) (Duchaine et al., 2002).

For immunoprecipitation, Stau2-GST and Stau1-GST fusion proteins were first cross-linked to sepharose resin with DMP (Pierce Biotechnology – MJS Biolynx, Brockville, ON, Canada) (Bar-Peled and Raikhel, 1996) and then used to immunopurify rabbit polyclonal anti-Stau2 and anti-Stau1 sera, respectively. Cytoplasmic extracts (1 mg of total proteins) from adult mouse brain cortices or from rat embryonic cortex cell cultures were diluted in 0,5 ml lysis buffer supplemented with 0,5 % Nonidet-P40 and with or without 1 mg/ml RNase A. Primary incubation was carried out at 4°C for 4 h. Then, 40 µl of a 50% sepharose-A slurry was added and the solution was further incubated at 4°C for 1h. The resin was washed and the precipitate eluted with 1 volume of 2 x SDS loading buffer. One half of the elution volume was loaded onto an 8% SDS-polyacrylamide gel and analyzed by Western blotting.

### *Immunofluorescence*

Immunocytochemistry was carried out essentially as described previously (Duchaine et al., 2002) using rabbit (1:500) or mouse (1:2000) polyclonal anti-ZFR, mouse monoclonal (1:100) or rabbit immunopurified polyclonal anti-Stau2 (1:200)

antibodies. Secondary antibodies were both Alexa 594 and Alexa 647 anti-mouse IgG, and both Alexa 594 and Alexa 647 anti-rabbit IgG antibodies (Molecular Probes, Burlington, ON, Canada).

#### *Image acquisition and analysis*

For confocal images, cells were observed under a laser scanning confocal microscope (Zeiss LSM 510, Carl Zeiss, Jena, Germany) using a Zeiss Plan-Apo 63×1.40 NA oil immersion objective lens. Alexa 594 was excited with a 543-nm helium/neon laser and detected with a 560-nm band pass filter. Alexa 647 was excited with a 633-nm helium/neon and detected with a 650 long pass filter. Fifteen to twenty (15-20) 0,2 µm optical sections of individual cells were taken from the bottom to the top and projected onto one plane. Then 3D reconstruction images were obtained from all optical sections using Zeiss LSM Image Browser software 3.2 (Carl Zeiss). For the co-localization analysis 5 neurons were analyzed, adding up approximately 500 granules of each kind per sub-cellular region. One 0,2 µm optical sections from each soma was analysed, whereas normal fluorescence was used for dendrites. Staining with two different anti-Staufen 2 antibodies (rabbit polyclonal L1 and mouse monoclonal 1C6) (12) and two different anti-ZFR antibodies (mouse and rabbit polyclonal) yielded consistent results.

For epifluorescence images, cells were observed under a Nikon TE2000U using a Plan-Apo 60×1.40 NA oil immersion objective with a 1.5x lens and a CoolSnap HQ (CCD 12 bit) camera (Roper Scientific, Trenton, NJ, USA). To clear up background, images were submitted to a nearest neighbour deconvolution protocol using the MetaMorph software (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA, USA).

## RESULTS

### *Identification of ZFR as a Stau2-binding protein*

As a mean to identify and characterize putative protein partners of Stau2 that may associate in Stau2-containing mRNP in vivo, we performed a yeast two hybrid screen. To increase the probability of identifying proteins involved in the mechanism of RNA transport, we fused the N-terminal dsRBD1 and dsRBD2 of Stau2<sup>62</sup> (Stau2<sup>62</sup>-N) to the *lexA* DNA-binding domain (*lexAD*) (Fig. 1A) and used it as a bait in the yeast assay. In *Drosophila*, this Staufen region is required for the microtubule-dependent transport of *oskar* mRNA in oocyte and for anchoring *bicoid* mRNA at the anterior pole (Micklem et al., 2000). This bait was used to screen a mouse foetal brain cDNA library fused to the B42 transcription activation domain (B42AD). One positive clone identified in this screen contains a 588 nucleotides long insert corresponding to 196 amino acids located in the central region of the zinc finger protein ZFR (Fig. 1B). ZFR is a protein with three spaced C2H2 zinc fingers and a C-terminal 316-amino-acid domain, DZF, which is conserved among a small class of double stranded RNA-binding proteins (Meagher et al., 1999). The Stau2-interacting fragment (ZFR<sup>400-596</sup>) contains the third zinc finger. The *Zfr* gene is conserved in *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* and *Homo sapiens* (Kleines et al., 2001; Meagher et al., 1999).

ZFR<sup>400-596</sup> was re-cloned in fusion with the activation domain B42AD and genetically tested for specificity. We showed that *lexAD*-Stau2<sup>62</sup>-N and B42AD-ZFR<sup>400-596</sup> did not interact with the B42AD domain alone or the *lexAD* domain alone, respectively, in the yeast assay (Fig. 1C). Similarly, we showed that B42AD-ZFR<sup>400-596</sup>

did not interact with other unrelated proteins such as the *Drosophila* bicoid (LexAD-Bicoid).

*ZFR co-localizes with cytoplasmic Stau2 granules*

ZFR was described as a nuclear protein in testis and ovary (Meagher et al., 1999). Stau2 was shown to be predominantly present in large granules in the cytoplasm of the cell body and dendrites of mature hippocampal neurons (Duchaine et al., 2002; Tang et al., 2001). Recently, Stau2 was also shown to shuttle in the nucleus (Macchi et al., 2004; Miki and Yoneda, 2004). To determine the sub-cellular distribution of ZFR in neurons and get a first clue on potential site(s) of interaction with Stau2, we double-stained embryonic rat hippocampal neurons with anti-ZFR and anti-Stau2 antibodies and analyzed their sub-cellular distribution by confocal microscopy. In these cells, as observed before in other tissues, ZFR distribution was mainly nuclear (Fig. 2A, top panel). However, particulate staining was also seen in the cell body (Fig. 2B, top panel), showing that a subpopulation of ZFR is cytosolic. In this compartment, Stau2 was also found as granule-like structures (Fig. 2B, middle panel). Stau2/ZFR co-localization was evident in the cytoplasm (Fig. 2B, bottom panel, arrowheads) and in dendrites (Fig. 2C), although not all Stau2-containing granules were labelled with ZFR and not all ZFR-containing granules were labelled with Stau2 (see Table I). Interestingly, yellow dots in the nucleus suggest that ZFR/Stau2 interaction may even occur in the nucleus (Fig. 2A, insets in left panels, arrowheads).

---

*ZFR and Stau2 sediment with dense particles/organelles*

To confirm and characterize a putative interaction between Stau2 and ZFR, we then relied on biochemical approaches. We previously demonstrated that Stau2 isoforms are non-covalently associated with stable, EDTA- and detergent-resistant high density particles/organelles (Duchaine et al., 2002). To determine whether ZFR also associates with large complexes, we first prepared cytoplasmic and nuclear fractions from high density primary cultures of embryonic rat cortical neurons and demonstrated by Western blot analysis that, although mostly nuclear, a significant amount of ZFR can be detected in the cytoplasmic fraction, as observed for Stau2 (Fig. 3A). Then, cytoplasmic extracts were fractionated into S100/P100 fractions by high-speed centrifugation. Under these conditions, ZFR was found in the P100 fraction and its sedimentation was resistant to EDTA and detergent (Fig. 3B). Partial release into the S100 fraction was observed when cytoplasmic extracts were treated with 500 mM KCl or with RNase, as did Stau2 in the same conditions (Duchaine et al., 2002). Therefore, cytoplasmic ZFR is associated with dense particles/organelles and its behaviour under different conditions is similar to that of Stau2, consistent with a putative interaction between the two proteins.

*ZFR co-fractionates with Stau2 isoforms*

We previously described three Stau2 isoforms that segregated in different complexes on a sucrose density gradient: Stau2<sup>62</sup> fractionated with ribosome-free light RNPs whereas Stau2<sup>59</sup> and Stau2<sup>52</sup> isoforms co-fractionated with both ribosomes and complexes of higher density (Duchaine et al., 2002). To determine which isoform might be a putative partner of ZFR, we next fractionated cytoplasmic extracts from high density primary cultures of rat cortical neurons on a 20–60% sucrose density gradient.



Fractions were recovered and analyzed by Western blotting using anti-ZFR, anti-Stau2 and anti-ribosomal protein L7 antibodies. As seen in figure 3C, ZFR fractionated in both the ribosome-free fractions as did Stau2<sup>62</sup> and in fractions containing ribosomes as observed for Stau2<sup>59</sup>/Stau2<sup>52</sup> (Duchaine et al., 2002). Interestingly, co-fractionation of ZFR with Stau2 was not perfect, consistent with our confocal data, which suggested that not all ZFR containing granules are associated with Stau2.

*ZFR co-immunopurifies with Stau2-containing RNP*

Brain cortices from adult mouse were lysed and cytoplasmic lysates were immunoprecipitated with different immunopurified sera. Resulting immunoprecipitated products were analyzed by Western blotting. When anti-Stau2 antibodies were used for immunoprecipitation, a specific band corresponding to ZFR was clearly visible on the Western blot, suggesting that both proteins are present in common cytoplasmic complexes (Fig. 4A). In contrast, pre-immune serum (PI) and monoclonal anti-Stau2 antibody (1C6) unable to immunoprecipitate Stau2 did not immunoprecipitate ZFR (Fig. 4A, right panel). The Stau2/ZFR interaction was resistant to RNase treatments before immunoprecipitation, suggesting that RNA bridging may not be necessary to maintain ZFR/Stau2 mRNP complexes. This is consistent with the S100/P100 data that showed the release of only a very small fraction of the ZFR and Stau2 populations upon RNase treatment.

Immunoprecipitations were repeated with a human autoimmune anti-ribosomal protein P serum or, as control, a normal human serum. ZFR was clearly present in the immunoprecipitate obtained with the anti-ribosomal antibodies, and this association was RNase resistant (Fig. 4B). ZFR was not detected in precipitate obtained with the normal

serum. These results confirm the association between at least a fraction of ZFR and ribosomes and show that this interaction is not likely to be dependent on an RNA ligand.

*ZFR does not associate with Stau1*

Immunopurified polyclonal anti-Stau1 antibodies were used to determine whether ZFR and Stau1 are present in the same granules. ZFR was never observed in immunoprecipitates obtained with anti-Stau1 antibodies (Fig. 4A), showing that ZFR and Stau1 are not part of the same complexes.

*ZFR is required for Stau2<sup>62</sup> nuclear export*

To uncover a functional meaning for the Stau2/ZFR interaction, RNA interference (RNAi) approaches were developed. Three techniques aimed to induce specific *Zfr* expression knockdown were used (Fig. 5A). First, recombinant human DICER protein was incubated with a dsRNA substrate corresponding to ZFR<sup>400-596</sup> to generate a heterogeneous population of small interfering RNAs (esiRNAs). Second, a PCR based approach was used to generate a short hairpin interfering RNAs (shRNA) under the control of the U6 promoter. Third, a specific siRNA complementary to the ZFR mRNA was synthesized. The neuronal cell line N2A was used to assess RNAi efficiency using western blot against endogenous ZFR to bypass poor neuron transfection efficiency. When introduced in N2A esiRNAs (Fig. 5B), shRNA III (Fig. 5C) and siRNA (Fig. 5D) significantly reduced the level of ZFR protein. In contrast, shRNA I and shRNA II had no effect (Fig. 5C).

Rat embryonic hippocampal neurons were transfected with either a PCR-amplified DNA that expressed shRNA III (Fig. 6B), the esiRNA cocktail (Fig. 6C) or the siRNA

(Fig. 6D). Co-transfection of an eYFP-encoding plasmid allowed us to identify transfected neurons. Two days post-transfection, cells were fixed and stained with anti-Stau2 antibodies. As seen in figure 6B, transfection of DNA that induced the expression of shRNA III partially re-localized endogenous Stau2 to the nucleus (for 19 out of 21 eYFP-expressing neurons). Similar results were obtained following transfection of the DICER-generated esiRNA cocktail (Fig. 6C) or the siRNA (Fig. 6D). As control, expression of eYFP alone (Fig. 6A) or co-transfection of the shRNA I or II (not shown) did not affect the sub-cellular distribution of Stau2. Therefore, nuclear shuttling and/or exit of Stau2 from the nucleus was impaired in neurons that under-expressed ZFR.

To determine which Stau2 isoform(s) accumulated in the nucleus following downregulation of ZFR, Stau2<sup>62</sup>-HA and Stau2<sup>59</sup>-HA expressing cDNAs were transfected in neurons either alone or in the presence of shRNA III. Their sub-cellular distribution was followed two days later by immunofluorescence using anti-HA antibodies. When expressed alone, both Stau2<sup>62</sup>-HA and Stau2<sup>59</sup>-HA showed typical cytoplasmic staining with occasional nuclear granule-like labelling (Fig. 7B-C and Table II). When cDNA coding for Stau2<sup>62</sup>-HA was co-transfected with shRNA III, there was a significant increase in the percentage of cells showing nuclear labeling (Fig. 7F), suggesting a critical role for ZFR in a putative nucleo-cytoplasmic shuttling of Stau2<sup>62</sup>. In addition, the nuclear signal was rather diffuse and homogenous, suggesting that the normal localization of Stau2<sup>62</sup> in the nucleus was impaired. In contrast, downregulation of ZFR did not redistribute Stau2<sup>59</sup>-HA that was mostly expressed in the cytoplasm and excluded from the nucleus (Fig. 7E) demonstrating that the role of ZFR on Stau2 nuclear export is isoform specific. As further control, shRNA III and Stau2-HA-co-transfected neurons were further labelled with anti-Stau2 antibodies to demonstrate that, even in

cells where Stau2<sup>59</sup>-HA was restricted to the cytoplasm, endogenous Stau2 was delocalized to the nucleus following RNAi-induced ZFR downregulation (not shown).

Finally, using the same approach, we tested whether knockdown expression of ZFR modifies the sub-cellular distribution of Stau1. Since ZFR had not been detected in Stau1-containing mRNP (Fig. 4A), we expected that depletion of ZFR should not affect the sub-cellular localization of Stau1-HA. Transfected Stau1-HA showed mostly somato-dendritic distribution, with occasional nucleolar-like signal (depicted in Table II as nuclear signal and data not shown) as in (9,14,50). As expected, co-transfection of DNA coding for Stau1-HA and shRNA against ZFR did not change the distribution of Stau1-HA (Fig. 7D and Table II). As control, further staining with anti-Stau2 antibody demonstrated that endogenous Stau2 was delocalized to the nucleus (not shown). These results further support a model in which ZFR is a bona fide protein partner of Stau2.

---

## DISCUSSION

Understanding the mechanisms of mRNA transport, localization and local translation is impaired by our partial knowledge of the RNA and protein constituents of RNA granules/particles. Identification and characterization of protein partners are crucial to decipher each step of these processes. In this study, we report the identification and characterization of a Stau2-associated protein in neurons, the zinc finger protein ZFR. Confocal microscopy, immunoprecipitation and cell fractionation are all consistent with an association between Stau2 and ZFR. We also show that ZFR is specifically associated with Stau2 isoforms but not with the paralogue protein Stau1. This observation is consistent with previous reports that demonstrated that in hippocampal neurons and in oligodendrocytes Stau1 and Stau2 are components of different granule-like structures (Duchaine et al., 2002; Mallardo et al., 2003; Thomas et al., 2004). Therefore, ZFR is likely to play a specific role with Stau2-containing complexes and is not a universal partner for all types of RNA granules.

As compared to Stau2, Stau1 lacks dsRBD1 and half of dsRBD2 since its initiator methionine is found in the middle of dsRBD2. The remaining 72 amino acids of Stau1 and Stau2 dsRBD2 share 48% sequence identity. This lack of sequence conservation may explain why Stau1 fails to bind to ZFR.

---

*ZFR is an RNA/DNA-binding protein*

Analyses of ZFR knockout mice indicate that ZFR is essential for at least some developmental pathways since embryonic death occurs by 8 to 9 days of gestation (Meagher and Braun, 2001). In homozygotes, genetic ablation of ZFR causes increased embryonic cell death and/or decreased cell proliferation rates (Meagher and Braun, 2001). In adults, ZFR is highly expressed in brain, ovary and testis but weaker expression is detected in other tissues as well (Kleines et al., 2001; Meagher et al., 1999). ZFR contains three widely spaced zinc finger domains. Zinc finger proteins with a similar pattern of zinc finger motifs are known to bind RNA, DNA and DNA/RNA hybrids (Finerty, Jr. and Bass, 1997). Although ZFR endogenous substrates in the cells are still unknown, in vitro binding assays demonstrate that it has the capacity to bind both RNA and DNA (Meagher et al., 1999). In the cells, ZFR is found in the nucleus in association with chromosomes (Meagher et al., 1999). It was thus suggested that ZFR could be involved in DNA repair and chromosome organization and/or alternatively, that it could interact with nascent RNA at the site of transcription and be part of a complex regulating RNA processing (Meagher et al., 1999). Its association with Stau2 in the nucleus is consistent with the latter hypothesis.

Other nucleic acid-binding proteins display similar duality for binding RNA and DNA. Translin/TB-RBP was first identified as a DNA-binding protein at the breakpoint junctions of chromosomal translocations in lymphoid malignancies (Aoki et al., 1995). Then, Translin was shown to specifically bind mRNA containing a Y-box sequence (Han et al., 1995a) and associate with microtubules and dendritically localized mRNPs in hippocampal neurons (Han et al., 1995b; Wu and Hecht, 2000). Similarly, pur  $\alpha$  and

its isoform  $\beta$ , two single-stranded DNA- and RNA-binding proteins, have been implicated both in the control of DNA replication and transcription (Bergemann and Johnson, 1992; Stacey et al., 1999; Zambrano et al., 1997) and in the dendritic localization of BC1 RNA to microtubules (Ohashi et al., 2000). Interestingly, interaction between  $\beta$  proteins and BC1 RNA is regulated by Translin/TB-RBP, the binding mode of these two classes of proteins to the BC1 RNA being mutually exclusive (Ohashi et al., 2000).

*ZFR is associated with Stau2-containing RNPs*

In hippocampal neurons, Stau2 isoforms are associated with both ribosome-free complexes and ribosome-associated granules (Duchaine et al., 2002; Mallardo et al., 2003). Biochemical fractionation and immunoprecipitation of Stau2-containing complexes demonstrate that ZFR is also associated with both types of granules/particles, suggesting that ZFR associates with different Stau2 isoforms. As compared to Stau2<sup>62</sup>, the Stau2<sup>59</sup> isoform lacks the N-terminal half of dsRBD1. As the bait used in the two-hybrid assay contained dsRBD1 and dsRBD2, the observed biochemical fractionation suggests that ZFR interacts either with the C-terminal part of dsRBD1, the interdomain or with dsRBD2.

In the neuron somatodendritic compartment, ZFR is not always present in Stau2-containing complexes suggesting that ZFR might define a sub-population of Stau2-containing granules. It is believed that somatic granules represent a pool of stalled granules awaiting proper signals for RNA transport and/or interaction with RNA ligand/protein partners (Kohrmann et al., 1999; Mallardo et al., 2003). In this model, ZFR could play a crucial role in providing one of the aforementioned signals to first

permit nuclear export and second, dendritic transport of Stau2-containing granules (see below). These results emphasize the idea that mRNA transport is a dynamic process involving multiple RNPs and that the composition of RNPs serves specific successive or complementary functions during mRNA transport (Carson et al., 2001; Keene and Tenenbaum, 2002).

*ZFR is essential for the nucleo-cytoplasmic shuttling of Stau2<sup>62</sup>*

In neurons, ZFR is expressed not only in the nucleus but also in the cytoplasm where it forms granule-like structures. The presence of ZFR in both the nuclear and cytoplasmic compartments suggests that the protein may shuttle between these two compartments. Interestingly, ZFR contains a putative nuclear export signal (NES) (Shim et al., 2002) and two putative nuclear localization signals (NLS) (Meagher et al., 1999), which are found inside and flanking the DZF domain, respectively. These signals could be responsible for the observed nucleo-cytoplasmic distribution of ZFR protein in hippocampal neurons. Similarly, Stau2 contains a NLS and, although mainly cytoplasmic, it may transit through the nucleus (this paper and (Macchi et al., 2004; Miki and Yoneda, 2004)). Interestingly, down regulation of ZFR favours a nuclear redistribution of the Stau2<sup>62</sup> isoform. This nuclear retention is isoform specific as it does not affect the shorter Stau2<sup>59</sup> isoform and gene specific as it does not affect Stau1. This Stau2<sup>62</sup> phenotype following ZFR down regulation was obtained with three different RNAi approaches (shRNA, esiRNA and siRNA) that targeted three non-overlapping sites of the ZFR mRNA. As such, we diminished the probability of an off-target gene silencing effect. This result suggests that ZFR/Stau2<sup>62</sup> association may first occur in the nucleus and that ZFR is required for the nuclear exit of the complex. This would be



consistent with recent data with other RNA-binding proteins that indicate that initial steps of RNA recognition and/or packaging of mRNP complexes to be transported in the cytoplasm occur in the nucleus (Hoek et al., 1998; Larocque et al., 2002; Long et al., 2001; Oleynikov and Singer, 2003).

We hypothesize that ZFR first interacts with Stau2<sup>62</sup> in the nucleus. The affinity of ZFR for DNA, RNA and RNA/DNA hybrids may play a significant role in the selection of specific nascent mRNAs at the site of transcription in the nucleus and in their presentation to Stau2<sup>62</sup>. The ZFR/Stau2<sup>62</sup>/mRNA complexes then exit the nucleus, likely via the exportin-5 pathway (Macchi et al., 2004). Therefore, down regulation of ZFR should affect RNA transport of specific Stau2-bound RNAs. Identification of a specific endogenous Stau2<sup>62</sup> RNA ligand will be necessary to test this hypothesis. It will be interesting to determine whether this reduced distribution of Stau2<sup>62</sup> and Stau2<sup>62</sup>-bound RNAs in the cytoplasm contributes to the lethal phenotype of ZFR knockout mice.

In contrast, it is not clear whether the initial association between ZFR and Stau2<sup>59</sup>/Stau2<sup>52</sup> occurs in the nucleus or not. The observation that Stau259 nuclear export is mediated, not only by its dsRBD3 but also by its specific N-terminal sequence that interacts with components of the CRM1 dependent pathway (Macchi et al., 2004; Miki and Yoneda, 2004) may explain why down regulation of ZFR does not affect Stau259 nuclear export. Alternatively, their association might only occur in the cytoplasm. In the cytoplasm, a fraction of ZFR associates with ribosomes, maybe through binding to Stau2<sup>59</sup>/Stau2<sup>52</sup>. In these complexes, ZFR may stabilize RNA or regulate their translation; further experiments are needed to clarify this.

Molecular characterization of Staufen in different species has demonstrated its capacity to establish protein interactions during localization. Oskar, Miranda and

---

Inscuteable have been shown to interact with Staufen in *Drosophila* (Li et al., 1997; Micklem et al., 2000; Schuldt et al., 1998), and protein phosphatase-I (PP1) and Barentz with Stau1 in mammals (Macchi et al., 2003; Monshausen et al., 2002). We now show that ZFR interacts with Stau2. The presence of Zfr and of Staufen genes in humans, nematode and flies suggests that the ZFR-Staufen association might be evolutionarily conserved. Whether ZFR associates with Staufen in other species is still unknown. As the null mutation of Zfr in mouse is lethal (Meagher and Braun, 2001), it is surprising that mutation of the ZFR homologs in *Drosophila* or *C. elegans* have not been reported in the studies of development. It is likely that the different Staufen isoforms in mammals have acquired specialized functions during evolution, which are not necessary for fly development. Analysis of Zfr or Zfr/Staufen mutations in the invertebrate model organisms may contribute to our understanding of this ZFR/Stau2 association.

---

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Thomas Duchaine for his help with the gradients, Louise Cournoyer for technical assistance with cell cultures, Francis Goyette for the construction of expression vectors and Dominique Nouel for the acquisition of confocal images. We also thank Dr M. Reichlin (Oklahoma Medical Research Foundation, USA) and Dr R.E. Braun (Washington, USA) for the human anti-ribosomal P antibodies and the rabbit polyclonal anti-ZFR antibodies, respectively, Dr G. Ferbeyre for the RNAi PCR SHAG strategy and Dr M.A. Kiebler for critical reading of the manuscript. This work was supported by a Canadian Institutes for Health Research (CIHR) grant to LDG.

---

Reference List

- Aoki K., Suzuki K., Sugano T., Tasaka T., Nakahara K., Kuge O., Omori A., and Kasai M. (1995) A novel gene, Translin, encodes a recombination hotspot binding protein associated with chromosomal translocations. *Nat Genet* **10**, 167-174.
- Banker G. and Goslin K. (1988) Developments in neuronal cell culture. *Nature* **336**, 185-186.
- Bannai H., Fukatsu K., Mizutani A., Natsume T., Iemura S. I., Ikegami T., Inoue T., and Mikoshiba K. (2004) An RNA-interacting Protein, SYNCRIP (Heterogeneous Nuclear Ribonuclear Protein Q1/NSAP1) Is a Component of mRNA Granule Transported with Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1 mRNA in Neuronal Dendrites. *J Biol Chem* **279**, 53427-53434.
- Bar-Peled M. and Raikhel N. V. (1996) A method for isolation and purification of specific antibodies to a protein fused to the GST. *Anal Biochem* **241**, 140-142.
- Bergemann A. D. and Johnson E. M. (1992) The HeLa Pur factor binds single-stranded DNA at a specific element conserved in gene flanking regions and origins of DNA replication. *Mol Cell Biol* **12**, 1257-1265.
- Brendel C., Rehbein M., Kreienkamp H. J., Buck F., Richter D., and Kindler S. (2004) Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem J* **384**, 239-246.
- Carson J. H., Cui H., and Barbarese E. (2001) The balance of power in RNA trafficking. *Curr Opin Neurobiol* **11**, 558-563.

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**, 3285-3295.

Finerty P. J., Jr. and Bass B. L. (1997) A *Xenopus* zinc finger protein that specifically binds dsRNA and RNA-DNA hybrids. *J Mol Biol* **271**, 195-208.

Han J. R., Gu W., and Hecht N. B. (1995a) Testis-brain RNA-binding protein, a testicular translational regulatory RNA-binding protein, is present in the brain and binds to the 3' untranslated regions of transported brain mRNAs. *Biol Reprod* **53**, 707-717.

Han J. R., Yiu G. K., and Hecht N. B. (1995b) Testis/brain RNA-binding protein attaches translationally repressed and transported mRNAs to microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9550-9554.

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**, 7021-7029.

Kanai Y., Dohmae N., and Hirokawa N. (2004) Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* **43**, 513-525.

Keene J. D. and Tenenbaum S. A. (2002) Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. *Mol Cell* **9**, 1161-1167.

Kiebler M. A. and DesGroseillers L. (2000) Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron* **25**, 19-28.

Kiebler M. A., Hemraj I., Verkade P., Kohrmann M., Fortes P., Marion R. M., Ortin J., and Dotti C. G. (1999) The mammalian stau2 protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J Neurosci* **19**, 288-297.

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**, 403-412.

Kleines M., Gartner A., Ritter K., and Schaade L. (2001) Cloning and expression of the human single copy homologue of the mouse zinc finger protein zfr. *Gene* **275**, 157-162.

Knowles R. B., Sabry J. H., Martone M. E., Deerinck T. J., Ellisman M. H., Bassell G. J., and Kosik K. S. (1996) Translocation of RNA granules in living neurons. *J Neurosci* **16**, 7812-7820.

Kohrmann M., Luo M., Kaether C., DesGroseillers L., Dotti C. G., and Kiebler M. A. (1999) Microtubule-dependent recruitment of Staufin-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol Biol Cell* **10**, 2945-2953.

Krichevsky A. M. and Kosik K. S. (2001) Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron* **32**, 683-696.

Krichevsky A. M. and Kosik K. S. (2002) RNAi functions in cultured mammalian neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11926-11929.

Larocque D., Pilotte J., Chen T., Cloutier F., Massie B., Pedraza L., Couture R., Lasko P., Almazan G., and Richard S. (2002) Nuclear retention of MBP mRNAs in the quaking viable mice. *Neuron* **36**, 815-829.

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**, 437-447.

Long R. M., Gu W., Meng X., Gonsalvez G., Singer R. H., and Chartrand P. (2001) An exclusively nuclear RNA-binding protein affects asymmetric localization of ASH1 mRNA and Ash1p in yeast. *J Cell Biol* **153**, 307-318.

Macchi P., Brownawell A. M., Grunewald B., DesGroseillers L., Macara I. G., and Kiebler M. A. (2004) The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Stauf2: nucleolar accumulation and isoform-specific exportin-5-dependent export. *J Biol Chem* **279**, 31440-31444.

Macchi P., Kroening S., Palacios I. M., Baldassa S., Grunewald B., Ambrosino C., Goetze B., Lupas A., St Johnston D., and Kiebler M. (2003) Barentsz, a new component of the Staufen-containing ribonucleoprotein particles in mammalian cells, interacts with Staufen in an RNA-dependent manner. *J Neurosci* **23**, 5778-5788.

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**, 2100-2105.

---

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**, 2212-2219.

Meagher M. J. and Braun R. E. (2001) Requirement for the murine zinc finger protein ZFR in perigastrulation growth and survival. *Mol Cell Biol* **21**, 2880-2890.

Meagher M. J., Schumacher J. M., Lee K., Holdcraft R. W., Edelhoff S., Disteché C., and Braun R. E. (1999) Identification of ZFR, an ancient and highly conserved murine chromosome-associated zinc finger protein. *Gene* **228**, 197-211.

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**, 1366-1377.

Miki T. and Yoneda Y. (2004) Alternative splicing of Staufen2 creates the nuclear export signal for CRM1 (Exportin 1). *J Biol Chem* **279**, 47473-47479.

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**, 557-564.

Ohashi S., Kobayashi S., Omori A., Ohara S., Omae A., Muramatsu T., Li Y., and Anzai K. (2000) The single-stranded DNA- and RNA-binding proteins pur alpha and pur beta link BC1 RNA to microtubules through binding to the dendrite-targeting RNA motifs. *J Neurochem* **75**, 1781-1790.



- 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**, 37804-37810.
- 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.
- Paddison P. J., Caudy A. A., Sachidanandam R., and Hannon G. J. (2004) Short hairpin activated gene silencing in mammalian cells. *Methods Mol Biol* **265**, 85-100.
- 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**, 1847-1857.
- Shim J., Lim H., Yates R., and Karin M. (2002) Nuclear export of NF90 is required for interleukin-2 mRNA stabilization. *Mol Cell* **10**, 1331-1344.
- 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.
- Stacey D. W., Hitomi M., Kanovsky M., Gan L., and Johnson E. M. (1999) Cell cycle arrest and morphological alterations following microinjection of NIH3T3 cells with Pur alpha. *Oncogene* **18**, 4254-4261.
- Steward O. and Worley P. F. (2001) A cellular mechanism for targeting newly synthesized mRNAs to synaptic sites on dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7062-7068.

Tang S. J., Meulemans D., Vazquez L., Colaco N., and Schuman E. (2001) A role for a rat homolog of stau2 in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron* **32**, 463-475.

Thomas M. G., Martinez Tosar L. J., Loschi M., Pasquini J. M., Correale J., Kindler S., and Boccaccio G. L. (2004) Stau2 Recruitment into Stress Granules Does Not Affect Early mRNA Transport in Oligodendrocytes. *Mol Biol Cell*.

Villace P., Marion R. M., and Ortin J. (2004) The composition of Stau2-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* **32**, 2411-2420.

Wickham L., Duchaine T., Luo M., Nabi I. R., and DesGroseillers L. (1999) Mammalian stau2 is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* **19**, 2220-2230.

Wu X. Q. and Hecht N. B. (2000) Mouse testis brain ribonucleic acid-binding protein/translin colocalizes with microtubules and is immunoprecipitated with messenger ribonucleic acids encoding myelin basic protein, alpha calmodulin kinase II, and protamines 1 and 2. *Biol Reprod* **62**, 720-725.

Zambrano N., De Renzis S., Minopoli G., Faraonio R., Donini V., Scaloni A., Cimino F., and Russo T. (1997) DNA-binding protein Pur alpha and transcription factor YY1 function as transcription activators of the neuron-specific FE65 gene promoter. *Biochem J* **328 ( Pt 1)**, 293-300.

---

Table I: Co-localization of ZFR and Stau2 in the somatodendritic compartment of hippocampal neurons in culture

---

|          | ZFR/Stau2 | Stau2/ZFR |
|----------|-----------|-----------|
| Soma     | 34 ± 6    | 29 ± 5    |
| Proximal | 21 ± 9    | 27 ± 12   |
| Distal   | 14 ± 12   | 14 ± 11   |

---

Co-localization is expressed as the percentage of double stained granules relative to the total number of granules positive for a single marker. Data included quantification in soma, proximal dendrites (10-50  $\mu\text{m}$  from cell body) and distal dendrites (60-100  $\mu\text{m}$  from cell body).

---

Table II: Nuclear localization of HA-tagged Stau proteins following down regulation of ZFR by RNAi (1)

|                         | CTL   | siRNA                        | esiRNA                       | shRNA                        |
|-------------------------|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Stau1-HA                | 44 ± 5 <sup>(2)</sup><br>(115) <sup>(3)</sup> | 42 ± 4 <sup>ns</sup><br>(52) | 38 ± 6 <sup>ns</sup><br>(33) | 38 ± 4 <sup>ns</sup><br>(31) |
| Stau2 <sup>62</sup> -HA | 26 ± 8<br>(64)                                | 64 ± 3 <sup>*</sup><br>(35)  | 70 ± 7 <sup>*</sup><br>(38)  | 77 ± 3 <sup>*</sup><br>(74)  |
| Stau2 <sup>59</sup> -HA | 18 ± 2<br>(48)                                | 11 ± 7 <sup>ns</sup><br>(24) | 31 ± 6 <sup>ns</sup><br>(29) | 30 ± 3 <sup>ns</sup><br>(31) |

<sup>1</sup> Nuclear localization is expressed as the percentage of neurons showing Stau nuclear staining relative to the total number of transfected cells.

<sup>2</sup> Each value is derived from n = 3 independent transfections.

<sup>3</sup> Total number of transfected cells is shown in parantheses.

\* = p < 0,05 (unpaired *t* test of RNAi result vs CTL).

<sup>ns</sup> = statistically non significant.

---

**FIGURE LEGENDS**

Figure 1. ZFR400-596 interacts in yeast with the N-terminal fragment of Stau2. A, Schematic representations of Stau2 and of its N-terminal fragment. Stau2 (GeneBank Accession Number AF459099) contains 4 dsRBDs (boxes) and a putative tubulin binding domain (hatched box). dsRBD3 is the major dsRNA-binding domain (black box). The N-terminal fragment of Stau2 (Stau262-N), fused to the DNA binding domain of LexA and used as bait in a yeast two-hybrid assay, starts at the endogenous ATG codon and contains Stau2<sup>62</sup> dsRBD1 and dsRBD2. B, Schematic representations of ZFR and of its Stau2-binding domain. ZFR (GenBank accession no NM\_011767.1) contains 3 zinc fingers (ovals), a DZF domain conserved among several dsRNA binding proteins (white box), putative NLS (dark stars) and NES (white star). ZFR400-596 was isolated in the yeast assay for its ability to interact with Stau2<sup>62</sup>-N, therefore inducing yeast survival and  $\beta$ -Gal activity. ZFR400-596 encodes the central portion of ZFR that encompasses amino acids 400-596 and contains the third zinc finger. C, Results of the yeast survival assay on growth restrictive plates (Leucine -) using different combinations of baits and preys.

Figure 2. ZFR and Stau2 form somato-dendritic granule-like structures. 15 D.I.V. rat embryonic hippocampal neurons were fixed and labelled with rabbit anti-ZFR (upper panels; green) or mouse monoclonal anti-Stau2 (middle panels; red) antibodies and observed under a confocal microscope. The superposition of both red and green signals is demonstrated by a yellow coloration (lower panels). A, ZFR is mainly present in the nucleus but is also visible as granule-like structures in the cytoplasm that partially co-

localize with Stau2 granules. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ . Insets, Zoomed images of the nucleus. Some Stau2/ZFR co-localization can be observed (arrowheads). **B**, Zoomed images of **A** panels showing ZFR and Stau2 cytoplasmic co-localization (arrowheads). Scale bar = 5  $\mu\text{m}$ . **C**, Dendrites also show some ZFR and Stau2 granule co-localization (arrows). Scale bar = 5  $\mu\text{m}$ .

**Figure 3.** ZFR is associated with distinct cytoplasmic Stau2 mRNP complexes. Rat cortical neurons were grown in culture for 12 days before being lysed and homogenized. **A**, Cytoplasmic and nuclear extracts were separated by low speed centrifugation and equal amounts of protein extracts were probed by Western blotting with anti-ZFR, anti-Stau2, anti-ribosomal protein P0 and anti-histone H1 antibodies, as indicated. **B**, Cytoplasmic extract was prepared and loaded on a discontinuous 20-60% sucrose gradient. Fractions were collected and probed with mouse polyclonal anti-ZFR, monoclonal anti-Stau2 or anti-L7 antibodies, as indicated. R, ribosomes.

**Figure 4.** Co-immunoprecipitation of ZFR with Stau2 and ribosomes. For immunoprecipitation, cytoplasmic extracts prepared from brain cortex were incubated with antibodies in the presence (+) or absence (-) of RNase. **A**, Immunopurified rabbit anti-Stau2 or anti-Stau1 antibodies (left panel) and control rabbit pre-immune (PI) or monoclonal anti-Stau2 (1C6) sera that do not immunoprecipitate Stau2 (right panel) were used for immunoprecipitation. Co-immunopurified proteins were analyzed by Western blotting with mouse or rabbit anti-ZFR, monoclonal anti-Stau2, mouse polyclonal anti-Stau1 and mouse anti-ribosomal protein L7 antibodies. Asterisks point to IgG. **B**, Normal human (NHS) or autoimmune anti-ribosomal P<sub>0</sub> sera were used for

immunoprecipitation. Pellets were analyzed by Western blotting with rabbit anti-ZFR and mouse anti-L7 antibodies.

**Figure 5.** Downregulation of ZFR expression by RNAi. *A*, Schematic representation of ZFR and of silencing RNAs. RNAi-inducing molecules are positioned below ZFR mRNA. Position in nucleotides: shRNA I, 23-51; shRNA II, 1919-1947; shRNA III, 767-795; esiRNA, 1200-1788; siRNA, 3116-3138. Symbols are as described in the legend of Figure 1. *B,C,D*, The neuronal N2A cell line was transfected with RNAi-inducing molecules, as indicated. Forty-eight hours post transfection, cells were lysed and ZFR expression was analyzed by Western blotting and normalized to the expression of endogenous calnexin (CNX). Cells were transfected with increasing concentrations of the esiRNA cocktail generated by in vitro digestion of the ZFR dsRNA with DICER (**B**); 200 ng/ml of PCR product encoding shRNA I, shRNA II or shRNA III (**C**) or 10 nM of siRNA (**D**). Expression of ZFR, after normalization with calnexin expression, is indicated below the blots (%).

**Figure 6.** Nuclear accumulation of endogenous Stau2 following downregulation of ZFR by RNAi. Embryonic rat hippocampal neurons were co-transfected at 5 D.I.V. with a cDNA encoding YFP as a marker for transfected cells and either the DNA coding for shRNA, the esiRNA cocktail or the siRNA. Neurons were fixed 48h post-transfection, observed for eYFP autofluorescence (left panels) and stained with anti-Stau2 antibodies to detect endogenous Stau2 and observed under a confocal microscope (right panels). *A*, Expression of eYFP alone did not affect the distribution of endogenous Stau2. The shRNA III molecules (**B**), the DICER-generated esiRNA cocktail (**C**) and the siRNA

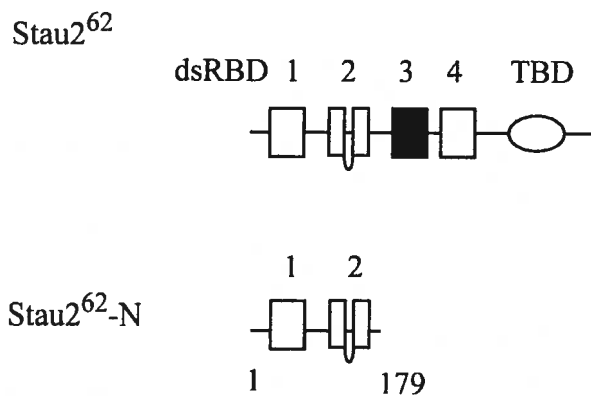
**(D)** induced nuclear accumulation of endogenous Stau2. shRNA I and shRNA II had no effect (not shown). Scale bar = 10  $\mu$ m.

**Figure 7.** Specific nuclear accumulation of Stau2<sup>62</sup>-HA following downregulation of ZFR by RNAi. Embryonic rat hippocampal neurons were transfected at 5 D.I.V. and fixed 48h later. **A-C**, Co-transfection of eYFP cDNA as a marker for transfection and of cDNA coding for Stau1-HA (A), Stau2<sup>59</sup>-HA (B) or Stau2<sup>62</sup>-HA (C). Somatodendritic distribution of the proteins was observed. **D-F**, Co-transfection of shRNA III and either Stau1-HA (D), Stau2<sup>59</sup>-HA (E) or Stau2<sup>62</sup>-HA (F). In contrast to Stau1-HA and Stau2<sup>59</sup>-HA, Stau2<sup>62</sup>-HA was observed in the nucleus. Left panels: expression of YFP. Middle panels: Staufen-HA detected with anti-HA antibodies. Right panels: nuclear staining with DAPI. Scale bar = 10  $\mu$ m.

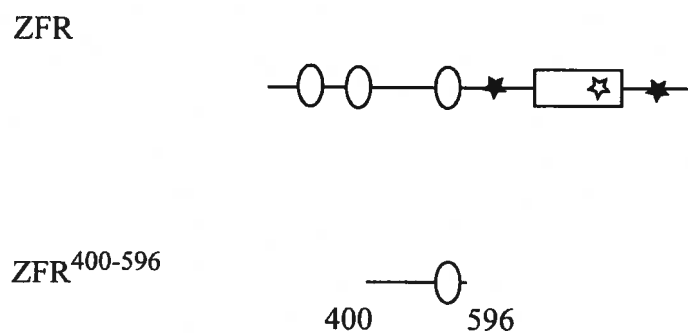


Figure 1

A



B



C

|                              | B42AD | B42AD-ZFR <sup>400-596</sup> |
|------------------------------|-------|------------------------------|
| lexAD                        | -     | -                            |
| lexAD-Stau2 <sup>62</sup> -N | -     | +                            |
| lexAD-Bicoid                 | -     | -                            |

Figure 2

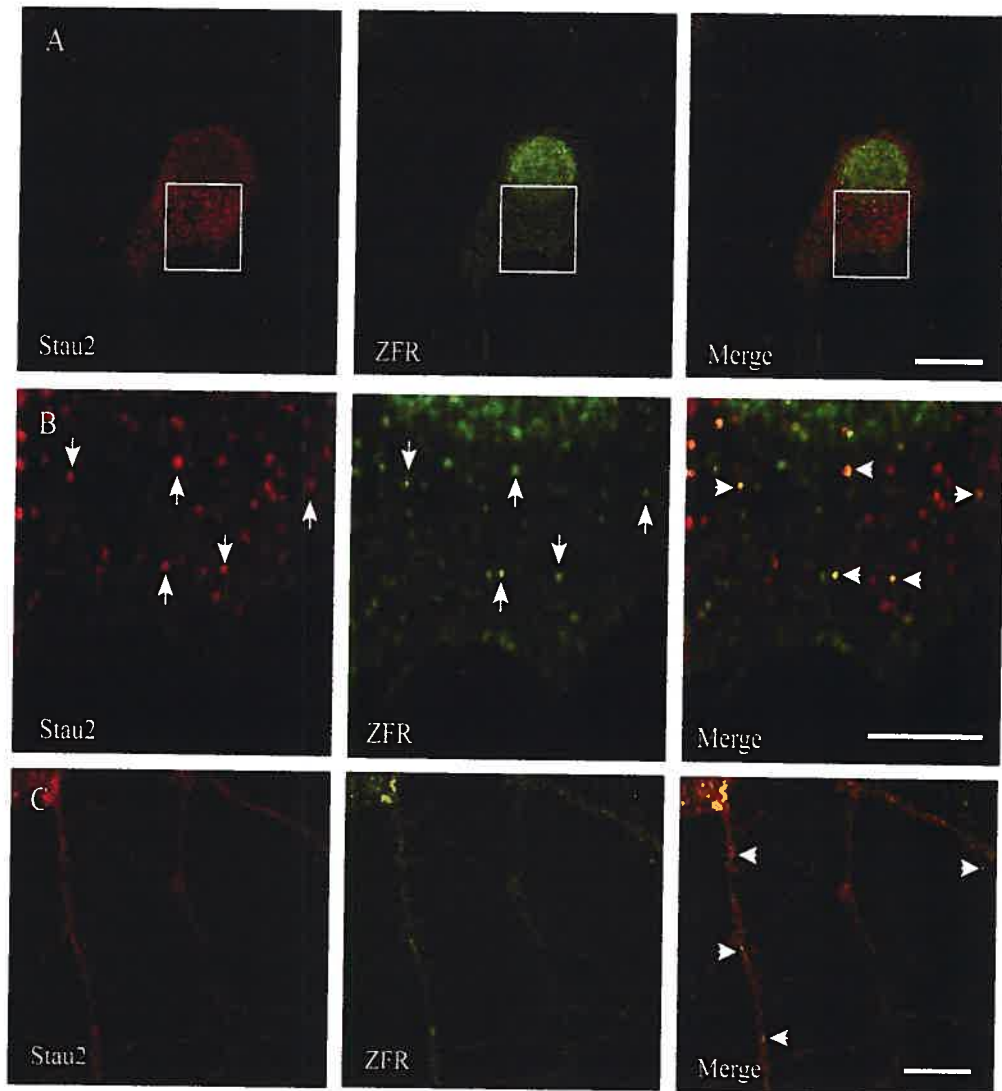


Figure 3

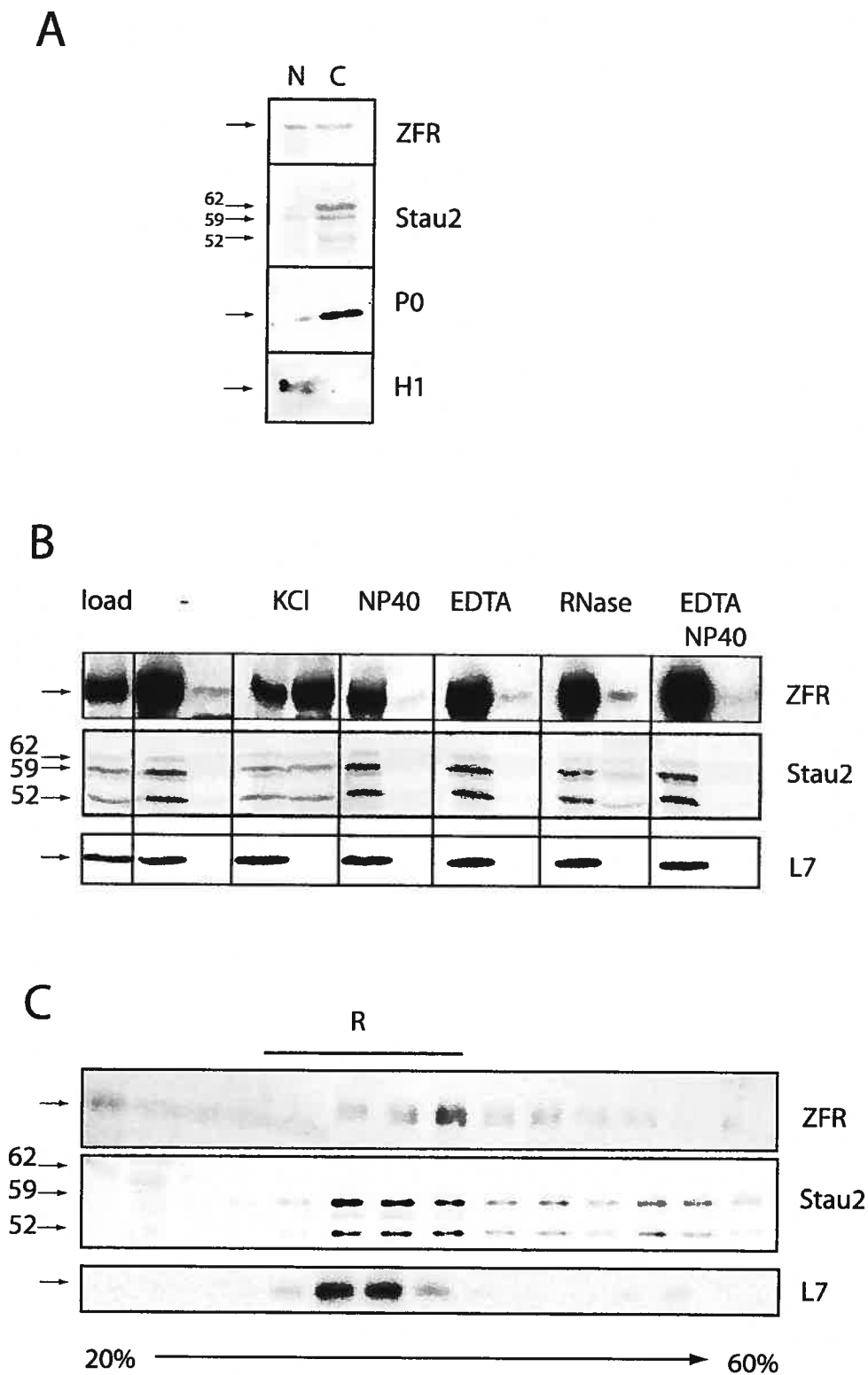
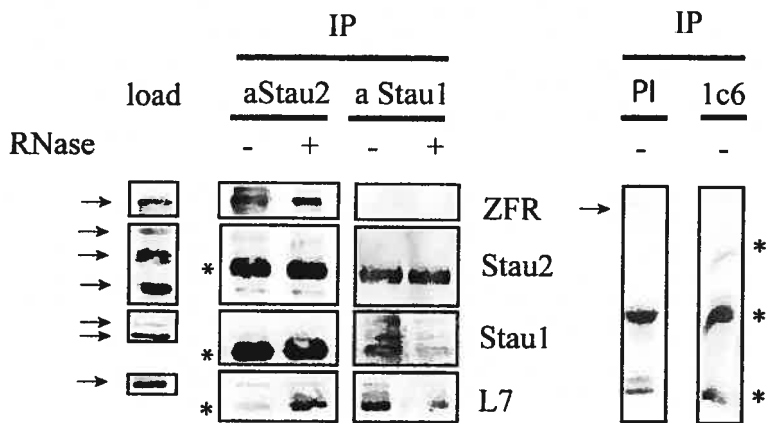


Figure 4

A



B

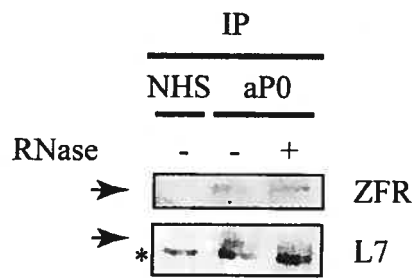
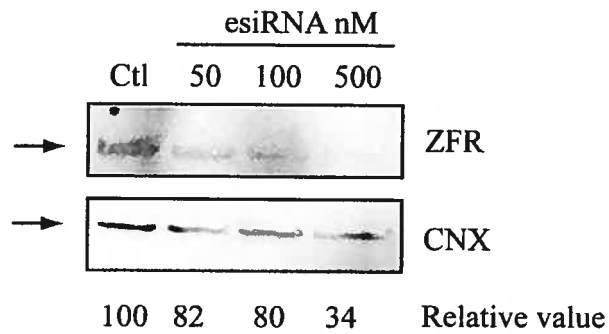


Figure 5

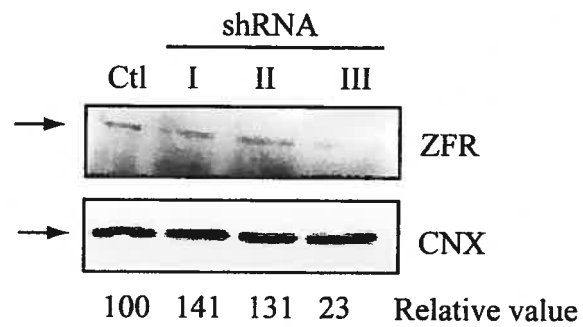
A



B



C



D

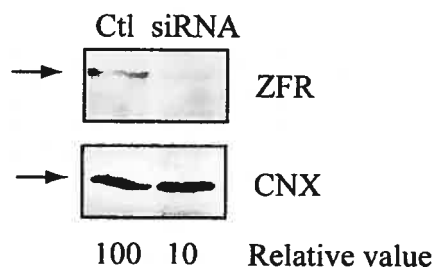


Figure 6

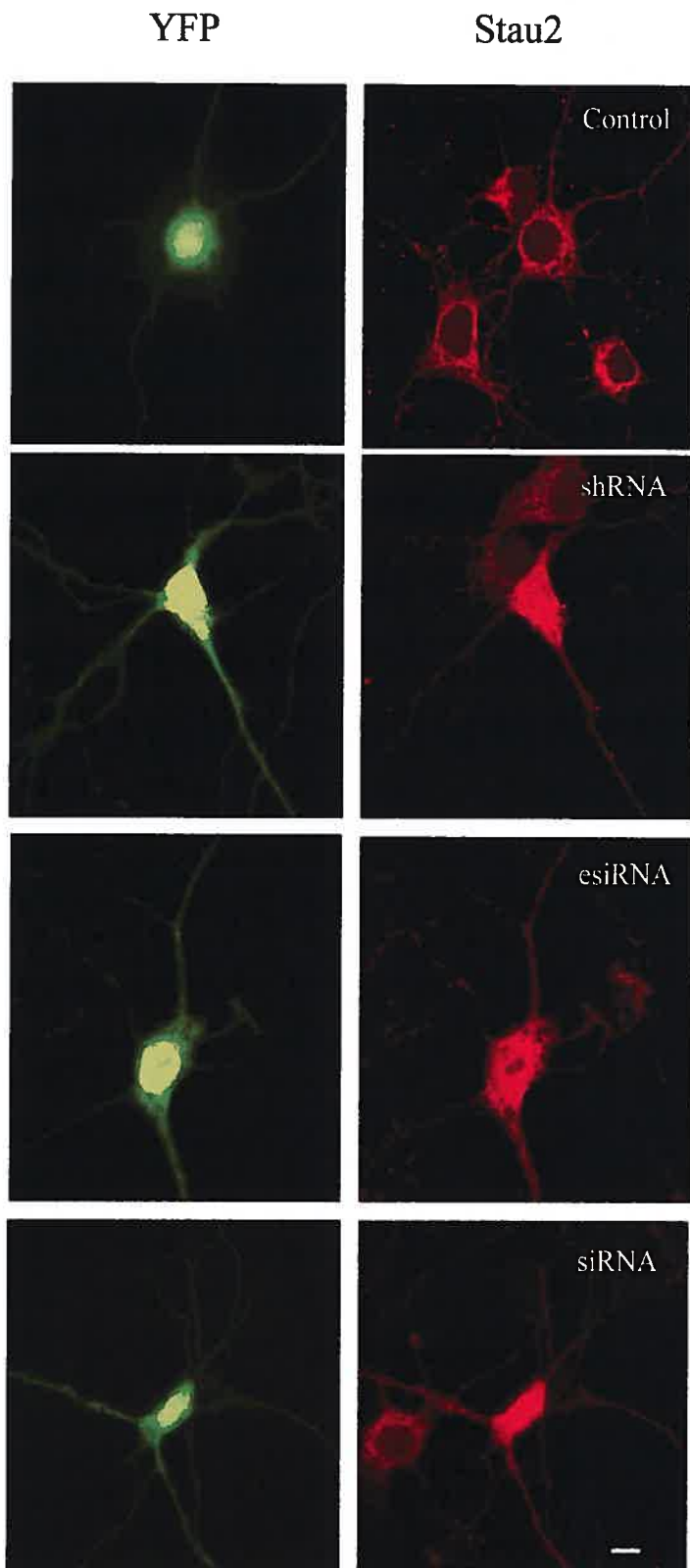
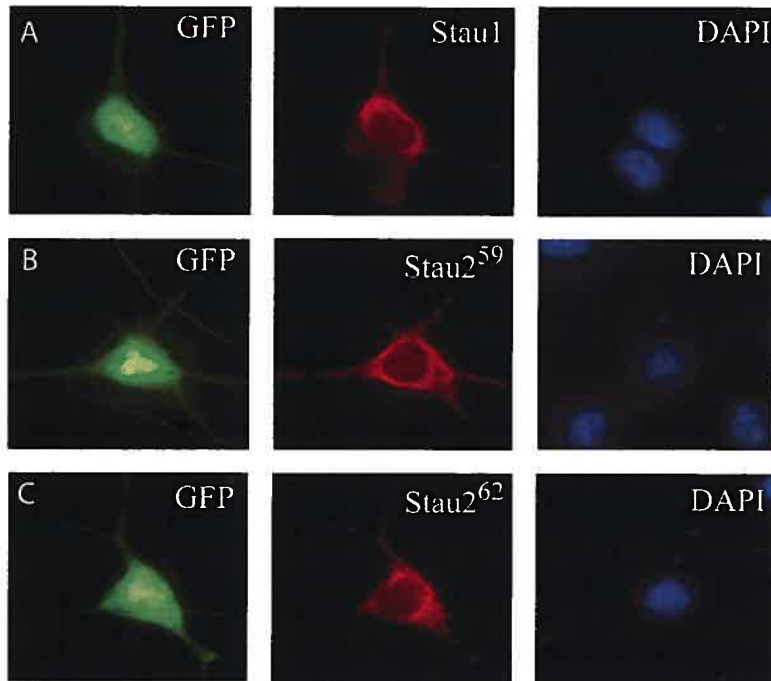
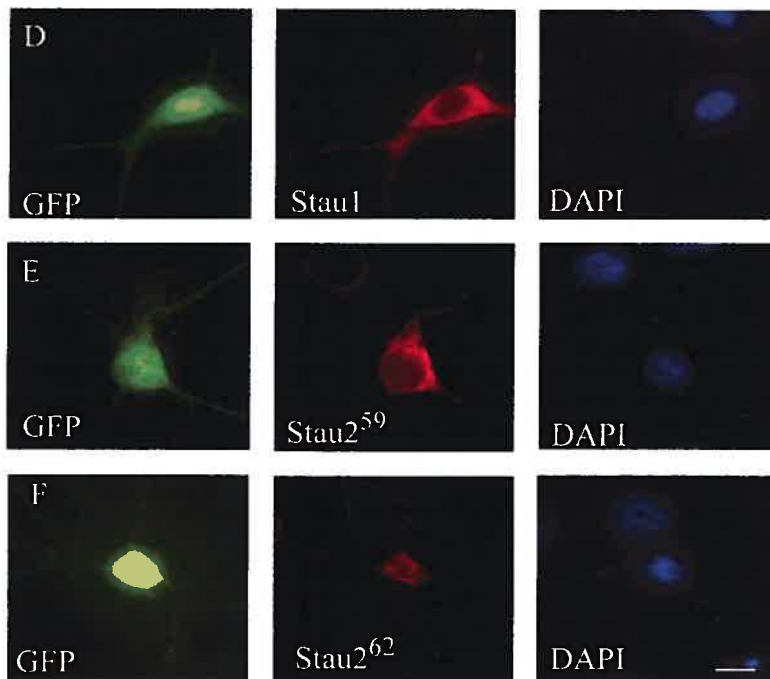


Figure 7

## Control



## ZFR shRNA



---

# 4

## DISCUSSION

---

Les travaux présentés dans cette thèse (sections 3-Résultats et 5-Annexe) ont soulevé de nouveaux thèmes et de nouvelles avenues de recherches pour élucider les mécanismes de transport et de localisation des complexes RNP dendritiques dans les neurones de mammifères. Ils ont également permis de développer de nouveaux outils pour poursuivre la recherche plus avant.

### 4.1. Purification de granules d'ARN embryonnaires

Nos travaux ont premièrement mené à l'établissement d'un protocole d'enrichissement de structures amorphes riches en ribosomes qui pourraient être des granules d'ARN impliqués dans le transport et la localisation dendritique d'ARNm. Par la suite, nous avons procédé à l'identification par une approche de type protéomique des composants protéiques de ces granules d'ARN potentiels.

L'idée à l'origine de cette étude fut la constatation que des protéines ribosomiques ainsi que des protéines liant l'ARN, contaminaient une préparation classique de CCV (*clathrin coated vesicles*) obtenue à partir de cerveaux adultes de rat (Blondeau et al., 2004) ou de cellules HeLa (Hirst et al., 2004). Or, lorsque ce protocole fut appliqué avec des cerveaux embryonnaires de rat, des amas denses ressemblant aux granules d'ARN décrits par l'équipe du Dr Kosik (Knowles et al., 1996; Krichevsky and Kosik, 2001) ont



été détectés par microscopie électronique dans les fractions enrichies en CCV/protéines qui lient l'ARN/protéines ribosomiques. Nous croyons que ces amas représentent les structures ou granules permettant le transport et la localisation d'ARN dendritiques (Bassell et al., 1998; Knowles et al., 1996; Kosik and Krichevsky, 2002).

Nous avons donc procédé à l'enrichissement de ces structures enrichies en ribosomes à partir d'une préparation classique de CCV. Pour ce faire, nous avons premièrement éliminé la co-purification de polysomes et de ribosomes libres qui pourraient contaminer la fraction de granules d'ARN en utilisant une ultracentrifugation brève au travers d'un gradient de saccharose. Par la suite, nous avons exploité la sensibilité des complexes RNP ribosomiques à l'EDTA, un agent chélateur des ions  $Mg^{2+}$ , afin de dissocier les sous-unités ribosomiques contenues dans le culot de granules d'ARN permettant ainsi la séparation des CCV et des structures riches en ribosomes sur un gradient de saccharose.

Au moment de soumettre la préparation enrichie en granules d'ARN à l'analyse protéomique, les constituants protéiques des CCV étaient connus de nos collaborateurs (Blondeau et al., 2004). La liste exhaustive des composants protéiques des CCV a ainsi facilité l'analyse du protéome issu de la préparation de granules d'ARN en permettant d'écarter les contaminants issus des CCV.

#### **4.2. Authenticité de la préparation analysée**

Un aspect critique lors d'analyse de type protéomique est de s'assurer de la spécificité ou de l'homogénéité de l'échantillon soumis à l'analyse. Ainsi, nous devons faire la preuve que les fractions du gradient de saccharose soumises à l'analyse contenaient principalement des granules d'ARN *avant* de procéder à une analyse de type

protéomique. En réponse à cet impératif nous montrons dans la préparation de granules d'ARN :

1. par RT-PCR semi-quantitative un enrichissement en l'ARN transporté  $\beta$ -actine comparativement à l'ARN non transporté  $\gamma$ -actine
2. par microscopie électronique la présence d'amas électroniquement denses dont l'aspect est caractéristique des granules d'ARN décrits par l'équipe du Dr Kosik (Knowles et al., 1996; Krichevsky and Kosik, 2001)
3. par microscopie électronique et par immunobuvardage la présence de protéines impliquées dans le transport de l'ARN sur les amas denses et dans les fractions du gradient de saccharose leur correspondant

Cependant, nous ne pouvons fournir d'explication quant à la présence de ces amas électroniquement denses dans la préparation de CCV. Cette préparation classique (Maycox et al., 1992) permet d'enrichir des CCV, mais contient également quelques contaminants tels que des ribosomes (Blondeau et al., 2004; Hirst et al., 2004), des protéines qui lient l'ARN (Blondeau et al., 2004; Wasiak et al., 2002), des membranes lisses (réticulum lisse et CCV ayant perdu les chaînes de clathrine) ainsi que des particules de glycogène (Hirst et al., 2004). Nous ne pouvons fournir d'autres explications que celle d'une situation fortuite causée par une similitude de densité entre les amas de ribosomes et les CCV.

### 4.3. Identification de plusieurs type de granules

Par l'expression transitoire de protéines de fusion CFP- et YFP- dans des neurones d'hippocampe de rat en culture, nous montrons que parmi les protéines testées il existe au moins deux types de granules : ceux contenant DDX3 et ceux contenant CGI-99. Cette observation est corroborée par l'immunofluorescence en microscopie confocale des protéines endogènes (annexe 5.2). Nous n'avons jamais détecté de protéine endogène CGI-99 ou de protéine de fusion YFP/CFP-CGI-99 dans les granules de DDX3 endogène ou en fusion YFP/CFP. Ces résultats suggèrent que ces deux protéines ne font pas partie des mêmes complexes RNP et qu'elles peuvent donc servir de marqueurs spécifiques pour des types de granules d'ARN différents.

#### 4.3.1 Granules DDX3-YFP et l'activité synaptique

Dans le premier manuscrit présenté dans la section résultats, nous montrons que la vitesse et / ou la direction (antérograde vs rétrograde) des granules YFP-DDX3 n'est (sont) pas affectée(s) par l'activité synaptique des neurones. Ceci peut paraître inattendu car plusieurs évidences expérimentales obtenues avec des cultures de neurones d'hippocampe de rat démontrent que l'activité synaptique peut induire le transport et la localisation d'ARNm dans les dendrites distales. Nous présentons le cas de quatre ARNm dont le transport peut être affecté par l'activité synaptique ainsi que quelques hypothèses qui pourraient expliquer l'indépendance observée des granules YFP-DDX3 face à l'activité synaptique des neurones.

##### 1 ARNm BDNF.

L'application de KCl à une concentration variant de 10 à 45 mM dans le milieu de culture, dépolarise les neurones en culture dissociée et induit le transport dendritique de

l'ARNm codant pour la neurotrophine BDNF. Cette localisation est détectable 2-3h après l'application d'un stimulus continu (Tongiorgi et al., 1997) ou bref (10 min suivi d'une incubation dans du milieu non dépolarisant) (Righi et al., 2000). Cette localisation dendritique n'est pas affectée par la présence d'actinomycine D (ActD), un inhibiteur de la transcription, ce qui suggère qu'elle découle du transport d'ARNm emmagasinés dans le corps cellulaire et non d'ARN nouvellement synthétisé (Tongiorgi et al., 1997). L'activité synaptique stimulée par l'application de BDNF entraîne également la localisation dendritique de l'ARN *BDNF*. Cette localisation est détectable 1 min après l'application de la neurotrophine, mais l'effet maximal est observé 3h post-application (Righi et al., 2000).

## 2 ARNm *CaMKII $\alpha$*

La dépolarisation induite par l'incubation en présence de KCl (6h) induit la localisation dendritique de l'ARNm codant pour la *CaMKII $\alpha$*  (20h post-stimulation) (Mori et al., 2000). La stimulation par l'application de KCl affecte la mobilité de granules d'ARN qui contiennent le 3'UTR de l'ARNm de la *CaMKII $\alpha$*  (Rook et al., 2000). Les auteurs de cette étude ont utilisé un ARN chimérique LacZ-MS-*CaMKII* 3'UTR afin de suivre son transport indirectement par la fluorescence de la protéine de fusion eGFP-MS2 qui lie la séquence MS2 sur l'ARN rapporteur (Bertrand et al., 1998). Suite à la stimulation par le KCl (10 à 90 min post-stimulation), la proportion de granules qui ont des mouvements antérogrades et des vitesses supérieures à 0,1  $\mu\text{m}/\text{sec}$  est augmentée dans les neurones vivants (Rook et al., 2000).

Une stimulation électrique continue (1h) dans des cultures organotypiques d'hippocampe de rat entraîne également la localisation post-stimulation de l'ARNm

*CaMKII $\alpha$*  dans la fraction de synaptodendrosomes (composée majoritairement de synapses suite à un fractionnement sub-cellulaire) (Havik et al., 2003).

### 3 ARNm *Arc*

Une stimulation électrique continue (1h) dans des cultures organotypiques d'hippocampe de rat entraîne la localisation post-stimulation de l'ARN *Arc* au niveau des dendrites stimulées ainsi que du produit protéique (Steward et al., 1998). Cette accumulation de protéine *Arc* est également induite par l'application d'un agoniste des récepteurs mGluR (récepteurs métabotropiques au glutamate), le DHPG, ou de sérotonine qui agit via des récepteurs AMPA et NMDA (récepteurs ionotropiques au glutamate) (Brackmann et al., 2004; Pei et al., 2004). L'infusion intrahippocampale d'oligonucléotides antisens dirigés contre l'ARN *Arc* inhibe l'expression de protéine *Arc*, mais n'empêche pas l'établissement de la LTP. Par contre ce traitement empêche la consolidation de la LTP et la mémoire à long terme (Guzowski et al., 2000; Guzowski et al., 2001; Guzowski, 2002). Ces résultats suggèrent un rôle essentiel à la localisation et à la régulation de l'expression de l'ARNm *Arc* dans des phénomènes de mémoire à long terme.

### 4 ARNm *$\beta$ -actine*

La séquence code-postal de l'ARNm  *$\beta$ -actine* est reconnue par la protéine ZBP1 et est essentielle à la localisation dendritique du transcrit. La privation en sérum diminue la quantité en protéine ZBP1 et en ARNm  *$\beta$ -actine* dans les cônes de croissance. L'application subséquente de neurotrophines (ex. NT-3, FCS, PDGF) permet un enrichissement en ARNm  *$\beta$ -actine* et en protéine ZBP1 dans les cônes de croissance (Latham, Jr. et al., 1994; Zhang et al., 2001). Ce même enrichissement est détectable 10-

15 minutes après une dépolarisation des neurones induite par une haute concentration du milieu de culture en KCl (Tiruchinapalli et al., 2003).

### **5 Hypothèses expliquant l'indépendance des granules DDX3 face à l'activité synaptique**

Premièrement, DDX3 pourrait être associée à un autre ARN cargo que ceux utilisés dans les études précédentes. En effet, nous montrons que dans la préparation de granules d'ARN il existe (1) un enrichissement en ARNm  $\beta$ -actine et (2) une population hétérogène de complexes RNP (CGI99-spécifiques et DDX3-spécifiques, manuscrit 1 et annexes 5.1) ce qui suggère que DDX3 pourrait ne pas être associée aux complexes RNP de l'ARNm  $\beta$ -actine dont les mouvements montrent une dépendance à l'activité synaptique.

Deuxièmement, DDX3 pourrait être principalement impliquée dans l'export nucléaire d'ARNm (Yedavalli et al., 2004). Ainsi, sa présence dans les dendrites pourrait être directement proportionnelle à son activité d'export nucléaire : on ne pourrait détecter un plus grand nombre de granules dendritiques DDX3-YFP qu'après une exposition plus longue au KCl (3h-6h) qui impliquerait une transcription *de novo* (Zafra et al., 1990; Zafra et al., 1992). Nos observations rapportées dans le manuscrit 1 ne peuvent pas détecter un effet du KCl sur la distribution dendritique d'ARNm synthétisés *de novo* puisqu'elles sont prises entre 5 et 60 minutes post-stimulation. Si DDX3 est impliquée dans l'export nucléaire et/ou le transport et la localisation dendritique d'ARNm nouvellement synthétisés, suite à un long traitement au KCl (3-6 heures) il y aurait accumulation dendritique de DDX3 et celle-ci pourrait être bloquée par des inhibiteurs de la transcription (ActD) ou de l'export nucléaire CRM1-dépendant (leptomycine B). L'utilisation de mutants ponctuels de DDX3 qui ne peuvent plus être

importés dans le noyau ou en être exportés devrait également fournir des pistes quant à la nécessité pour sa fonction de transiter par le noyau (Yedavalli et al., 2004).

Troisièmement, DDX3 pourrait être impliquée, via son activité ARN hélicase (Yedavalli et al., 2004), dans la régulation de la traduction des ARN transportés. En effet, DDX3 fait partie de la famille des ARN hélicase eIF-4A impliquées dans la régulation de la traduction et qui comprend Vasa et Belle de drosophile, An3 du xénope, PL10 de la souris et Ded1p de la levure (Linder, 2003). La majorité des ARNm cellulaires possèdent une coiffe G5'ppp5'N à leur extrémité 5' qui est liée par le complexe protéique eIF-4F qui comprend les protéines eIF-4E, eIF-4G et eIF-4A. Le complexe eIF-4F est responsable de l'interaction entre l'ARNm, d'autres facteurs de traduction et le complexe de pré-initiation 43S. Dans ce complexe, eIF-4A est essentiel afin de détruire les structures secondaires présentes dans le 5'UTR des ARNm qui pourraient inhiber sa traduction (Prevot et al., 2003). Ainsi, un modèle fort attrayant de la fonction de DDX3 dans les granules de transport dendritique impliquerait un rôle pour son activité hélicase ATP-dépendante dans la régulation de la traduction via la destruction de séquences régulatrices. Selon ce modèle, l'activité synaptique n'aurait pas d'effet sur la distribution dendritique de DDX3, mais pourrait plutôt en avoir sur son activité hélicase ou son association avec des composants du complexe de traduction. Ce faisant, l'activité synaptique induite par l'incubation avec le KCl n'aurait pas d'effet mesurable sur la vitesse ou la distribution dendritique des granules eYFP-DDX3.

#### 4.3.1.1 Identification des ARN associés par DDX3

Un objectif central et essentiel pour la compréhension de la fonction biologique de la protéine DDX3 lors du développement du cerveau embryonnaire est l'identification

de ligands d'ARN reconnus *in vivo*. Un essai exploitant l'association ARN-protéine dans un contexte cellulaire est primordial afin de minimiser la possibilité d'associations artéfactuelles pouvant résulter d'essais réalisés *in vitro*. La stratégie proposée ici, initialement élaborée par l'équipe du Dr Keene (Tenenbaum et al., 2000) et utilisée à profit dans notre laboratoire afin d'identifier les ARN associés *in vivo* à Stau1 (Kim et al., 2005), repose sur la purification par immunoaffinité des complexes RNP de DDX3. Après immunoprécipitation des complexes RNP DDX3, l'ARN du complexe est extrait et une réverse transcription est réalisée en présence de nucléotides marqués. L'ADNc est ensuite utilisé comme sonde pour hybrider des bibliothèques sur micropuces à haute densité.

Ainsi, nous pourrions comparer les ARN associés *in vivo* à DDX3 dans le cerveau en développement (E18) à ceux associés à DDX3 dans le cerveau adulte. Cette analyse en parallèle permettrait de mettre en évidence l'aspect dynamique de l'association DDX3/granule d'ARN en fonction du développement. En effet, nous montrons par microscopie confocale (annexe 5.2) qu'en fonction du temps de maturation en culture, la co-localisation des protéines endogènes DDX3 / P0 va en diminuant.

#### 4.3.2 Granules CGI-99

La protéine CGI-99 est conservée durant l'évolution et l'on retrouve des homologues chez la drosophile, le poulet *G. gallus* et le nématode *C. elegans* (Lai et al., 2000). Cependant, elle ne présente pas de domaines/motifs protéiques conservés qui auraient pu suggérer une fonction.

Trois études dévoilent des interactions protéine/protéine et suggèrent des fonctions diverses pour CGI-99. En criblant une banque d'ADNc de cellules HeLa par double hybride chez la levure, une interaction entre CGI-99 et la sous-unité PA du complexe de



polymérase du virus de l'influenza a été détectée et corroborée dans le contexte du virion purifié (Huarte et al., 2001). Ensuite, en criblant une banque d'ADNc de testicules humains par double hybride chez la levure, une interaction est détectée entre CGI-99 et la protéine humaine Ninein qui est associée au centrosome (Howng et al., 2004). L'interaction entre CGI-99 et hNinein empêche la phosphorylation de cette dernière par GSK3 $\beta$  (glycogène synthétase kinase), une kinase qui peut interagir et phosphoryler hNinein modulant ainsi son état de polymérisation (Hong et al., 2000). Enfin, CGI-99 est retrouvée dans des granules d'ARN associés à KIF5a dans des lysats de cerveau adulte de rat (Kanai et al., 2004). Cette dernière étude montre également une interaction ARN-indépendante entre CGI-99 et DDX1 et le facteur d'élongation EF1a.

Nos études montrent que des granules dendritiques formés par la protéine de fusion CFP-CGI-99 co-localisent avec les protéines de fusion YFP-IEB2 (NF45) et YFP-G3BP1. Cependant, ces granules ne contiennent pas de protéines ribosomiques ni d'ARN poly-A<sup>+</sup> (annexe 5.1). Par contre, la protéine endogène CGI-99 co-localise avec des ribosomes ainsi que des ARN poly-A<sup>+</sup> (annexe 5.1). Ceci suggère que la surexpression de CFP-CGI-99 provoque la formation de complexes protéiques différents de ceux retrouvés normalement dans les neurones.

Cette observation pourrait expliquer l'effet désastreux d'une surexpression de CFP/YFP-CGI-99 sur les granules dendritiques CFP/YFP-DDX3 (Annexe 5.1). En effet, nos études montrent que la présence de granules dendritiques de DDX3 est dramatiquement diminuée lorsque celle-ci est co-exprimée avec CGI-99. Ainsi, la formation de granules protéiques de CGI-99 sans cargo d'ARN poly-A<sup>+</sup> et sans ribosomes inhiberait le transport des granules DDX3. Cette inhibition pourrait être la résultante d'un déséquilibre stœchiométrique entre les différents facteurs essentiels au

transport communs à CGI99 et DDX3, comme par exemple la kinésine KIF5a (Kanai et al., 2004). En effet, dans des lysats de cerveau de rat adulte DDX3 et CGI-99 sont retrouvées dans des complexes RNP associés à KIF5a (Kanai et al., 2004). Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de montrer que l'effet dominant négatif d'une surexpression de CFP/YFP-CGI-99 peut être contre balancé par la surexpression concomitante de KIF5a.

Des études de double hybride chez la levure qui permettent le criblage d'une banque d'ADNc de cerveau foetal de souris sont présentement en cours dans le laboratoire avec DDX3 et CGI99 comme hameçons. Ces études devraient permettre d'identifier des partenaires protéiques de DDX3 et de CGI99, ce qui éventuellement nous aidera à mieux comprendre leurs rôles dans les granules d'ARN dendritiques.

#### 4.3.3 *Granules Stau2*

Nous montrons que 10 à 30% des granules de protéines surexprimées DDX3 ou CGI-99 co-localisent avec Stau2 (annexe 5.2) ce qui suggère que Stau2 ne soit pas majoritairement associée à ces granules. Ces observations indiquent la présence de plusieurs types de granules composés de différentes protéines.

Dans des extraits de neurones de cortex en culture, l'isoforme Stau2<sup>62</sup> ne s'associe pas aux ribosomes (immunoprécipitation et gradient de saccharose), mais avec des structures de faible densité qui co-sédimentent avec la calnexine (CNX), un marqueur normalement associé aux membranes de haute densité du réticulum endoplasmique (RE). La sédimentation de la CNX à cette faible densité pourrait indiquer la présence de vésicules de faible densité dérivant du RE, dont la fonction serait indépendante de celle classique du RE. De telles vésicules sont observées dans le phénomène de phagocytose

dans les macrophages (Gagnon et al., 2002; Garin et al., 2001) et dans les vésicules neuronales contenant la neuromélanine (Tribl et al., 2005). Bien que cette co-sédimentation ne soit pas suffisante pour démontrer une association entre Stau2<sup>62</sup> et des vésicules dérivant du RE, cette observation soulève une question intéressante : quels déterminants de Stau2<sup>62</sup> empêchent la liaison aux ribosomes ou bien favorisent son association avec d'autres structures / organelles et lesquelles?

#### 4.3.3.1 Rôle de Stau2<sup>62</sup> vs Stau2<sup>59</sup>

Afin d'identifier d'autres protéines associées aux complexes RNP de Stau2, nous avons procédé au criblage d'une banque d'ADNc de cerveau fœtal de souris par double-hybride chez la levure (Annexe 5.3). Parmi ceux-ci, ZFR une protéine à trois doigts de zinc, dont le gène est conservé au cours de l'évolution, se révèle importante pour la distribution subcellulaire d'une isoforme spécifique de Stau2. Il est intéressant de noter que dans des extraits cytoplasmiques de neurones de cortex en culture, ZFR co-sédimente avec les isoformes Stau2<sup>62</sup> et Stau2<sup>59/52</sup> montrant ainsi une possible implication dans au moins deux fonctions différentes; une associée aux ribosomes et l'autre à des complexes de faible densité.

La redistribution intracellulaire obtenue suite au RNAi anti-ZFR suggère que l'interaction ZFR/Stau2<sup>62</sup> serait fonctionnelle au niveau de l'export nucléaire de Stau2<sup>62</sup> alors qu'elle n'influencerait pas l'export nucléaire de Stau2<sup>59</sup>. Ce résultat rappelle ceux obtenus avec un ARNi anti-exportine-5 qui séquestre Stau2<sup>62</sup> dans le noyau, mais n'affecte pas la distribution subcellulaire de Stau2<sup>59</sup> dont l'export nucléaire est également dépendant de CRM1 (Macchi et al., 2004; Miki and Yoneda, 2004). L'ajout de l'agent pharmacologique leptomycinB, un inhibiteur de la voie CRM1-dépendante,

en concomitance avec un traitement d'ARNi anti-ZFR serait intéressant et permettrait de déterminer si ZFR est impliqué dans l'export nucléaire des deux isoformes de Stau2, mais dont l'effet sur Stau2<sup>59</sup> serait masqué par l'export par CRM1.

Afin de mieux caractériser la fonction de l'interaction ZFR/Stau2, il serait également approprié de développer un système d'adénovirus afin d'exprimer les isoformes de Stau2-HA et/ou les shARN anti-ZFR. En effet, l'infection avec des adénovirus permettrait d'obtenir un plus grand nombre de cellules qui surexpriment ces molécules (Stau2-HA et shARN) comparativement aux méthodes par précipité de calcium-phosphate ou lipofectamine2000 (Invitrogen). Ceci permettrait d'effectuer des essais de fractionnement subcellulaire à partir de cultures de neurones infectés afin de corroborer les résultats obtenus par immunofluorescence, évitant les problèmes inhérents à la co-transfection de plasmides codant pour Stau2-HA et de shARN/siARN anti-ZFR.

Le développement d'adénovirus, exprimant les différentes isoformes de Stau2 devrait également permettre d'identifier par approche protéomique ou par approche de micropuces, les protéines ou les ARNm contenus dans les complexes RNP de Stau2. Cette méthode peut être exploitée au moins de deux façons différentes :

- Immunopurification. Les adénovirus expriment des protéines de fusion HA- ou Myc- Stau2. Les complexes RNP Stau2 sont immunoprécipités et les complexes sont soumis à l'analyse.
- Purification par affinité. Les adénovirus expriment des protéines de fusion contenant la séquence TAP utilisée, entre autre, pour l'étude sur Stau1 (Villace et al., 2004). Les complexes RNP Stau2 sont purifiés et soumis à l'analyse.

La présence d'une isoforme dans des granules dendritiques n'est pas suffisante pour déterminer qu'il s'agit d'une unité de transport de l'ARN. En effet, l'étude publiée par notre équipe de laboratoire en collaboration avec celle du Dr Maquat (Kim et al., 2005) montre un rôle pour Stau1 dans la régulation de la stabilité de certains ARNm, alors que traditionnellement on croyait Stau1 impliqué dans le transport d'ARN. L'implication de Stau2 dans un mécanisme similaire de stabilité de l'ARN pourrait également exister. L'identification des différentes protéines contenues dans les complexes RNP de Stau2 devrait permettre de mieux déterminer leur fonction. De plus, l'identification d'ARNm associés aux isoformes Stau2<sup>62</sup> et Stau2<sup>59</sup> devrait également permettre de mieux comprendre le rôle de chaque isoforme de Stau2.

#### **4.4. Transport d'ARN dendritique et granules d'ARN**

Il est approprié de se demander si l'association aux ribosomes est essentielle pour le processus du transport de l'ARN dendritique. En effet, nous avons montré que l'isoforme Stau2<sup>62</sup> ne co-sédimente pas avec les ribosomes, alors que Stau2<sup>59</sup> est majoritairement associé à ces derniers. Par contre, lorsque surexprimés dans des neurones d'hippocampe en culture, les deux isoformes forment des granules dendritiques. Cependant, la présence de ribosomes ou d'ARN dans ces granules dendritiques n'a pas été testée, de même que leur capacité de se déplacer et/ou de répondre à l'activité synaptique.

En accord avec des données de la littérature, nous montrons que parmi la population de granules dendritiques observés (Kanai et al., 2004; Knowles et al., 1996; Kohrmann et al., 1999; Oleynikov and Singer, 2003; Rook et al., 2000; Tiruchinapalli et al., 2003) seule une faible proportion de granules est mobile. De plus, une caractéristique

commune des granules mobiles par rapport aux granules immobiles est la différence de taille apparente; seuls les petits granules sont mobiles. En principe, ces granules plus petits pourraient avoir moins ou pas de ribosomes et/ou moins de protéines qui lient l'ARN, ce qui corrélait avec une densité plus petite que celle observée pour les granules riches en ribosomes (Krichevsky and Kosik, 2001).

Il n'y a pas de preuve irréfutable qui démontre que les granules dendritiques riches en ribosomes observés par l'équipe du Dr Kosik et que nous avons purifiés sont ceux qui en microscopie apparaissent mobiles. La question est de savoir si ces granules riches en ribosomes sont un point d'arrivé et/ou un point de départ dendritique pour des particules plus petites pouvant ne pas contenir de ribosomes ou s'il s'agit de l'unité de transport, mais dont la quantité en ribosomes peut varier lorsque la nécessité de se mouvoir survient. Ainsi, la régulation de la quantité de sous-unités ribosomiques contenue dans un granule dendritique pourrait déterminer sa taille et permettre son transport. Afin d'obtenir un début de réponse à cette question, je propose l'approche expérimentale suivante :

- des adénovirus sont utilisés pour surexprimer une des protéines ribosomiques suivantes en fusion avec YFP ou CFP dans des neurones d'hippocampe :
  1. P0 (Tchorzewski et al., 2003)
  2. L11 (Shiina et al., 2005; Stage-Zimmermann et al., 2000)
  3. S7 (Lalucque and Silar, 2000)

- La culture de neurones est également infectée avec des adénovirus exprimant une fusion RFP (RFP améliorée monomérique (Campbell et al., 2002; Shaner et al., 2004)) d'une des protéines suivantes :
  1. Stau2<sup>62</sup>
  2. Stau2<sup>59</sup>
  3. DDX3
  4. une protéine ribosomique de l'autre sous-unité que celle choisie avec YFP
- Les neurones infectés vivants sont observés sous microscope confocale en temps réel.

Cette approche devrait contribuer à une meilleure compréhension du problème énoncé plus haut. Est-ce que les granules dendritiques mobiles ou immobiles de DDX3, Stau2<sup>62</sup> et Stau2<sup>59</sup> contiennent des ribosomes complets, une seule des sous-unités ribosomiques ou bien en sont-ils dépourvus? Est-ce que l'activité synaptique, simulée par une haute teneur en K<sup>+</sup> ou par un neurotransmetteur comme le glutamate, influence la co-localisation potentielle des marqueurs ribosomiques, des protéines Stau2/DDX3 et des granules mobiles?

#### **4.5. Conclusions générales**

Les études rapportées dans cette thèse ont permis d'identifier des protéines détectables dans des complexes RNP présents dans les dendrites de neurones de mammifères. Parmi ces protéines, certaines avaient déjà été retrouvées dans des complexes RNP de transport de l'ARNm, d'autre sont des facteurs importants pour la transcription, l'épissage alternatif, l'export nucléaire ou la stabilité des ARNm.

---

Finalement, certaines protéines n'ont pas encore de fonction biologique définie. En ce sens, ces études permettent d'établir les bases pour mieux comprendre les voies d'assemblage, de transport et de localisation des RNP dendritiques dans les neurones de mammifères. Ces études ont également permis d'établir de nouvelles avenues de recherche par l'établissement de nouvelles hypothèses de travail et la proposition de méthodes expérimentales afin de les mettre à l'épreuve. En élucidant les processus sous-jacents aux phénomènes de transport, de localisation et de régulation de la traduction d'ARNm dendritiques, la communauté scientifique pourra éventuellement mieux comprendre les phénomènes cognitifs de la mémoire et de l'apprentissage ainsi que ses pathologies telles que la maladie d'Alzheimer et l'amnésie.



---

# 5

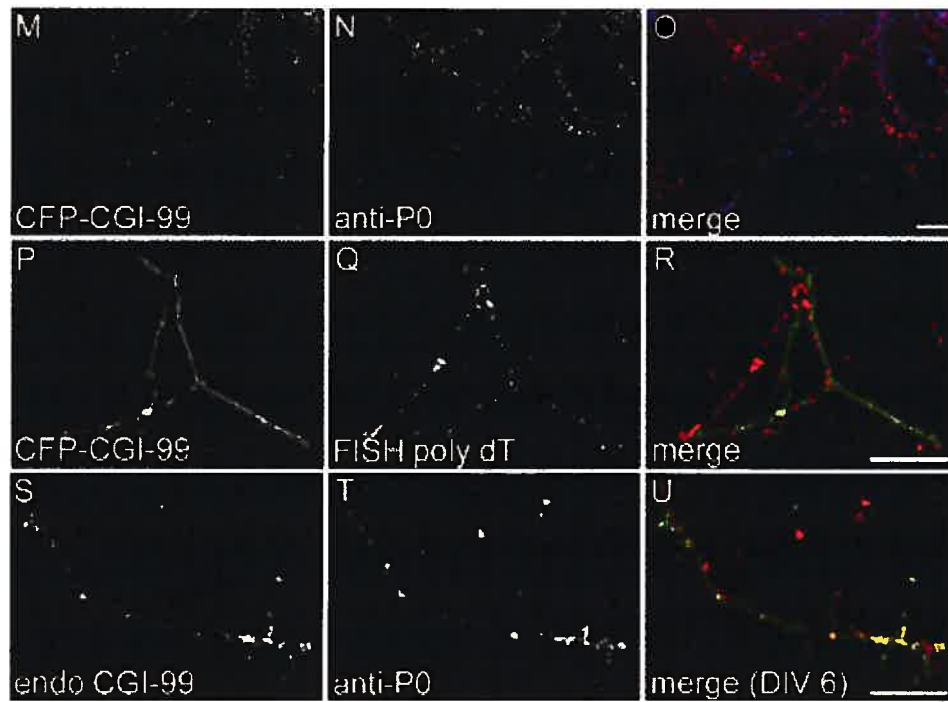
---

## ANNEXE

---

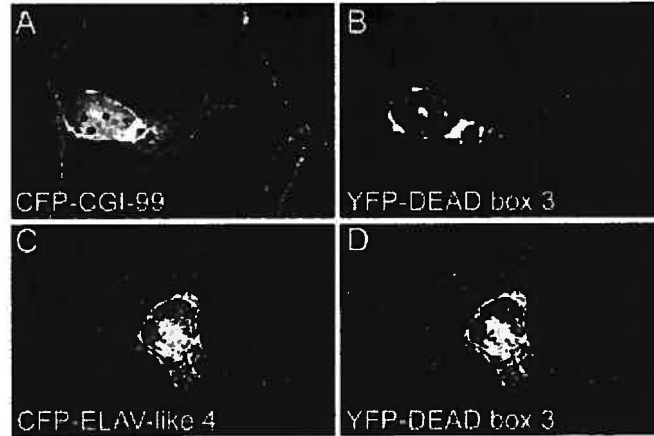
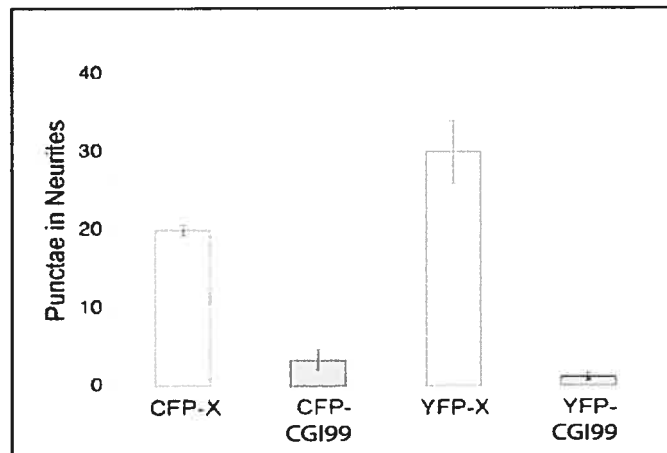
### 5.1 Effet d'une surexpression de CGI99 sur les granules dendritiques de DDX3

La présence de granules dendritiques contenant DDX3 est dramatiquement diminuée lorsque celle-ci est co-exprimée avec CGI-99. La formation de granules protéiques de CGI-99 sans cargo d'ARN poly-A<sup>+</sup> et sans ribosomes (Figure 9) inhiberait le transport des granules DDX3 (Figure 10). Afin de mieux comprendre ce phénomène, il serait intéressant de connaître les constituants protéiques communs aux deux types de granules. Ces composantes pourraient se retrouver en quantité limitée et la surexpression de CGI99 créerait un déséquilibre stœchiométrique. Un candidat potentiel serait la kinésine Kif5 (Kanai et al., 2004).



**Figure 7 : Les granules CFP-CGI99 ne contiennent pas de ribosomes ni d'ARNm**

(M-R) Des neurones d'hippocampe en culture (5 D.I.V.) sont transfectés avec un plasmide exprimant CFP-CGI99 et fixés 16h post-transfection. Contrairement aux granules contenant du CGI99 endogène (S-U), CFP-CGI99 ne contient pas de P0, marqueur de la sous-unité ribosomique 60S (M-O), ni d'ARNm polyA<sup>+</sup> (P-R).

**E**

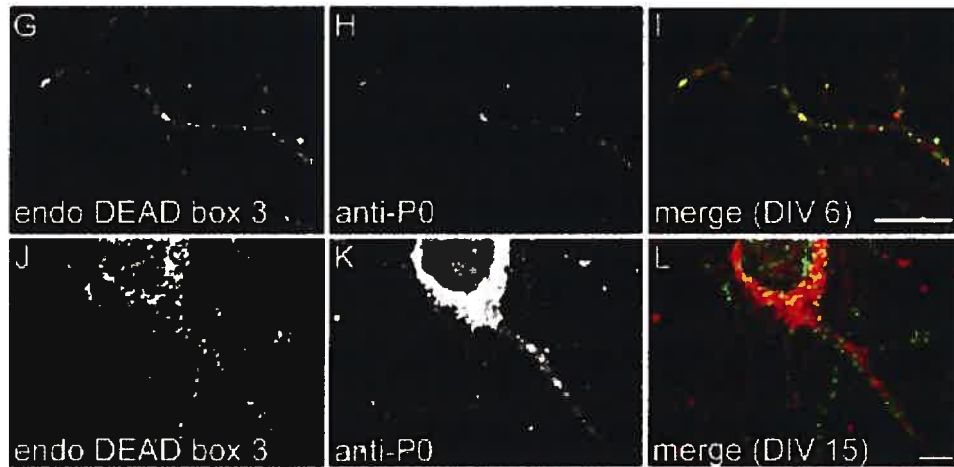
**Figure 8 : La sur-expression de xFP-CGI99 diminue la quantité de granules dendritiques DDX3**

Des neurones d'hippocampe en culture (5 D.I.V) sont transfectés avec des plasmides exprimant YFP-DDX3 et CFP-CGI99 (A,B) ou CFP-ELAV-like4 (C,D). L'expression de CFP-CGI99 diminue le nombre de granules dendritiques de DDX3 alors que l'expression d'ELAV-like4 n'a pas d'effet. (E) Histogramme représentant l'effet de la sur-expression d'une protéine X (parmi celles utilisées dans le manuscrit 1) en fusion avec CFP ou YFP sur le nombre de granules dendritiques de DDX3. La co-expression d'une fusion xFP-CGI99 diminue de façon significative le nombre de granules dendritiques de DDX3.

---

## **5.2 Co-localisation de DDX3 avec des composantes ribosomiques en fonction du temps**

Les granules dendritiques de DDX3 ne co-localisent pas à 100% avec P0, un marqueur de la sous-unité ribosomique 60S ce qui suggère que cette protéine n'est pas une composante constitutive des ribosomes. De plus, cette co-localisation est modulée dans le temps : des neurones dans des cultures plus jeunes (3-5 D.I.V.) montrent une plus grande co-localisation DDX3/P0 comparativement à des neurones dans des cultures plus matures (11-15 D.I.V.) (Tableau III et Figure 9).



**Figure 9 : Co-localisation de DDX3 avec P0 en fonction du temps**

Des neurones d'hippocampe en culture sont fixés après le temps indiqué (D.I.V., *days in vitro*). Les protéines endogènes DDX3 et P0 sont observées par immunofluorescence sur un microscope confocal. Barre de calibration correspond à 20 µm.

**Tableau III : Co-localisation de différentes composantes des granules d'ARN avec DDX3 et CGI99.**

| Construct         | Expressed CFP-DEAD Box 3 | Expressed CFP-DEAD Box 3 reverse | Endogenous DEAD Box 3 | Endogenous DEAD Box 3 reverse |
|-------------------|--------------------------|----------------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| ELAV-like 4       | ++                       | ++                               | +/-                   | +/-                           |
| G3BP1             | ++                       | ++                               | +/-                   | +/-                           |
| HnRNP C           | ++                       | +/-                              | ND                    | ND                            |
| IEB2              | ++                       | +                                | +/-                   | +/-                           |
| CGI-99            | -                        | -                                | -                     | -                             |
| P0 (5-6 D.I.V.)   | ++                       | +/-                              | +                     | +/-                           |
| P0 (11-12 D.I.V.) | ND                       | ND                               | +/-                   | -                             |
| Poly(dT) (FISH)   | ++                       | +                                | ND                    | ND                            |
| Staufen 2         | +/-                      | +/-                              | ND                    | ND                            |

| Construct         | Expressed CGI-99 | Expressed CGI-99 reverse | Endogenous CGI-99 | Endogenous CGI-99 reverse |
|-------------------|------------------|--------------------------|-------------------|---------------------------|
| ELAV-like 4       | +/-              | +/-                      | -                 | -                         |
| G3BP1             | ++               | ++                       | ++                | ++                        |
| HnRNP C           | -                | -                        | ND                | ND                        |
| IEB2              | ++               | ++                       | ND                | ND                        |
| DEAD box 3        | -                | -                        | -                 | -                         |
| P0 (5-6 D.I.V.)   | -                | -                        | +                 | +/-                       |
| P0 (11-12 D.I.V.) | ND               | ND                       | +/-               | -                         |
| Poly(dT) (FISH)   | -                | -                        | ND                | ND                        |
| Staufen 2         | +/-              | +/-                      | ND                | ND                        |

++, > 60% co-localisation, +, 30-60% co-localisation, +/-, 10-30% co-localisation, -, <10% co-localisation. ND, non déterminé.

### 5.3 Caractérisation de partenaires protéiques de Stau2

Le criblage de  $7 \times 10^6$  clones d'une banque d'ADNc foetal de souris avec un fragment N-terminal de Stau2 a permis d'isoler 147 clones classés en 5 groupes selon leurs affinité relative pour le fragment de Stau2. Cette affinité relative est inversement proportionnelle au temps requis pour voir apparaître une colonie en milieu sélectif auxotrophe et de coloration adéquate (un double hybride permet l'activation des gènes rapporteurs *Leu* et  $\beta$ -*gal*).

Ainsi, trente-sept clones sont apparus dès le premier jour de sélection (affinité la plus forte). Cette affinité relative a justifiée la priorité de séquençage de ces 37 clones. Les autres clones sont laissés aux membres du laboratoire afin de les séquencer et de valider les interactions potentielles. Je décris ici-bas deux clones, retrouvés parmi les 37 présentant une plus haute affinité pour Stau2, dont la caractérisation de l'interaction potentielle avec Stau2 devrait être entreprise.

#### 5.3.1 ATPase S4

Retrouvée dans 3 clones parmi les 37 dénombrés dans le Tableau III, il s'agit d'une protéine faisant partie de la famille des AAA-ATPase. La famille des AAA-ATPases comprend des protéines impliquées dans diverses fonctions cellulaires : la transcription (Makino et al., 1999), les mouvements des axes de microtubules durant la division mitotique (Cheeseman and Desai, 2004), l'export de protéines du RE associé au contrôle de qualité (Lord et al., 2002), etc. Le transport et la régulation de la traduction couplée à la localisation des ARNm sont des processus dynamiques qui nécessitent de l'énergie. Ainsi, la présence d'une ATPase dans les complexes Stau2, pourrait être utile comme source d'énergie pour un de ces processus. Cette interaction potentielle doit être

validée par d'autres approches avant de déterminer sa validité fonctionnelle (immunoprécipitation, immunofluorescence et sédimentation sur gradient de saccharose). L'utilisation de RNAi anti-ATPase en concomitance avec l'observation en temps réel du mouvement des granules dendritiques YFP-Stau2 par microscopie pourrait révéler un début de piste de l'importance biologique de cette interaction potentielle.

### 5.3.2 DSCR1/calciressine

Le Syndrome de Down /trisomy 21 prévaut dans 1/700 des naissances et représente l'aneuploidie chromosomique humaine la plus compatible avec la vie post-natale (Reeves et al., 2001). La trisomie du chromosome 21 induit l'accumulation de plusieurs protéines codées par les gènes trisomiques, ce qui perturbe le développement fœtal et résulte en de nombreuses anomalies caractéristiques avec des pénétrances variables (Reeves et al., 2001). Parmi les anomalies associées à ce défaut chromosomique on retrouve le retard mental, des pathologies ressemblant à l'Alzheimer, des dysmorphologies cranio-faciales et des défauts du septum atrioventriculaire dans le cœur (Reeves et al., 2001).

Des études de cartographie chromosomique ont permis de délimiter une région dans le chromosome 21, nommée la région critique du syndrome de Down (DSCR), qui contient le(s) gène(s) nécessaire(s) pour induire le syndrome de Down (Antonarakis et al., 1989; Barlow et al., 2001; Delabar et al., 1993; Korenberg et al., 1990; Korenberg et al., 1994; McCormick et al., 1989).

Un gène candidat (gène 1) pour contribuer aux défauts phénotypiques du syndrome de Down, présent dans la région 21q22.12 du chromosome 21 d'humain ainsi que dans la région synténique du chromosome 16 de souris, a été nommé DSCR1 pour *Down Syndrome Critical Region 1* (Fuentes et al., 1995; Hattori et al., 2000; Mural et al.,



2002). *DSCR1* est également retrouvée dans la littérature sous les noms de *MCIP1*, *Adapt78* ou *calcipressine 1*. Le gène *DSCR1* contient sept exons, desquels les exons 1 et 4 sont épissés de manière alternative aux exons communs 5,6 et 7 générant ainsi des transcrits différents qui résultent en les protéines DSCR1.1 et DSCR1.4 (Ermak et al., 2001; Fuentes et al., 1997; Yang et al., 2000). Cependant, il est encore inconnu s'il existe des différences fonctionnelles entre les isoformes. *DSCR1* code pour une protéine qui régule la voie de la calcineurine/NFAT en se liant à la calcineurine A, la sous-unité catalytique de la phosphatase PP2B, modulant de manière négative son activité phosphatase et inhibant également la transcription de gènes de la voie NFAT (Fuentes et al., 2000; Rothermel et al., 2000).

La calcineurine/PP2B (CN) est une protéine phosphatase activée par le  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline dont la régulation de l'activité a été montrée importante pour l'établissement de la LTP et de la mémoire dans les neurones de Purkinje (Kawaguchi and Hirano, 2002), de l'hippocampe et dans l'animal intact (Lu et al., 2000; Malleret et al., 2001; Mansuy et al., 1998b; Mansuy et al., 1998a; Winder et al., 1998). En effet, l'activité de kinases telles que la CaMKII, la PKA et MAPK sont des régulateurs positifs, dont l'activité est critique pour plusieurs formes de plasticité synaptique et pour la mémoire et l'apprentissage (Abel et al., 1997; Abel et al., 1998; Kornhauser and Greenberg, 1997; Lee et al., 2000; Lisman, 1994; Lisman et al., 2002). De l'autre côté, l'activité de phosphatases telles que la CN et la protéine phosphatase 1 (PP1) serait importante afin de contrebalancer l'effet des kinases, ces phosphatases seraient ainsi des régulateurs négatifs qui inhibent la plasticité synaptique et la mémoire (Ikegami et al., 1996; Malleret et al., 2001; Mansuy et al., 1998a). De plus, une fonction dans la régulation de la transcription NFAT-dépendante a été montrée pour la CN. En effet, l'activation de la

CN via une élévation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire induit la déphosphorylation des membres de la famille NFAT retrouvés dans le cytoplasme et provoque leur relocalisation dans le noyau où ils activent la transcription de gènes cibles (Beals et al., 1997; Masuda et al., 1997).

Ainsi, la présence potentielle de DSCR1 dans les complexes RNP de Stau2 pourrait s'avérer intéressante dans un contexte de régulation négative de l'activité de CN. Des études d'interaction protéine/protéine doivent être entreprises afin de confirmer l'interaction entre ces deux protéines (immunoprécipitation, sédimentation sur gradient de saccharose, immunofluorescence, etc.). Pour ce faire, l'utilisation des souris et de lapin anti-DSCR1 que j'ai développé dans le laboratoire s'avèreront utiles.

Un essai fonctionnel envisageable afin de mieux comprendre le rôle biologique de cette interaction potentielle serait d'observer l'effet d'une sous-expression de Stau2 ou DSCR1 obtenu par RNAi sur l'activité de la CN induite par la  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline dans des neurones en culture. L'utilisation de shRNA introduits dans les cellules à l'aide de lentivirus ou d'adénovirus serait souhaitable afin de maximiser le nombre de neurones sous-exprimant les protéines d'intérêt. L'accumulation de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmoduline serait induite par l'utilisation de ionophores de calcium (ex., A23187), de neurotransmetteurs (ex., glutamate) ou de haute concentrations en potassium. L'activité de la CN serait suivie soit à l'aide d'un gène rapporteur contenant un promoteur inductible par la voie NFAT (ex., le gène *luciférase* en aval du promoteur de la IL2 (Fuentes et al., 2000)) soit avec des essais d'électrophysiologie et d'induction de la LTP.

**Tableau IV : Liste des partenaires potentiels de Stau2.**

Clones obtenus dans le criblage par double hybride d'une banque de cerveau foetal de souris avec un fragment N-terminal de Stau2

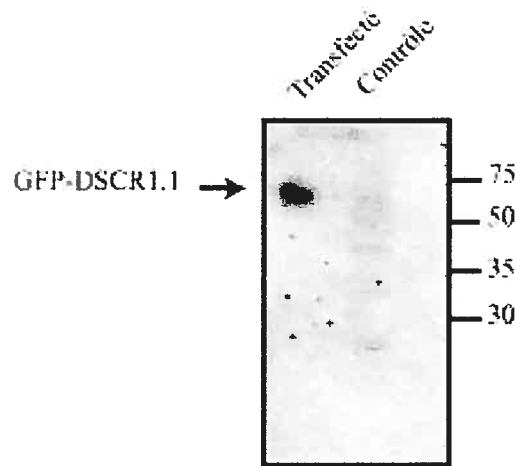
| Nom                       | No Acc      | Motif de liaison                           | fonction                              | fréq  |
|---------------------------|-------------|--|---------------------------------------|-------|
| ATPase S4                 | MMU39302    | Domaine de liaison à l'ATP                 | Protéasome                            | 3/37  |
| Gfm1 mitochondrial        | L14684.1    | Aucun                                      | Traduction                            | 1/37  |
| Stau2                     | NM_025303   | dsRBD3-STOP                                | Inconnue                              | 1/37  |
| ZFR                       | NM_011767.1 | 3 <sup>e</sup> doigt de Zinc (C2H2)        | Inconnue                              | 1/37  |
| Fth                       | NM_010239.1 | Domaine de liaison à la ferritine. Motif 2 | Liaison à la ferritine                | 5/37  |
| CGI-118/MRP L48           | BC037190.1  | Inconnue                                   | Protéine du ribosome mitochondrial    | 10/37 |
| Usp33                     | BC049870.1  | DUSP1 et DUSP2 <sup>1</sup>                | Protéase spécifique à l'ubiquitine    | 3/37  |
| Sc1                       | U64827.1    | aucun                                      | Associée à la matrice extracellulaire | 2/37  |
| YWHAB / 14-3-3 $\beta$    | AF058797.1  | C-terminal                                 | Plusieurs <sup>2</sup>                | 1/37  |
| ATPase Synthetase D       | AF298810.1  | Inconnue                                   | Synthèse ATP                          | 1/37  |
| MnSOD                     | Z18857.1    | Inconnue                                   | Protection contre radicaux libres     | 1/37  |
| DSCR1/calcipressine       | AF282255.1  | Inconnue                                   | Inhibiteur de la calcineurine         | 1/37  |
| UBI-D4/REQUIEM            | AK001837.1  | 1 <sup>er</sup> doigt de ZINC (PHD)        |                                       | 2/37  |
| ORF Inconnus <sup>3</sup> | ***         | ***  | ***                                   | 5/37  |

<sup>1</sup>DUSP : *Domain in Ubiquitin Specific Protease*

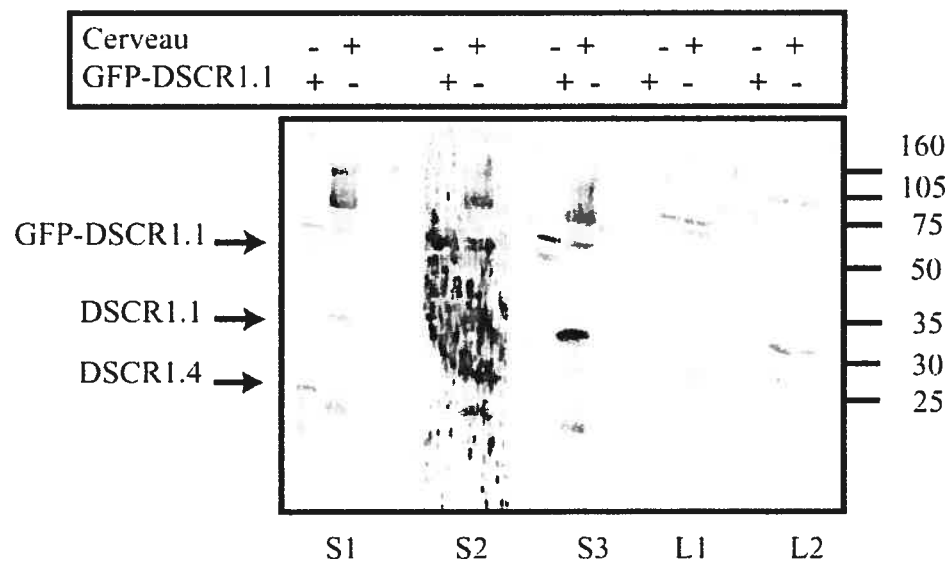
<sup>2</sup>14-3-3 $\beta$ : protéine impliquée dans la localisation subcellulaire de protéines suite à leur phosphorylation. YWHAB : activateur des tyrosine 3-monooxygénase / tryptophane 5-monooxygénase

<sup>3</sup>ORF inconnus sans séquence complémentaire dans les banques de données d'ADNc.

A



B



### Figure 10 : Caractérisation des sera anti-DSCR1

A) Lysat de cellules HEK293 transfectées avec un plasmide exprimant GFP-DSCR1.1<sup>57-248</sup> testé par immunobuvardage avec un sérum anti-GFP. B) Les différents sera de lapin et de souris anti-DSCR1 sont testés sur des lysats de cerveau et de cellules HEK293 transfectées avec un plasmide exprimant GFP-DSCR1.1<sup>57-248</sup>. Les sera anti-DSCR1 S1 et S3 (dilution de 1 : 5000) montrent un meilleur ratio signal/bruit de fond.

---

**SOURCES DOCUMENTAIRES**

---

- Aakalu,G., Smith,W.B., Nguyen,N., Jiang,C., and Schuman,E.M. (2001). Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons. *Neuron* 30, 489-502.
- Abel,T., Martin,K.C., Bartsch,D., and Kandel,E.R. (1998). Memory suppressor genes: inhibitory constraints on the storage of long-term memory. *Science* 279, 338-341.
- Abel,T., Nguyen,P.V., Barad,M., Deuel,T.A., Kandel,E.R., and Bourtchouladze,R. (1997). Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell* 88, 615-626.
- 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, 431-441.
- Allmang,C., Kufel,J., Chanfreau,G., Mitchell,P., Petfalski,E., and Tollervey,D. (1999a). Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J.* 18, 5399-5410.
- Allmang,C., Mitchell,P., Petfalski,E., and Tollervey,D. (2000). Degradation of ribosomal RNA precursors by the exosome. *Nucleic Acids Res.* 28, 1684-1691.
- Allmang,C., Petfalski,E., Podtelejnikov,A., Mann,M., Tollervey,D., and Mitchell,P. (1999b). The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' --> 5' exonucleases. *Genes Dev.* 13, 2148-2158.
- Antar,L.N. and Bassell,G.J. (2003). Sunrise at the synapse: the FMRP mRNP shaping the synaptic interface. *Neuron* 37, 555-558.
- Antonarakis,S.E., Warren,A.C., McCormick,M.K., Lewis,J.G., Hieter,P.A., and Chakravarti,A. (1989). Molecular mapping of chromosome 21 and the region responsible for Down syndrome. *Prog. Clin. Biol. Res.* 311, 29-43.
- Aoki,K., Suzuki,K., Sugano,T., Tasaka,T., Nakahara,K., Kuge,O., Omori,A., and Kasai,M. (1995). A novel gene, Translin, encodes a recombination hotspot binding protein associated with chromosomal translocations. *Nat. Genet.* 10, 167-174.
- Bachand,F., Triki,I., and Autexier,C. (2001). Human telomerase RNA-protein interactions. *Nucleic Acids Res.* 29, 3385-3393.

- Bagni,C., Mannucci,L., Dotti,C.G., and Amaldi,F. (2000). Chemical stimulation of synaptosomes modulates alpha -Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II mRNA association to polysomes. *J. Neurosci.* *20*, RC76.
- Banker,G. and Goslin,K. (1988). Developments in neuronal cell culture. *Nature* *336*, 185-186.
- Bannai,H., Fukatsu,K., Mizutani,A., Natsume,T., Iemura,S.I., Ikegami,T., Inoue,T., and Mikoshiba,K. (2004). An RNA-interacting Protein, SYNCRIP (Heterogeneous Nuclear Ribonuclear Protein Q1/NSAP1) Is a Component of mRNA Granule Transported with Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1 mRNA in Neuronal Dendrites. *J. Biol. Chem.* *279*, 53427-53434.
- Bar-Peled,M. and Raikhel,N.V. (1996). A method for isolation and purification of specific antibodies to a protein fused to the GST. *Anal. Biochem.* *241*, 140-142.
- Barco,A., Alarcon,J.M., and Kandel,E.R. (2002). Expression of constitutively active CREB protein facilitates the late phase of long-term potentiation by enhancing synaptic capture. *Cell* *108*, 689-703.
- Barlow,G.M., Chen,X.N., Shi,Z.Y., Lyons,G.E., Kurnit,D.M., Celle,L., Spinner,N.B., Zackai,E., Pettenati,M.J., Van Riper,A.J., Vekemans,M.J., Mjaatvedt,C.H., and Korenberg,J.R. (2001). Down syndrome congenital heart disease: a narrowed region and a candidate gene. *Genet. Med.* *3*, 91-101.
- Bassell,G.J., Oleynikov,Y., and Singer,R.H. (1999). The travels of mRNAs through all cells large and small. *FASEB J.* *13*, 447-454.
- 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*, 251-265.
- Beals,C.R., Clipstone,N.A., Ho,S.N., and Crabtree,G.R. (1997). Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction. *Genes Dev.* *11*, 824-834.
- Belanger,G., Stocksley,M.A., Vandromme,M., Schaeffer,L., Furic,L., DesGroseillers,L., and Jasmin,B.J. (2003). Localization of the RNA-binding proteins Staufen1 and Staufen2 at the mammalian neuromuscular junction. *J. Neurochem.* *86*, 669-677.
- Bergemann,A.D. and Johnson,E.M. (1992). The HeLa Pur factor binds single-stranded DNA at a specific element conserved in gene flanking regions and origins of DNA replication. *Mol. Cell Biol.* *12*, 1257-1265.
- 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*, 437-445.

- Bliss, T.V. and Collingridge, G.L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.
- Blondeau, F., Ritter, B., Allaire, P.D., Wasiaik, S., Girard, M., Hussain, N.K., Angers, A., Legendre-Guillemain, V., Roy, L., Boismenu, D., Kearney, R.E., Bell, A.W., Bergeron, J.J., and McPherson, P.S. (2004). Tandem MS analysis of brain clathrin-coated vesicles reveals their critical involvement in synaptic vesicle recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 3833-3838.
- Bohnsack, M.T., Czaplinski, K., and Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10, 185-191.
- Bortolotto, Z.A., Lauri, S., Isaac, J.T., and Collingridge, G.L. (2003). Kainate receptors and the induction of mossy fibre long-term potentiation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 358, 657-666.
- Bourtchuladze, R., Frenguelli, B., Blendy, J., Cioffi, D., Schutz, G., and Silva, A.J. (1994). Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* 79, 59-68.
- Bousquet-Antonelli, C., Presutti, C., and Tollervey, D. (2000). Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. *Cell* 102, 765-775.
- Brackmann, M., Zhao, C., Kuhl, D., Manahan-Vaughan, D., and Braunewell, K.H. (2004). MGluRs regulate the expression of neuronal calcium sensor proteins NCS-1 and VILIP-1 and the immediate early gene *arg3.1/arc* in the hippocampus in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 1073-1079.
- Bradshaw, K.D., Emptage, N.J., and Bliss, T.V. (2003). A role for dendritic protein synthesis in hippocampal late LTP. *Eur. J. Neurosci.* 18, 3150-3152.
- Braun, A.P. and Schulman, H. (1995). The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase: from form to function. *Annu. Rev. Physiol* 57, 417-445.
- Brendel, C., Rehbein, M., Kreienkamp, H.J., Buck, F., Richter, D., and Kindler, S. (2004). Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem. J.* 384, 239-246.
- Briggs, M.W. and Sacks, D.B. (2003). IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. *EMBO Rep.* 4, 571-574.
- Broadus, J., Fuerstenberg, S., and Doe, C.Q. (1998). Staufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature* 391, 792-795.
- Buchner, G., Bassi, M.T., Andolfi, G., Ballabio, A., and Franco, B. (1999). Identification of a novel homolog of the *Drosophila* staufen protein in the chromosome 8q13-q21.1 region. *Genomics* 62, 113-118.

- Campbell,R.E., Tour,O., Palmer,A.E., Steinbach,P.A., Baird,G.S., Zacharias,D.A., and Tsien,R.Y. (2002). A monomeric red fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 7877-7882.
- Carson,J.H., Cui,H., and Barbarese,E. (2001). The balance of power in RNA trafficking. *Curr. Opin. Neurobiol.* *11*, 558-563.
- Carter,M.S., Li,S., and Wilkinson,M.F. (1996). A splicing-dependent regulatory mechanism that detects translation signals. *EMBO J.* *15*, 5965-5975.
- Cerione,R.A. (2004). Cdc42: new roads to travel. *Trends Cell Biol.* *14*, 127-132.
- Cheeseman,I.M. and Desai,A. (2004). Cell division: AAAacking the mitotic spindle. *Curr. Biol.* *14*, R70-R72.
- Crino,P.B. and Eberwine,J. (1996). Molecular characterization of the dendritic growth cone: regulated mRNA transport and local protein synthesis. *Neuron* *17*, 1173-1187.
- Cullen,B.R. (2003). Nuclear RNA export. *J. Cell Sci.* *116*, 587-597.
- Deitch,J.S. and Banker,G.A. (1993). An electron microscopic analysis of hippocampal neurons developing in culture: early stages in the emergence of polarity. *J. Neurosci.* *13*, 4301-4315.
- Delabar,J.M., Theophile,D., Rahmani,Z., Chettouh,Z., Blouin,J.L., Prieur,M., Noel,B., and Sinet,P.M. (1993). Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur J Hum. Genet.* *1*, 114-124.
- Duchaine,T.F., Hemraj,I., Furic,L., Deitinghoff,A., Kiebler,M.A., and DesGroseillers,L. (2002). Stauf2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J. Cell Sci.* *115*, 3285-3295.
- Duncan,R., Bazar,L., Michelotti,G., Tomonaga,T., Krutzsch,H., Avigan,M., and Levens,D. (1994). A sequence-specific, single-strand binding protein activates the far upstream element of c-myc and defines a new DNA-binding motif. *Genes Dev.* *8*, 465-480.
- Edman,C.F. and Schulman,H. (1994). Identification and characterization of delta B-CaM kinase and delta C-CaM kinase from rat heart, two new multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase isoforms. *Biochim. Biophys. Acta* *1221*, 89-101.
- Eichenbaum,H. (2000). Hippocampus: mapping or memory? *Curr. Biol.* *10*, R785-R787.
- Eom,T., Antar,L.N., Singer,R.H., and Bassell,G.J. (2003). Localization of a beta-actin messenger ribonucleoprotein complex with zipcode-binding protein modulates the density of dendritic filopodia and filopodial synapses. *J. Neurosci.* *23*, 10433-10444.



Erickson, J.W., Cerione, R.A., and Hart, M.J. (1997). Identification of an actin cytoskeletal complex that includes IQGAP and the Cdc42 GTPase. *J. Biol. Chem.* *272*, 24443-24447.

Ermak, G., Morgan, T.E., and Davies, K.J. (2001). Chronic overexpression of the calcineurin inhibitory gene DSCR1 (Adapt78) is associated with Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* *276*, 38787-38794.

Fazeli, M.S., Corbet, J., Dunn, M.J., Dolphin, A.C., and Bliss, T.V. (1993). Changes in protein synthesis accompanying long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. *J. Neurosci.* *13*, 1346-1353.

Feig, S. and Lipton, P. (1993). Pairing the cholinergic agonist carbachol with patterned Schaffer collateral stimulation initiates protein synthesis in hippocampal CA1 pyramidal cell dendrites via a muscarinic, NMDA-dependent mechanism. *J. Neurosci.* *13*, 1010-1021.

Finerty, P.J., Jr. and Bass, B.L. (1997). A *Xenopus* zinc finger protein that specifically binds dsRNA and RNA-DNA hybrids. *J. Mol. Biol.* *271*, 195-208.

Frey, U. and Morris, R.G. (1997). Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature* *385*, 533-536.

Fuentes, J.J., Genesca, L., Kingsbury, T.J., Cunningham, K.W., Perez-Riba, M., Estivill, X., and De La, L.S. (2000). DSCR1, overexpressed in Down syndrome, is an inhibitor of calcineurin-mediated signaling pathways. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 1681-1690.

Fuentes, J.J., Pritchard, M.A., and Estivill, X. (1997). Genomic organization, alternative splicing, and expression patterns of the DSCR1 (Down syndrome candidate region 1) gene. *Genomics* *44*, 358-361.

Fuentes, J.J., Pritchard, M.A., Planas, A.M., Bosch, A., Ferrer, I., and Estivill, X. (1995). A new human gene from the Down syndrome critical region encodes a proline-rich protein highly expressed in fetal brain and heart. *Hum. Mol. Genet.* *4*, 1935-1944.

Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M., and Nishida, E. (1997). CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* *390*, 308-311.

Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P.H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J.J., and Desjardins, M. (2002). Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* *110*, 119-131.

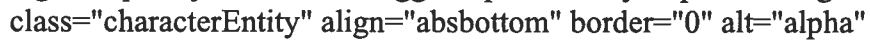
Gallo, G. and Letourneau, P.C. (2004). Regulation of growth cone actin filaments by guidance cues. *J. Neurobiol.* *58*, 92-102.

- Garin,J., Diez,R., Kieffer,S., Dermine,J.F., Duclos,S., Gagnon,E., Sadoul,R., Rondeau,C., and Desjardins,M. (2001). The phagosome proteome: insight into phagosome functions. *J Cell Biol.* *152*, 165-180.
- Gehring,N.H., Neu-Yilik,G., Schell,T., Hentze,M.W., and Kulozik,A.E. (2003). Y14 and hUpf3b form an NMD-activating complex. *Mol. Cell* *11*, 939-949.
- Gherzi,R., Lee,K.Y., Briata,P., Wegmuller,D., Moroni,C., Karin,M., and Chen,C.Y. (2004). A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery. *Mol. Cell* *14*, 571-583.
- Gingras,A.C., Raught,B., and Sonenberg,N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* *68*, 913-963.
- Greenough,W.T., Hwang,H.M., and Gorman,C. (1985). Evidence for active synapse formation or altered postsynaptic metabolism in visual cortex of rats reared in complex environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *82*, 4549-4552.
- Griffith,L.C., Lu,C.S., and Sun,X.X. (2003). CaMKII, an enzyme on the move: regulation of temporospatial localization. *Mol. Interv.* *3*, 386-403.
- Gu,W., Pan,F., Zhang,H., Bassell,G.J., and Singer,R.H. (2002). A predominantly nuclear protein affecting cytoplasmic localization of beta-actin mRNA in fibroblasts and neurons. *J. Cell Biol.* *156*, 41-51.
- Gustafsson,B., Wigstrom,H., Abraham,W.C., and Huang,Y.Y. (1987). Long-term potentiation in the hippocampus using depolarizing current pulses as the conditioning stimulus to single volley synaptic potentials. *J. Neurosci.* *7*, 774-780.
- Guzowski,J.F. (2002). Insights into immediate-early gene function in hippocampal memory consolidation using antisense oligonucleotide and fluorescent imaging approaches. *Hippocampus* *12*, 86-104.
- Guzowski,J.F., Lyford,G.L., Stevenson,G.D., Houston,F.P., McGaugh,J.L., Worley,P.F., and Barnes,C.A. (2000). Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* *20*, 3993-4001.
- Guzowski,J.F., Setlow,B., Wagner,E.K., and McGaugh,J.L. (2001). Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *J Neurosci* *21*, 5089-5098.
- Han,J.R., Gu,W., and Hecht,N.B. (1995a). Testis-brain RNA-binding protein, a testicular translational regulatory RNA-binding protein, is present in the brain and binds to the 3' untranslated regions of transported brain mRNAs. *Biol. Reprod.* *53*, 707-717.

Han, J.R., Yiu, G.K., and Hecht, N.B. (1995b). Testis/brain RNA-binding protein attaches translationally repressed and transported mRNAs to microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* *92*, 9550-9554.

Hannan, A.J., Schevzov, G., Gunning, P., Jeffrey, P.L., and Weinberger, R.P. (1995). Intracellular localization of tropomyosin mRNA and protein is associated with development of neuronal polarity. *Mol. Cell Neurosci.* *6*, 397-412.

Hattori, M., Fujiyama, A., Taylor, T.D., Watanabe, H., Yada, T., Park, H.S., Toyoda, A., Ishii, K., Totoki, Y., Choi, D.K., Groner, Y., Soeda, E., Ohki, M., Takagi, T., Sakaki, Y., Taudien, S., Blechschmidt, K., Polley, A., Menzel, U., Delabar, J., Kumpf, K., Lehmann, R., Patterson, D., Reichwald, K., Rump, A., Schillhabel, M., Schudy, A., Zimmermann, W., Rosenthal, A., Kudoh, J., Schibuya, K., Kawasaki, K., Asakawa, S., Shintani, A., Sasaki, T., Nagamine, K., Mitsuyama, S., Antonarakis, S.E., Minoshima, S., Shimizu, N., Nordtsiek, G., Hornischer, K., Brant, P., Scharfe, M., Schon, O., Desario, A., Reichelt, J., Kauer, G., Blocker, H., Ramser, J., Beck, A., Klages, S., Hennig, S., Riesselmann, L., Dagand, E., Haaf, T., Wehrmeyer, S., Borzym, K., Gardiner, K., Nizetic, D., Francis, F., Lehrach, H., Reinhardt, R., and Yaspo, M.L. (2000). The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* *405*, 311-319.

Havik, B., Rokke, H., Bardsen, K., Davanger, S., and Bramham, C.R. (2003). Bursts of high-frequency stimulation trigger rapid delivery of pre-existing -CaMKII mRNA to synapses: a mechanism in dendritic protein synthesis during long-term potentiation in adult awake rats. *European Journal of Neuroscience* *17*, 2679-2689.

Hirst, J., Miller, S.E., Taylor, M.J., von Mollard, G.F., and Robinson, M.S. (2004). EpsinR is an adaptor for the SNARE protein Vti1b. *Mol. Biol. Cell* *15*, 5593-5602.

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*, 7021-7029.

Hong, Y.R., Chen, C.H., Chuo, M.H., Liou, S.Y., and Howng, S.L. (2000). Genomic organization and molecular characterization of the human ninein gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *279*, 989-995.

Howng, S.L., Hsu, H.C., Cheng, T.S., Lee, Y.L., Chang, L.K., Lu, P.J., and Hong, Y.R. (2004). A novel ninein-interaction protein, CGI-99, blocks ninein phosphorylation by GSK3beta and is highly expressed in brain tumors. *FEBS Lett.* *566*, 162-168.

Huang, Y.Y. and Kandel, E.R. (1994). Recruitment of long-lasting and protein kinase A-dependent long-term potentiation in the CA1 region of hippocampus requires repeated tetanization. *Learn. Mem.* *1*, 74-82.

Huarte,M., Sanz-Ezquerro,J.J., Roncal,F., Ortin,J., and Nieto,A. (2001). PA subunit from influenza virus polymerase complex interacts with a cellular protein with homology to a family of transcriptional activators. *J Virol.* *75*, 8597-8604.

Ikegami,S., Kato,A., Kudo,Y., Kuno,T., Ozawa,F., and Inokuchi,K. (1996). A facilitatory effect on the induction of long-term potentiation in vivo by chronic administration of antisense oligodeoxynucleotides against catalytic subunits of calcineurin. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *41*, 183-191.

Inoue,K., Khajavi,M., Ohyama,T., Hirabayashi,S., Wilson,J., Reggin,J.D., Mancias,P., Butler,I.J., Wilkinson,M.F., Wegner,M., and Lupski,J.R. (2004). Molecular mechanism for distinct neurological phenotypes conveyed by allelic truncating mutations. *Nat. Genet.* *36*, 361-369.

Jansen,R.P. (2001). mRNA localization: message on the move. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 247-256.

Jensen,T.H., Dower,K., Libri,D., and Rosbash,M. (2003). Early formation of mRNP: license for export or quality control? *Mol. Cell* *11*, 1129-1138.

Kahvejian,A., Roy,G., and Sonenberg,N. (2001). The mRNA closed-loop model: the function of PABP and PABP-interacting proteins in mRNA translation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *66*, 293-300.

Kanai,Y., Dohmae,N., and Hirokawa,N. (2004). Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* *43*, 513-525.

Kaplan,D.R. and Miller,F.D. (1997). Signal transduction by the neurotrophin receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* *9*, 213-221.

Kawaguchi,S.Y. and Hirano,T. (2002). Signaling cascade regulating long-term potentiation of GABA(A) receptor responsiveness in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* *22*, 3969-3976.

Keene,J.D. and Tenenbaum,S.A. (2002). Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. *Mol. Cell* *9*, 1161-1167.

Kiebler,M.A. and DesGroseillers,L. (2000). Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron* *25*, 19-28.

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*, 288-297.

Kim,E., Naisbitt,S., Hsueh,Y.P., Rao,A., Rothschild,A., Craig,A.M., and Sheng,M. (1997). GKAP, a novel synaptic protein that interacts with the guanylate kinase-like

domain of the PSD-95/SAP90 family of channel clustering molecules. *J. Cell Biol.* *136*, 669-678.

Kim, V.N. (2004). MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol.* *14*, 156-159.

Kim, V.N., Kataoka, N., and Dreyfuss, G. (2001). Role of the nonsense-mediated decay factor hUpf3 in the splicing-dependent exon-exon junction complex. *Science* *293*, 1832-1836.

Kim, Y.K., Furic, L., DesGroseillers, L., and Maquat, L.E. (2005). Mammalian Staufen1 Recruits Upf1 to Specific mRNA 3'UTRs so as to Elicit mRNA Decay. *Cell* *120*, 195-208.

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*, 403-412.

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*, 441-451.

Kislauskis, E.H., Zhu, X., and Singer, R.H. (1997). beta-Actin messenger RNA localization and protein synthesis augment cell motility. *J. Cell Biol.* *136*, 1263-1270.

Kleines, M., Gartner, A., Ritter, K., and Schaade, L. (2001). Cloning and expression of the human single copy homologue of the mouse zinc finger protein zfr. *Gene* *275*, 157-162.

Knowles, R.B., Sabry, J.H., Martone, M.E., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Bassell, G.J., and Kosik, K.S. (1996). Translocation of RNA granules in living neurons. *J. Neurosci.* *16*, 7812-7820.

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*, 2945-2953.

Korenberg, J.R., Chen, X.N., Schipper, R., Sun, Z., Gonsky, R., Gerwehr, S., Carpenter, N., Daumer, C., Dignan, P., Distech, C., and . (1994). Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 4997-5001.

Korenberg, J.R., Kawashima, H., Pulst, S.M., Ikeuchi, T., Ogasawara, N., Yamamoto, K., Schonberg, S.A., West, R., Allen, L., Magenis, E., and . (1990). Molecular definition of a region of chromosome 21 that causes features of the Down syndrome phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* *47*, 236-246.

Kornhauser, J.M. and Greenberg, M.E. (1997). A kinase to remember: dual roles for MAP kinase in long-term memory. *Neuron* *18*, 839-842.

Kosik, K.S. and Krichevsky, A.M. (2002). The message and the messenger: delivering RNA in neurons. *Sci. STKE*. 2002, E16.

Krichevsky, A.M. and Kosik, K.S. (2001). Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron* 32, 683-696.

Krichevsky, A.M. and Kosik, K.S. (2002). RNAi functions in cultured mammalian neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 99, 11926-11929.

Krug, M., Lossner, B., and Ott, T. (1984). Anisomycin blocks the late phase of long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats. *Brain Res. Bull.* 13, 39-42.

Kullmann, D.M., Asztely, F., and Walker, M.C. (2000). The role of mammalian ionotropic receptors in synaptic plasticity: LTP, LTD and epilepsy. *Cell Mol. Life Sci.* 57, 1551-1561.

Lai, C.H., Chou, C.Y., Ch'ang, L.Y., Liu, C.S., and Lin, W. (2000). Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics. *Genome Res.* 10, 703-713.

Lalucque, H. and Silar, P. (2000). In vivo labelling of functional ribosomes reveals spatial regulation during starvation in *Podospora anserina*. *BMC. Genet.* 1, 3.

Larocque, D., Pilotte, J., Chen, T., Cloutier, F., Massie, B., Pedraza, L., Couture, R., Lasko, P., Almazan, G., and Richard, S. (2002). Nuclear retention of MBP mRNAs in the quaking viable mice. *Neuron* 36, 815-829.

Latham, V.M., Jr., Kislaukis, E.H., Singer, R.H., and Ross, A.F. (1994). Beta-actin mRNA localization is regulated by signal transduction mechanisms. *J. Cell Biol.* 126, 1211-1219.

Lau, P.P., Zhu, H.J., Nakamuta, M., and Chan, L. (1997). Cloning of an Apobec-1-binding protein that also interacts with apolipoprotein B mRNA and evidence for its involvement in RNA editing. *J. Biol. Chem.* 272, 1452-1455.

Le Hir, H., Izaurralde, E., Maquat, L.E., and Moore, M.J. (2000). The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J.* 19, 6860-6869.

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, H.K., Barbarosie, M., Kameyama, K., Bear, M.F., and Huganir, R.L. (2000). Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* 405, 955-959.

- 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, 437-447.
- Linder,P. (2003). Yeast RNA helicases of the DEAD-box family involved in translation initiation. *Biol. Cell* 95, 157-167.
- Link,W., Konietzko,U., Kauselmann,G., Krug,M., Schwanke,B., Frey,U., and Kuhl,D. (1995). Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 5734-5738.
- Lisman,J. (1994). The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory. *Trends Neurosci.* 17, 406-412.
- Lisman,J., Schulman,H., and Cline,H. (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 175-190.
- Litman,P., Barg,J., Rindzoonski,L., and Ginzburg,I. (1993). Subcellular localization of tau mRNA in differentiating neuronal cell culture: implications for neuronal polarity. *Neuron* 10, 627-638.
- Long,R.M., Gu,W., Meng,X., Gonsalvez,G., Singer,R.H., and Chartrand,P. (2001). An exclusively nuclear RNA-binding protein affects asymmetric localization of ASH1 mRNA and Ash1p in yeast. *J. Cell Biol.* 153, 307-318.
- Lord,J.M., Ceriotti,A., and Roberts,L.M. (2002). ER dislocation: Cdc48p/p97 gets into the AAAct. *Curr. Biol.* 12, R182-R184.
- Lu,B. (2003). BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn. Mem.* 10, 86-98.
- Lu,Y.M., Mansuy,I.M., Kandel,E.R., and Roder,J. (2000). Calcineurin-mediated LTD of GABAergic inhibition underlies the increased excitability of CA1 neurons associated with LTP. *Neuron* 26, 197-205.
- Luo,M., Duchaine,T.F., and DesGroseillers,L. (2002). Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association. *Biochem. J.* 365, 817-824.
- Lyford,G.L., Yamagata,K., Kaufmann,W.E., Barnes,C.A., Sanders,L.K., Copeland,N.G., Gilbert,D.J., Jenkins,N.A., Lanahan,A.A., and Worley,P.F. (1995). Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* 14, 433-445.
- Lykke-Andersen,J., Shu,M.D., and Steitz,J.A. (2001). Communication of the position of exon-exon junctions to the mRNA surveillance machinery by the protein RNPS1. *Science* 293, 1836-1839.

- Macchi,P., Brownawell,A.M., Grunewald,B., DesGroseillers,L., Macara,I.G., and Kiebler,M.A. (2004). The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2: nucleolar accumulation and isoform-specific exportin-5-dependent export. *J. Biol. Chem.* *279*, 31440-31444.
- Macchi,P., Kroening,S., Palacios,I.M., Baldassa,S., Grunewald,B., Ambrosino,C., Goetze,B., Lupas,A., St Johnston,D., and Kiebler,M. (2003). Barentsz, a new component of the Staufen-containing ribonucleoprotein particles in mammalian cells, interacts with Staufen in an RNA-dependent manner. *J. Neurosci.* *23*, 5778-5788.
- Makino,Y., Yoshida,T., Yogosawa,S., Tanaka,K., Muramatsu,M., and Tamura,T.A. (1999). Multiple mammalian proteasomal ATPases, but not proteasome itself, are associated with TATA-binding protein and a novel transcriptional activator, TIP120. *Genes Cells* *4*, 529-539.
- Malinow,R., Otmakhov,N., Blum,K.I., and Lisman,J. (1994). Visualizing hippocampal synaptic function by optical detection of Ca<sup>2+</sup> entry through the N-methyl-D-aspartate channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *91*, 8170-8174.
- 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*, 2100-2105.
- Malleret,G., Haditsch,U., Genoux,D., Jones,M.W., Bliss,T.V., Vanhose,A.M., Weitlauf,C., Kandel,E.R., Winder,D.G., and Mansuy,I.M. (2001). Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell* *104*, 675-686.
- Mallik,R. and Gross,S.P. (2004). Molecular motors: strategies to get along. *Curr. Biol.* *14*, R971-R982.
- Mansuy,I.M., Mayford,M., Jacob,B., Kandel,E.R., and Bach,M.E. (1998a). Restricted and regulated overexpression reveals calcineurin as a key component in the transition from short-term to long-term memory. *Cell* *92*, 39-49.
- Mansuy,I.M., Winder,D.G., Moallem,T.M., Osman,M., Mayford,M., Hawkins,R.D., and Kandel,E.R. (1998b). Inducible and reversible gene expression with the rtTA system for the study of memory. *Neuron* *21*, 257-265.
- Maquat,L.E. (2004). Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 89-99.
- Maquat,L.E. and Serin,G. (2001). Nonsense-mediated mRNA decay: insights into mechanism from the cellular abundance of human Upf1, Upf2, Upf3, and Upf3X proteins. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *66*, 313-320.



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*, 2212-2219.

Martin,K.C., Casadio,A., Zhu,H., Yaping,E., Rose,J.C., Chen,M., Bailey,C.H., and Kandel,E.R. (1997). Synapse-specific, long-term facilitation of aplysia sensory to motor synapses: a function for local protein synthesis in memory storage. *Cell* *91*, 927-938.

Mason,C.A. and Wang,L.C. (1997). Growth cone form is behavior-specific and, consequently, position-specific along the retinal axon pathway. *J. Neurosci.* *17*, 1086-1100.

Masuda,E.S., Liu,J., Imamura,R., Imai,S.I., Arai,K.I., and Arai,N. (1997). Control of NFATx1 nuclear translocation by a calcineurin-regulated inhibitory domain. *Mol. Cell Biol.* *17*, 2066-2075.

Maycox,P.R., Link,E., Reetz,A., Morris,S.A., and Jahn,R. (1992). Clathrin-coated vesicles in nervous tissue are involved primarily in synaptic vesicle recycling. *J. Cell Biol.* *118*, 1379-1388.

Mayford,M., Baranes,D., Podsypanina,K., and Kandel,E.R. (1996). The 3'-untranslated region of CaMKII alpha is a cis-acting signal for the localization and translation of mRNA in dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *93*, 13250-13255.

McCormick,M.K., Schinzel,A., Petersen,M.B., Stetten,G., Driscoll,D.J., Cantu,E.S., Tranebjaerg,L., Mikkelsen,M., Watkins,P.C., and Antonarakis,S.E. (1989). Molecular genetic approach to the characterization of the "Down syndrome region" of chromosome 21. *Genomics* *5*, 325-331.

McNaughton,B.L. (2003). Long-term potentiation, cooperativity and Hebb's cell assemblies: a personal history. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* *358*, 629-634.

Meagher,M.J. and Braun,R.E. (2001). Requirement for the murine zinc finger protein ZFR in perigastrulation growth and survival. *Mol. Cell Biol.* *21*, 2880-2890.

Meagher,M.J., Schumacher,J.M., Lee,K., Holdcraft,R.W., Edelhoff,S., Disteché,C., and Braun,R.E. (1999). Identification of ZFR, an ancient and highly conserved murine chromosome-associated zinc finger protein. *Gene* *228*, 197-211.

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*, 1366-1377.

Miki,T. and Yoneda,Y. (2004). Alternative splicing of Staufen2 creates the nuclear export signal for CRM1 (Exportin 1). *J. Biol. Chem.* *279*, 47473-47479.

Miller,S., Yasuda,M., Coats,J.K., Jones,Y., Martone,M.E., and Mayford,M. (2002). Disruption of dendritic translation of CaMKIIalpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuron* 36, 507-519.

Miller,S.G. and Kennedy,M.B. (1985). Distinct forebrain and cerebellar isozymes of type II Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase associate differently with the postsynaptic density fraction. *J. Biol. Chem.* 260, 9039-9046.

Milner,B., Squire,L.R., and Kandel,E.R. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 20, 445-468.

Min,H., Turck,C.W., Nikolic,J.M., and Black,D.L. (1997). A new regulatory protein, KSRP, mediates exon inclusion through an intronic splicing enhancer. *Genes Dev.* 11, 1023-1036.

Moga,D.E., Calhoun,M.E., Chowdhury,A., Worley,P., Morrison,J.H., and Shapiro,M.L. (2004). Activity-regulated cytoskeletal-associated protein is localized to recently activated excitatory synapses. *Neuroscience* 125, 7-11.

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, 557-564.

Mori,Y., Imaizumi,K., Katayama,T., Yoneda,T., and Tohyama,M. (2000). Two cis-acting elements in the 3' untranslated region of alpha-CaMKII regulate its dendritic targeting. *Nat. Neurosci.* 3, 1079-1084.

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, 5441-5451.

Muller,D. and Lynch,G. (1988). Long-term potentiation differentially affects two components of synaptic responses in hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 9346-9350.

Mural,R.J., Adams,M.D., Myers,E.W., Smith,H.O., Miklos,G.L., Wides,R., Halpern,A., Li,P.W., Sutton,G.G., Nadeau,J., Salzberg,S.L., Holt,R.A., Kodira,C.D., Lu,F., Chen,L., Deng,Z., Evangelista,C.C., Gan,W., Heiman,T.J., Li,J., Li,Z., Merkulov,G.V., Milshina,N.V., Naik,A.K., Qi,R., Shue,B.C., Wang,A., Wang,J., Wang,X., Yan,X., Ye,J., Yooseph,S., Zhao,Q., Zheng,L., Zhu,S.C., Biddick,K., Bolanos,R., Delcher,A.L., Dew,I.M., Fasulo,D., Flanigan,M.J., Huson,D.H., Kravitz,S.A., Miller,J.R., Mobarry,C.M., Reinert,K., Remington,K.A., Zhang,Q., Zheng,X.H., Nusskern,D.R., Lai,Z., Lei,Y., Zhong,W., Yao,A., Guan,P., Ji,R.R., Gu,Z., Wang,Z.Y., Zhong,F., Xiao,C., Chiang,C.C., Yandell,M., Wortman,J.R., Amanatides,P.G., Hladun,S.L., Pratts,E.C., Johnson,J.E., Dodson,K.L., Woodford,K.J., Evans,C.A., Gropman,B., Rusch,D.B., Venter,E., Wang,M., Smith,T.J., Houck,J.T., Tompkins,D.E., Haynes,C., Jacob,D., Chin,S.H., Allen,D.R., Dahlke,C.E., Sanders,R., Li,K., Liu,X., Levitsky,A.A.,

Majoros, W.H., Chen, Q., Xia, A.C., Lopez, J.R., Donnelly, M.T., Newman, M.H., Glodek, A., Kraft, C.L., Nodell, M., Ali, F., An, H.J., Baldwin-Pitts, D., Beeson, K.Y., Cai, S., Carnes, M., Carver, A., Caulk, P.M., Center, A., Chen, Y.H., Cheng, M.L., Coyne, M.D., Crowder, M., Danaher, S., Davenport, L.B., Desilets, R., Dietz, S.M., Doup, L., Dullaghan, P., Ferriera, S., Fosler, C.R., Gire, H.C., Gluecksmann, A., Gocayne, J.D., Gray, J., Hart, B., Haynes, J., Hoover, J., Howland, T., Ibegwam, C., Jalali, M., Johns, D., Kline, L., Ma, D.S., MacCawley, S., Magoon, A., Mann, F., May, D., McIntosh, T.C., Mehta, S., Moy, L., Moy, M.C., Murphy, B.J., Murphy, S.D., Nelson, K.A., Nuri, Z., Parker, K.A., Prudhomme, A.C., Puri, V.N., Qureshi, H., Raley, J.C., Reardon, M.S., Regier, M.A., Rogers, Y.H., Romblad, D.L., Schutz, J., Scott, J.L., Scott, R., Sitter, C.D., Smallwood, M., Sprague, A.C., Stewart, E., Strong, R.V., Suh, E., Sylvester, K., Thomas, R., Tint, N.N., Tsonis, C., Wang, G., Wang, G., Williams, M.S., Williams, S.M., Windsor, S.M., Wolfe, K., Wu, M.M., Zaveri, J., Chaturvedi, K., Gabrielian, A.E., Ke, Z., Sun, J., Subramanian, G., Venter, J.C., Pfannkoch, C.M., Barnstead, M., and Stephenson, L.D. (2002). A comparison of whole-genome shotgun-derived mouse chromosome 16 and the human genome. *Science* 296, 1661-1671.

Nagy, E. and Maquat, L.E. (1998). A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem. Sci.* 23, 198-199.

Naisbitt, S., Kim, E., Tu, J.C., Xiao, B., Sala, C., Valtschanoff, J., Weinberg, R.J., Worley, P.F., and Sheng, M. (1999). Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron* 23, 569-582.

Nicoll, R.A. and Malenka, R.C. (1995). Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 377, 115-118.

Nishi, K., Yoshida, M., Fujiwara, D., Nishikawa, M., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1994). Leptomycin B targets a regulatory cascade of crm1, a fission yeast nuclear protein, involved in control of higher order chromosome structure and gene expression. *J. Biol. Chem.* 269, 6320-6324.

Nobes, C.D. and Hall, A. (1999). Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J. Cell Biol.* 144, 1235-1244.

Ohashi, S., Kobayashi, S., Omori, A., Ohara, S., Omae, A., Muramatsu, T., Li, Y., and Anzai, K. (2000). The single-stranded DNA- and RNA-binding proteins pur alpha and pur beta link BC1 RNA to microtubules through binding to the dendrite-targeting RNA motifs. *J. Neurochem.* 75, 1781-1790.

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, 37804-37810.

- 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.
- Otani, S. and Abraham, W.C. (1989). Inhibition of protein synthesis in the dentate gyrus, but not the entorhinal cortex, blocks maintenance of long-term potentiation in rats. *Neurosci. Lett.* *106*, 175-180.
- Paddison, P.J., Caudy, A.A., Sachidanandam, R., and Hannon, G.J. (2004). Short hairpin activated gene silencing in mammalian cells. *Methods Mol. Biol.* *265*, 85-100.
- Pei, Q., Tordera, R., Sprakes, M., and Sharp, T. (2004). Glutamate receptor activation is involved in 5-HT<sub>2</sub> agonist-induced Arc gene expression in the rat cortex. *Neuropharmacology* *46*, 331-339.
- Prevot, D., Darlix, J.L., and Ohlmann, T. (2003). Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol. Cell* *95*, 141-156.
- Rao, A. and Steward, O. (1991). Evidence that protein constituents of postsynaptic membrane specializations are locally synthesized: analysis of proteins synthesized within synaptosomes. *J. Neurosci.* *11*, 2881-2895.
- Reeves, R.H., Baxter, L.L., and Richtsmeier, J.T. (2001). Too much of a good thing: mechanisms of gene action in Down syndrome. *Trends Genet.* *17*, 83-88.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Seraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.* *17*, 1030-1032.
- Righi, M., Tongiorgi, E., and Cattaneo, A. (2000). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) induces dendritic targeting of BDNF and tyrosine kinase B mRNAs in hippocampal neurons through a phosphatidylinositol-3 kinase-dependent pathway. *J. Neurosci.* *20*, 3165-3174.
- Rook, M.S., Lu, M., and Kosik, K.S. (2000). CaMKIIalpha 3' untranslated region-directed mRNA translocation in living neurons: visualization by GFP linkage. *J. Neurosci.* *20*, 6385-6393.
- 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*, 2158-2165.
- Rothermel, B., Vega, R.B., Yang, J., Wu, H., Bassel-Duby, R., and Williams, R.S. (2000). A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling. *J Biol. Chem.* *275*, 8719-8725.
- 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*, 1847-1857.

Schuman,E.M. (1999). mRNA trafficking and local protein synthesis at the synapse. *Neuron* 23, 645-648.

Shaner,N.C., Campbell,R.E., Steinbach,P.A., Giepmans,B.N., Palmer,A.E., and Tsien,R.Y. (2004). Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 22, 1567-1572.

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, 1837-1846.

Shiina,N., Shinkura,K., and Tokunaga,M. (2005). A novel RNA-binding protein in neuronal RNA granules: regulatory machinery for local translation. *J Neurosci* 25, 4420-4434.

Shim,J., Lim,H., Yates,R., and Karin,M. (2002). Nuclear export of NF90 is required for interleukin-2 mRNA stabilization. *Mol. Cell* 10, 1331-1344.

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.

Stacey,D.W., Hitomi,M., Kanovsky,M., Gan,L., and Johnson,E.M. (1999). Cell cycle arrest and morphological alterations following microinjection of NIH3T3 cells with Pur alpha. *Oncogene* 18, 4254-4261.

Stage-Zimmermann,T., Schmidt,U., and Silver,P.A. (2000). Factors affecting nuclear export of the 60S ribosomal subunit in vivo. *Mol. Biol. Cell* 11, 3777-3789.

Steward,O. (1995). Targeting of mRNAs to subsynaptic microdomains in dendrites. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5, 55-61.

Steward,O., Falk,P.M., and Torre,E.R. (1996). Ultrastructural basis for gene expression at the synapse: synapse-associated polyribosome complexes. *J. Neurocytol.* 25, 717-734.

Steward,O. and Levy,W.B. (1982). Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J. Neurosci.* 2, 284-291.

Steward,O. and Schuman,E.M. (2001). Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 299-325.

Steward,O. and Schuman,E.M. (2003). Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons. *Neuron* 40, 347-359.

Steward,O., Wallace,C.S., Lyford,G.L., and Worley,P.F. (1998). Synaptic activation causes the mRNA for the IEG *Arc* to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* 21, 741-751.

Steward,O. and Worley,P.F. (2001). A cellular mechanism for targeting newly synthesized mRNAs to synaptic sites on dendrites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A* 98, 7062-7068.

Sung,Y.J., Dolzhanskaya,N., Nolin,S.L., Brown,T., Currie,J.R., and Denman,R.B. (2003). The fragile X mental retardation protein FMRP binds elongation factor 1A mRNA and negatively regulates its translation in vivo. *J. Biol. Chem.* 278, 15669-15678.

Tang,S.J., Meulemans,D., Vazquez,L., Colaco,N., and Schuman,E. (2001). A role for a rat homolog of stauferin in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron* 32, 463-475.

Tchorzewski,M., Krokowski,D., Rzeski,W., Issinger,O.G., and Grankowski,N. (2003). The subcellular distribution of the human ribosomal "stalk" components: P1, P2 and P0 proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 203-211.

Tenenbaum,S.A., Carson,C.C., Lager,P.J., and Keene,J.D. (2000). Identifying mRNA subsets in messenger ribonucleoprotein complexes by using cDNA arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 14085-14090.

Theurkauf,W.E. (1994). Microtubules and cytoplasm organization during *Drosophila* oogenesis. *Dev. Biol.* 165, 352-360.

Theurkauf,W.E., Alberts,B.M., Jan,Y.N., and Jongens,T.A. (1993). A central role for microtubules in the differentiation of *Drosophila* oocytes. *Development* 118, 1169-1180.

Thomas,K.L., Laroche,S., Errington,M.L., Bliss,T.V., and Hunt,S.P. (1994). Spatial and temporal changes in signal transduction pathways during LTP. *Neuron* 13, 737-745.

Thomas,M.G., Martinez Tosar,L.J., Loschi,M., Pasquini,J.M., Correale,J., Kindler,S., and Boccaccio,G.L. (2004). Stauferin Recruitment into Stress Granules Does Not Affect Early mRNA Transport in Oligodendrocytes. *Mol. Biol. Cell.*

Tiedge,H., Bloom,F.E., and Richter,D. (1999). RNA, whither goest thou? *Science* 283, 186-187.

Tiedge,H. and Brosius,J. (1996). Translational machinery in dendrites of hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 16, 7171-7181.

Tiruchinapalli,D.M., Oleynikov,Y., Kelic,S., Shenoy,S.M., Hartley,A., Stanton,P.K., Singer,R.H., and Bassell,G.J. (2003). Activity-dependent trafficking and dynamic localization of zipcode binding protein 1 and beta-actin mRNA in dendrites and spines of hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 23, 3251-3261.

Tongiorgi,E., Righi,M., and Cattaneo,A. (1997). Activity-dependent dendritic targeting of BDNF and TrkB mRNAs in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 17, 9492-9505.

Torre,E.R. and Steward,O. (1992). Demonstration of local protein synthesis within dendrites using a new cell culture system that permits the isolation of living axons and dendrites from their cell bodies. *J. Neurosci.* *12*, 762-772.

Tribl,F., Gerlach,M., Marcus,K., Asan,E., Tatschner,T., Arzberger,T., Meyer,H.E., Bringmann,G., and Riederer,P. (2005). Subcellular proteomics of neuromelanin granules isolated from the human brain. *Mol. Cell Proteomics*.

Villace,P., Marion,R.M., and Ortin,J. (2004). The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* *32*, 2411-2420.

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.

Wasiak,S., Legendre-Guillemain,V., Puertollano,R., Blondeau,F., Girard,M., de Heuvel,E., Boismenu,D., Bell,A.W., Bonifacino,J.S., and McPherson,P.S. (2002). Enthoprotin: a novel clathrin-associated protein identified through subcellular proteomics. *J. Cell Biol.* *158*, 855-862.

Weiler,I.J. and Greenough,W.T. (1993). Metabotropic glutamate receptors trigger postsynaptic protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 7168-7171.

Weiler,I.J., Irwin,S.A., Klintsova,A.Y., Spencer,C.M., Brazelton,A.D., Miyashiro,K., Comery,T.A., Patel,B., Eberwine,J., and Greenough,W.T. (1997). Fragile X mental retardation protein is translated near synapses in response to neurotransmitter activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *94*, 5395-5400.

Wickham,L., Duchaine,T., Luo,M., Nabi,I.R., and DesGroseillers,L. (1999). Mammalian stauferin is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell Biol.* *19*, 2220-2230.

Winder,D.G., Mansuy,I.M., Osman,M., Moallem,T.M., and Kandel,E.R. (1998). Genetic and pharmacological evidence for a novel, intermediate phase of long-term potentiation suppressed by calcineurin. *Cell* *92*, 25-37.

Wu,L., Wells,D., Tay,J., Mendis,D., Abbott,M.A., Barnitt,A., Quinlan,E., Heynen,A., Fallon,J.R., and Richter,J.D. (1998). CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation and the regulation of experience-dependent translation of alpha-CaMKII mRNA at synapses. *Neuron* *21*, 1129-1139.

Wu,X.Q. and Hecht,N.B. (2000). Mouse testis brain ribonucleic acid-binding protein/translin colocalizes with microtubules and is immunoprecipitated with messenger ribonucleic acids encoding myelin basic protein, alpha calmodulin kinase II, and protamines 1 and 2. *Biol. Reprod.* *62*, 720-725.

Yang,J., Rothermel,B., Vega,R.B., Frey,N., McKinsey,T.A., Olson,E.N., Bassel-Duby,R., and Williams,R.S. (2000). Independent signals control expression of the

calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circ. Res.* 87, E61-E68.

Yedavalli,V.S., Neuveut,C., Chi,Y.H., Kleiman,L., and Jeang,K.T. (2004). Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. *Cell* 119, 381-392.

Yi,R., Qin,Y., Macara,I.G., and Cullen,B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 17, 3011-3016.

Yin,Y., Edelman,G.M., and Vanderklish,P.W. (2002). The brain-derived neurotrophic factor enhances synthesis of Arc in synaptoneuroosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 2368-2373.

Zafra,F., Hengerer,B., Leibrock,J., Thoenen,H., and Lindholm,D. (1990). Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *EMBO J* 9, 3545-3550.

Zafra,F., Lindholm,D., Castren,E., Hartikka,J., and Thoenen,H. (1992). Regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor mRNA in primary cultures of hippocampal neurons and astrocytes. *J Neurosci* 12, 4793-4799.

Zalfa,F., Giorgi,M., Primerano,B., Moro,A., Di Penta,A., Reis,S., Oostra,B., and Bagni,C. (2003). The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell* 112, 317-327.

Zambrano,N., De Renzis,S., Minopoli,G., Faraonio,R., Donini,V., Scalonì,A., Cimino,F., and Russo,T. (1997). DNA-binding protein Pur alpha and transcription factor YY1 function as transcription activators of the neuron-specific FE65 gene promoter. *Biochem. J.* 328 ( Pt 1), 293-300.

Zeng,Y. and Cullen,B.R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res.* 32, 4776-4785.

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, 261-275.

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.

Zhang,J., Sun,X., Qian,Y., LaDuca,J.P., and Maquat,L.E. (1998a). At least one intron is required for the nonsense-mediated decay of triosephosphate isomerase mRNA: a possible link between nuclear splicing and cytoplasmic translation. *Mol. Cell Biol.* 18, 5272-5283.



---

Zhang,J., Sun,X., Qian,Y., and Maquat,L.E. (1998b). Intron function in the nonsense-mediated decay of beta-globin mRNA: indications that pre-mRNA splicing in the nucleus can influence mRNA translation in the cytoplasm. *RNA*. 4, 801-815.

