

Université de Montréal

Dynamique moléculaire et fonctions des protéines Stau1 et Stau2 chez les mammifères

par

Thomas Duchaine

**Département de biochimie**

Faculté des études supérieures

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph.D.)

en biologie moléculaire

octobre, 2001

©Thomas Duchaine, 2001



QH  
506  
U54  
7002  
v. 001

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :  
Dynamique moléculaire et fonctions des protéines Stau1 et Stau2 chez les mammifères

Présentée par :  
Thomas Duchaine

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Léa Brakier-Gingras, PhD

président-rapporteur

Luc DesGroseillers, PhD

directeur de recherche

Muriel Aubry, PhD

membre du jury

Sherif Abouelela

examineur externe

---

représentant du doyen de la FES

## RÉSUMÉ

Le transport cytoplasmique de l'ARN est un mécanisme efficace pour établir les polarités structurale et fonctionnelle des cellules. Ce phénomène est observé dans une grande variété de types cellulaires et d'espèces et les événements moléculaires qui constituent le transport d'ARN présentent de fortes similitudes entre les différents systèmes. Dans l'optique de mieux en comprendre les mécanismes chez les mammifères, nous avons entrepris de cloner et de caractériser les homologues de Staufen, une protéine centrale dans le transport cytoplasmique de l'ARN chez la drosophile.

Nos travaux ont d'abord permis de cloner un premier homologue, Stau1, de cartographier ses domaines fonctionnels et d'amorcer sa caractérisation cellulaire. Cette protéine lie l'ARN bicaténaire (ARNdb) avec une forte affinité et est associée au réticulum endoplasmique rugueux (RER).

Nous avons ensuite étudié les événements menant à une forme alternative de la protéine Stau1 (appelée Stau1<sup>i</sup>) et caractérisé cet isoforme. Stau1<sup>i</sup> comporte une insertion de 6 acides aminés dans son déterminant majeur de liaison à l'ARNdb, ce qui affecte grandement cette interaction. Nous avons démontré qu'en s'associant avec Stau1 *in vivo*, Stau1<sup>i</sup> inhibe la liaison du complexe à l'ARN. De plus, l'altération du rapport entre ces deux isoformes entraîne des conséquences importantes sur la structure du RER. Nous proposons que cet isoforme soit une sous unité régulatrice des complexes de Stau1 et possiblement de leur transport.

Nous avons aussi cloné et caractérisé un second homologue de Staufen (Stau2). Son transcrit est presque exclusivement retrouvé dans le cerveau. Stau2 y est retrouvée dans le soma et sur les microtubules dendritiques des neurones.

Finalement, une caractérisation biochimique de Stau1 et Stau2 a révélé que ces deux protéines font partie de complexes de haute densité et que certains de leurs isoformes partagent une interaction stable avec les ribosomes.

Considérés avec les travaux de nos collaborateurs et les propriétés de Staufen chez la drosophile, les résultats présentés dans cette thèse suggèrent deux fonctions pour Stau1 et Stau2. En plus de supporter une implication dans le transport d'ARN dans le neurone, ils pointent vers une fonction possible dans le contrôle traductionnel.

Mots clef : Transport cytoplasmique d'ARN, localisation d'ARN, protéines liant l'ARN, domaine de liaison à l'ARN bicaténaire (dsRBD), cytosquelette, contrôle traductionnel.

## ABSTRACT

The cytoplasmic transport of RNA is an efficient way to establish structural and functional polarities of cells. This process has been observed in a wide variety of species and cell types, and the molecular events that constitute RNA transport are highly similar among the different systems described. The central goal of this thesis was to expand our understanding of key molecular mechanisms underlying RNA transport in mammalian cells. More specifically, we examined the functions of the Staufen proteins, a key factor in this process in *Drosophila*.

Our work allowed us to clone a first homologue, named Stau1. We mapped its functional domains and began its cellular characterization. We found that this protein binds with high affinity to dsRNA and associates with the rough endoplasmic reticulum (RER).

We next studied the events leading to an alternatively spliced form of Stau1 (termed Stau1<sup>i</sup>) and characterized this isoform. Stau1<sup>i</sup> contains a 6 amino acid insertion in its major dsRNA-binding domain, which strongly impairs the Stau1<sup>i</sup>-dsRNA interaction. We also demonstrated that, when associated to Stau1 in a complex, Stau1<sup>i</sup> inhibits the RNA-binding capacity of this complex. Moreover, an altered ratio between the Stau1 isoforms produces important structural consequences on RER. We propose that Stau1<sup>i</sup> isoform is a regulatory subunit of the Stau1 ribonucleoproteic complexes and, possibly also, of their transport.

We also cloned and characterized a second Staufen homologue, called Stau2. *Stau2* transcripts are almost exclusively found in the brain. In neurons, Stau2 is found in the soma and on dendritic microtubules.

Finally, a biochemical characterization of Stau1 and Stau2 revealed that these two proteins are part of high density complexes and that some of their isoforms stably interact with ribosomes.

When considered with the work of our collaborators and the properties of Staufen in *Drosophila*, our results suggest two functions for Stau1 and Stau2. In addition to supporting an involvement of Stau1 and Stau2 in RNA transport in neurons, our results raise the possibility of a function in translational control.

Keywords : cytoplasmic RNA transport, RNA localization, RNA binding proteins, dsRBD, cytoskeleton, translational control.

**TABLE DES MATIÈRES**

<b>Page de titre</b>	<b>i</b>
<b>Identification du jury</b>	<b>ii</b>
<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>xi</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>xi</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>xi</b>
<b>Listes des sigles et abréviations</b>	<b>xvi</b>
<b>Dédicace</b>	<b>xix</b>
<b>Remerciements</b>	<b>xx</b>
<b>Introduction</b>	<b>1</b>
Introduction générale	2
Pourquoi transporter de l'ARN ?	3
Le transport de l'ARN dans l'ovocyte de <i>Drosophila melanogaster</i>	6
Survol de l'ovogenèse	7
Établissement du plan d'une drosophile	10
Axe Antéro-Postérieur	10
Lignée germinale	15



Localisation des transcrits de bicoid et d'oskar	16
Transport et localisation du transcrit de <i>bicoid</i>	16
Anatomie d'un signal de localisation : la portion 3'UTR du transcrit de <i>bicoid</i>	20
Transport et localisation du transcrit d' <i>oskar</i>	24
Signaux en <i>cis</i> du transcrit d' <i>oskar</i>	26
Traduction d'oskar au bon endroit et au bon moment...	27
Réprimer	27
Dé-réprimer la traduction	28
Facteurs en <i>trans</i>	29
Staufen	30
Identification et fonctions	30
Description de la protéine	36
Distribution	37
Qu'est-ce qu'un dsRBD?	37
Structure du domaine	38
Liaison de l'ARNdb par le dsRBD3: détails et implications	41
L'énigme de la spécificité	42
Interactions et fonctions des dsRBD de Staufen	44
Le transport cytoplasmique de l'ARN : vers un mécanisme universel?	50
Localisation du transcrit de la MBP dans les oligodendrocytes	50
Localisation du transcrit de Vg1 dans les ovocytes de <i>Xenopus</i>	52
Localisation du transcrit de l'actine $\beta$ dans les fibroblastes de poulet	53
Conservation de la ZBP1/Vg1-RBP/VERA	54
Recette pour transporter un transcrit	55
1- Reconnaissance du signal de ciblage	55
2- Empaquetage des complexes Ribonucléoprotéiques (RNP)	58
3- Recrutement et transport sur l'axe cytosquelettique	59
4- Ancrage	60
5- Traduction locale et contrôle traductionnel	60
Le transport de l'ARN dans le système nerveux	61
Hypothèse : Implication du transport de l'ARN dans l'établissement de la mémoire	61
<i>Hypothèse de travail</i>	65

<b>Résultats</b>	<b>66</b>
<i>Article 1 : Mammalian Staufen is a double-stranded RNA- and Tubulin-binding protein which localizes to the Rough Endoplasmic Reticulum</i>	67
Mise en contexte	68
Abstract	70
Introduction	70
Materials and methods	71
Results	73
Discussion	76
Acknowledgments	78
References	79
<i>Article 2 : A novel murine Staufen isoform modulates the RNA content of Staufen ribonucleoprotein complexes</i>	81
Mise en contexte	82
Abstract	84
Introduction	84
Materials and methods	85
Results	85
Discussion	89
Acknowledgements	92
References	92
<i>Article 3 : Isoforms of Stau2 localize on dendritic microtubules and associate with ribosomes in neurons.</i>	94
Mise en contexte	95
ABSTRACT	98
INTRODUCTION	100
MATERIALS AND METHODS	103
RESULTS	111
DISCUSSION	119
ACKNOWLEDGMENT	126
REFERENCES	127

<i>Article 4 : Molecular mapping of the human RNA-binding protein Staufen determinants involved in ribosome association.</i>	153
Mise en contexte	154
ABSTRACT	157
INTRODUCTION	158
MATERIALS AND METHODS	161
RESULTS	166
DISCUSSION	172
ACKNOWLEDGMENTS	178
REFERENCES	179
<b>Discussion</b>	<b>204</b>
Clonage des homologues de Staufen et conservation de la structure	205
Association avec l'ARNdb	209
Dimérisation/multimérisation	210
Interaction avec les ribosomes	212
Association avec le RER	215
Caractérisation des protéines Stau dans les neurones	217
Implication des protéines Stau dans le transport dendritique d'ARN : modèle et prédictions	221
Approches et expériences proposées...	224
Identification des ARN ligands endogènes	225
Cartographie des déterminants impliqués dans le transport dendritique	227
Ablation génique de stau1 et stau2	228
Identification du site d'interaction de Stau avec les ribosomes	229
Autres fonctions de Stau1 et Stau2...	231
<b>Conclusions</b>	<b>232</b>
<b>Sources documentaires</b>	<b>I</b>
<b>Appendices</b>	<b>XX</b>

## LISTE DES TABLEAUX

### Introduction

Tableau 1 : ARN localisés dans les dendrites.	63
---	----

### Résultats

#### Article 2

Tableau 1 : Subcellular localization of mStau and mStau <sup>i</sup> in COS-transfected cells.	88
--	----

## LISTE DES FIGURES

### Introduction

Figure 1 : Représentation schématique de l'ovogenèse et des étapes précoces de l'embryogenèse de la drosophile.	8
Figure 2 : Distribution du transcrit de <i>bicoid</i> , apparition du gradient de Bicoid et patron d'expression de <i>hunchback</i> dans l'embryon.	11
Figure 3 : Modèle de la structure du signal de localisation du transcrit de <i>bicoid</i> .	21
Figure 4 : Effet de la mutation de <i>staufen</i> sur la localisation des transcrits de <i>bicoid</i> et d' <i>oskar</i> .	31
Figure 5 : Distribution du transcrit de <i>prospero</i> aux différents stades de la division asymétrique du neuroblaste et effet de la mutation de <i>staufen</i> .	34

Figure 6 : Image stéréo d'une structure à faible énergie du complexe dsRBD3-ARNdb.	39
Figure 7 : Le dsRBD5 est nécessaire pour la traduction du transcrit d' <i>oskar</i> .	45
Figure 8 : La seconde boucle du dsRBD2 est nécessaire pour la localisation postérieure du transcrit d' <i>oskar</i> .	48
Figure 9 : Modèle de mécanisme de transport cytoplasmique d'ARN.	56

## Résultats

### Article 1

Figure 1 : Amino acid sequences of the <i>hStau</i> cDNAs.	72
Figure 2 : Characterization of the <i>hStau</i> mRNA and proteins.	73
Figure 3 : RNA-binding assay.	74
Figure 4 : RNA-binding assay in solution.	75
Figure 5 : Tubulin-binding assay.	75
Figure 6 : Molecular mapping of the dsRBD and TBD.	76
Figure 7 : Subcellular localization of the hStau-GFP fusion proteins.	77
Figure 8 : Colocalization of hStau with markers of the RER by confocal microscopy.	78

**Article 2**

Figure 1 : Sequence comparison of <i>Drosophila</i> and mouse Staufen dsRBD3 domains.	86
Figure 2 : Characterization of the <i>mStau</i> gene and transcripts.	86
Figure 3 : RNA binding assay.	87
Figure 4 : Subcellular localization of the mStau and mStau <sup>i</sup> proteins.	87
Figure 5 : Colocalization of mStau and mStau <sup>i</sup> with markers of the RER by confocal microscopy.	88
Figure 6 : Rescue of mStau <sup>i</sup> phenotype by coexpression of mStau.	89
Figure 7 : mStau isoforms are present in the same complexes.	90
Figure 8 : Expression of mStau <sup>i</sup> modulates the amount of RNAs in Staufen-containing particles.	90
Figure 9 : Effect of the SFLLTQ insertion on the structure of mStau <sup>i</sup> .	91
<b>Article 3</b>	
Figure 1 : Molecular analysis of Stau2 isoforms.	132
Figure 2 : Tissue distribution of the <i>Stau2</i> transcripts.	134
Figure 3 : RNA-binding activity of Stau2 dsRBDs.	137
Figure 4 : Stau2 is found in the somato-dendritic compartment of neurons and co-localizes with microtubules.	139
Figure 5 : Stau2 colocalizes with calnexin, a marker of the rough endoplasmic reticulum.	142

Figure 6 : Stau2 isoforms are present in the cytoplasm and sediment as stable, high-density particles.	144
Figure 7: Stau2 <sup>59</sup> and Stau2 <sup>52</sup> co-fractionate with ribosomes in sucrose gradients.	148
Figure 8 : Co-immunoprecipitation of Stau2 <sup>59</sup> with ribosomes.	151
<b>Article 4</b>	
Figure 1 : Association of the Stau <sup>55</sup> isoform with ribosomes.	186
Figure 2 : Endogenous and transfected Stau <sup>55</sup> cofractionate with ribosomal subunits.	188
Figure 3 : Schematic representation of hStau mutants.	190
Figure 4 : hStau <sup>55</sup> RNA-binding activity is involved in ribosome association.	192
Figure 5 : Critical role of TBD in ribosome association.	194
Figure 6 : Critical role of dsRBD4 in ribosome association.	196
Figure 7 : RBD4/TBD is necessary and sufficient for ribosome association.	198
Figure 8: RBD4/TBD is the minimal RNA-independent ribosome-association domain.	200
Figure 9: hStau <sup>55</sup> -HA <sub>3</sub> and RBD4/TBD-HA <sub>3</sub> co-immunoprecipitate with ribosomes.	202

## Discussion

- Figure 1 : Comparaison des structures primaires d'homologues de Staufen de différentes espèces. 206
- Figure 2 : Modèle d'implication de Stau dans le transport d'ARN dans les neurones. 222

## Annexe

- Figure 1 : Stau1 dimerizes *in vitro*. XXI
- Figure 2 : Translational activity does not influence Stau2<sup>59</sup> and Stau2<sup>52</sup> association with the ribosomes. XXIII
- Figure 3 : Confocal analysis of Stau2 and ribosomes in cortical neurons. XXV



## LISTES DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARNr : ARN ribosomique

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

bcd: bicoid

BLE1 : élément de localisation de *bicoid* 1

BRE : élément de réponse à Bruno

CaMKII : protéine kinase II dépendante du calcium/calmoduline

ARNdb: ARN bicaténaire

dsRBD: domaine de liaison à l'ARNdb

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

eIF4A : facteur d'initiation eucaryote 4A

RE : réticulum endoplasmique

FMRP : protéine du retard mental X fragile

GFP : protéine fluorescente verte

GMC : cellule du ganglion-mère

HA : hémagglutinine

hb: hunchback

HIV-1 : virus de l'immunodéficience humaine, type 1

hnRNP: ribonucléoprotéine hétérogène nucléaire

Insc : Inscuteable

$K_d$  : constante de dissociation

kDa: kiloDalton

MAP1B : protéine associée aux microtubules 1B

MBP : protéine basique de la myéline

MTOC : centre d'organisation des microtubules

NLS : signal de localisation nucléaire

nos: nanos

NRE : élément de réponse à *nanos*

nt: nucléotide

osk : oskar

pb : paire de bases

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

PKA : protéine kinase A

Pros : Prospero

RACE : amplification rapide des extrémités d'ADNc

RBP : protéine liant l'ARN

RER : réticulum endoplasmique rugueux

RGG : domaine riche en arginine/glycine

RNP: complexe ribonucléoprotéique

RMN : résonance magnétique nucléaire

RRM : motif de reconnaissance d'ARN

RTS : signal de transport d'ARN

SNC : système nerveux central

SNP : système nerveux périphérique

SRE : élément de réponse à Smaug

Stau : Staufen

TBD : domaine de liaison à la tubuline

T<sub>m</sub> : température de fusion

TRBP : protéine liant l'ARN de TAR

UTR : région non traduite

VERA : protéine liant l'ARN de *Vg1* et associée au RE

VgLE : Élément de localisation de l'ARN de *Vg1*

XlrpbA : protéine liant l'ARN A de *Xenopus laevis*

À mon père, Claude, pour m'avoir fait connaître et aimer la science.

## REMERCIEMENTS

Je tiens premièrement à remercier Luc, pour ses conseils et son soutien scientifique constants et excellents tout au long de mes travaux. Je remercie Louise Wickham, Marie-Ève Lane, Nadia Bonvouloir (SuperNad), Jacques Zappulla (Le barbusse), Ming Luo (Super chinese freak), Démian Barbas (Ricky Martin Chessmaster), George Elvira (Capoeira Superfly), Luc Furic (Lulu Stau Technotronic music -et merci pour le cognac-), Catherine Martel (Ouain-girl) et Karine Boulé (Ti-boutte) pour avoir rendu mon environnement de travail agréable et parfois même délirant, ce qui est très efficace contre la morosité occasionnelle de la science. Merci à Ali Salahpour et Stéphane Angers pour leur amitié, leur point de vue externe et les bons moments à discuter de science devant un dîner ou un café. Ce fut un très grand plaisir de vous avoir comme compagnons!

Pour leur aide technique et/ou théorique, merci à Mme Léa Gingras et aux membres de son laboratoire (spécialement Francis Robert), Gopal Subramanian, Robert Nabi, Nicole Leclerc et Éric Chevet. Merci aussi à tous les anonymes qui m'ont donné un microlitre de ceci ou de cela, ce qui faisait souvent une différence dans mes expériences. Je ne veux pas oublier le personnel de soutien du département et spécialement Louise Cournoyer pour les cultures cellulaires. Je tiens aussi à remercier le FCAR et le CRSNG pour leur soutien financier essentiel.

Finalement, merci à mes amis et à ma famille, qui ont du souvent assumer mes humeurs particulières pendant ces travaux. Un merci tout spécial à Marie-Hélène Côté, pour son soutien inconditionnel, son écoute et ses sourires qui m'ont fait persévérer.

## INTRODUCTION

## **Introduction générale**

Notre conception de la répartition des macromolécules dans la cellule a grandement évolué depuis l'émergence de la biologie moléculaire. Nous utilisons, pour décrire le cytoplasme de la cellule eucaryote, l'image d'un espace relativement homogène, où se produiraient selon des collisions aléatoires les transformations biochimiques. À la lumière des connaissances acquises à ce jour, il s'agit d'une analogie désuète et réductionniste. Au contraire, la répartition des composantes fonctionnelles fut modelée au gré de la sélection naturelle en une enceinte hyperstructurée dans l'espace comme dans le temps. Partout dans la cellule et dans l'organisme, l'asymétrie règne. Les substrats, les protéines qui les transforment, de même que les messagers qui encodent ces protéines, y sont répartis afin d'en optimiser la disponibilité, la fonction et la régulation.

Cette thèse s'inscrit dans la poursuite d'un objectif général qui vise à explorer l'un des mécanismes de l'établissement de l'asymétrie moléculaire des cellules, soit le transport cytoplasmique d'ARN. Plus précisément, je me suis intéressé à la famille des protéines Staufen qui fut impliquée dans ce phénomène.

Dans cette introduction, je ferai un survol du transport de l'ARN et de son couplage avec le contrôle traductionnel. Cependant, plutôt que de décrire et d'énumérer une grande variété de systèmes, je préconiserai un choix d'exemples représentatifs qui mettront en perspective les événements qui constituent ces phénomènes.

Je débiterai tout d'abord par la description d'un système parmi les mieux étudiés, soit l'ovocyte de la mouche à fruit (*Drosophila melanogaster*). J'y décrirai les événements et les facteurs impliqués dans la localisation de deux transcrits : le transcrit du gène *bicoid*, qui est le morphogène du pôle antérieur, de même que la localisation de l'ARNm d'*oskar*, un événement critique dans l'établissement de la lignée germinale. J'approfondirai ensuite sur les caractéristiques de la protéine Staufen, un facteur-clef dans le transport cytoplasmique de l'ARN dans ce contexte. Je comparerai ensuite les événements qui entourent le transport de ces transcrits avec d'autres exemples de transport d'ARN pour mettre en perspective la conservation du mécanisme. L'examen de ces exemples nous permettra ensuite d'assembler un modèle qui en englobe les caractéristiques typiques. Je terminerai l'introduction de cette thèse par une brève présentation du transport de l'ARN dans le système nerveux et de ses implications biologiques, justifiant du même coup l'intérêt que nous avons porté à ce tissu dans nos travaux.

### **Pourquoi transporter de l'ARN ?**

L'établissement de la polarité cellulaire comme de la polarité d'un organisme; pendant le développement par exemple, est régi par une répartition inégale de déterminants qui permettent les spécialisations fonctionnelle et structurale de ses compartiments. La complexe chorégraphie des étapes de la différenciation cellulaire dans le développement nécessite une coordination parfaite dans ses événements et des fonctions des facteurs impliqués. Même après le développement, plusieurs conditions qui exigent une adaptation en réponse à un stimulus interne ou externe nécessitent une répartition asymétrique de l'outillage biochimique dans la cellule.



Un exemple qui démontre bien ceci est la réponse d'un fibroblaste à un chemotaxisme qui entraîne une motilité cellulaire orientée. Cette motilité nécessite un remaniement drastique du cytosquelette d'actine. Le transcrit de la  $\beta$ -actine sera donc transporté au lamellipode, ce qui contribue à y réaliser une activité intense de polymérisation et de dépolymérisation des microfilaments (Kislauskis et al., 1997). Une réponse simple à notre question est donc : pour établir une polarité cellulaire. Pourquoi alors transporter de l'ARN plutôt qu'opter pour le transport des protéines ? De multiples stratégies sont efficacement utilisées par la cellule pour spécialiser la biochimie de ses divers domaines et plusieurs de celles-ci dépendent du transport de protéines. L'asymétrie cellulaire peut être établie par une répartition, en compartiments physiquement isolés, des protéines impliquées dans des fonctions similaires et cette ségrégation est assortie d'un contrôle strict du trafic entre les compartiments. Je dégagerai donc ici, en faveur du transport de l'ARN, trois avantages relatifs au transport des protéines.

Premièrement, cette stratégie est économe énergétiquement parlant. Le transport d'un transcrit permet la production locale d'une multitude de copies de la protéine encodée, amplifiant ainsi l'activité biochimique en un endroit défini pour un coût énergétique moindre en transport.

Deuxième avantage : le transport d'ARN est très efficace pour limiter l'expression de l'activité d'une protéine. Cet avantage provient du couplage du transport d'un transcrit avec le contrôle de sa traduction. Comme nous le verrons plus bas, un transcrit transporté n'est, dans presque tous les cas décrits, traduit qu'au site précis de sa localisation finale. Ainsi, puisque les ARNm ne libèrent l'activité des

protéines qu'ils encodent qu'au moment de la traduction, le transport de l'ARN a pour conséquence d'en limiter l'activité en un espace et un temps définis par la traduction locale du transcrit. Ce mutisme de la fonction d'une protéine est conséquemment très strict, ce qui peut s'avérer absolument obligatoire pour la fonction de la protéine encodée. Un exemple particulièrement illustratif de cet avantage est le transport du transcrit de la protéine basique de la myéline (MBP) dans l'oligodendrocyte (Carson et al., 2001). Cette protéine permet la compaction des feuilletts de myéline de la cellule gliale autour de l'axone d'un neurone, optimisant de ce fait la rapidité et l'efficacité de la transmission des vagues de dépolarisation. Cette protéine «colle » si fortement aux membranes qu'il serait excessivement exigeant de la transporter jusqu'aux sites où sa fonction est désirable. Il devient donc impératif d'en limiter la traduction aux endroits où elle entrera en contact avec la membrane.

Troisième avantage : ce mécanisme offre une multitude de cibles de régulation qui s'ajoutent à celles qui sont disponibles lors du transport de protéines. Que ce soit au niveau de la ségrégation du transcrit, de sa stabilisation ou à l'une ou l'autre des étapes de la traduction, les facteurs impliqués offrent autant de cibles supplémentaires qui permettent une régulation fine de l'expression génétique. La précision de cette régulation est particulièrement importante dans un système où une différence minime entre des concentrations précises d'activité peut générer des réponses biologiques distinctes. Nous verrons bientôt que dans le contexte du développement chez la drosophile, spécialement pour l'établissement des axes de l'embryon, cette réalité sera grandement mise à profit par l'évolution.

## **Le transport de l'ARN dans l'ovocyte de *Drosophila melanogaster***

L'ovogenèse et le développement embryonnaire de la drosophile sont fertiles en exemples d'événements de transport d'ARN. Une raison majeure pour ceci est que l'ovocyte et l'embryon de la drosophile, comme beaucoup d'autres espèces, sont privés de transcription pour une période précoce et plus ou moins longue du développement. Par conséquent, l'information qui encode l'outillage biochimique, de même que les facteurs impliqués dans sa régulation, doivent être stratégiquement placés en quantité suffisante, à l'endroit et au moment nécessaires pour réaliser les premiers événements de l'embryogenèse (pour une revue, voir Cooperstock et Lipshitz, 2001 et Micklem, 1995). L'établissement de la polarité embryonnaire de la drosophile débute donc longtemps avant la fertilisation. En fait, l'œuf mature aura reçu de la mère, en bonne partie sous forme de transcrits, toute la «programmation» impliquée dans l'élaboration des axes de l'embryon (Nusslein-Volhard, 1991). Pour ce qui est de la régulation de l'expression génétique, on y assiste à un «mini-monde à ARN»: le transport de transcrits y est largement répandu et un couplage intime avec le contrôle traductionnel y est crucial. Les gènes qui sont impliqués dans ces toutes premières étapes du développement sont dits «à effet maternel» et comptent pour une portion majeure des facteurs reliés aux événements de transport d'ARN que je présenterai ici.

Avant d'aborder les détails du parcours de transcrits dans l'ovocyte, il est impératif de survoler la maturation de l'œuf. Ainsi, après un bref survol de l'ovogenèse, j'y décrirai l'élaboration de l'axe antéro-postérieur et de la lignée germinale. Je présenterai ensuite les événements et les facteurs impliqués dans la

localisation des transcrits de *bicoid* et d'*oskar*, qui comptent encore à ce jour parmi les systèmes les mieux caractérisés. Les facteurs impliqués seront présentés en deux parties : les machinerie responsable de la reconnaissance et du transport des transcrits (déterminants en *trans*) et les signaux, présents sur le transcrit même, qui régissent les événements de localisation (déterminants en *cis*). Finalement, je tenterai d'illustrer le lien étroit qui existe entre le transport et le contrôle traductionnel des transcrits localisés. Un examen concerté de ces connaissances interreliées permettra, je l'espère, de dresser un portrait représentatif du transport de l'ARN.

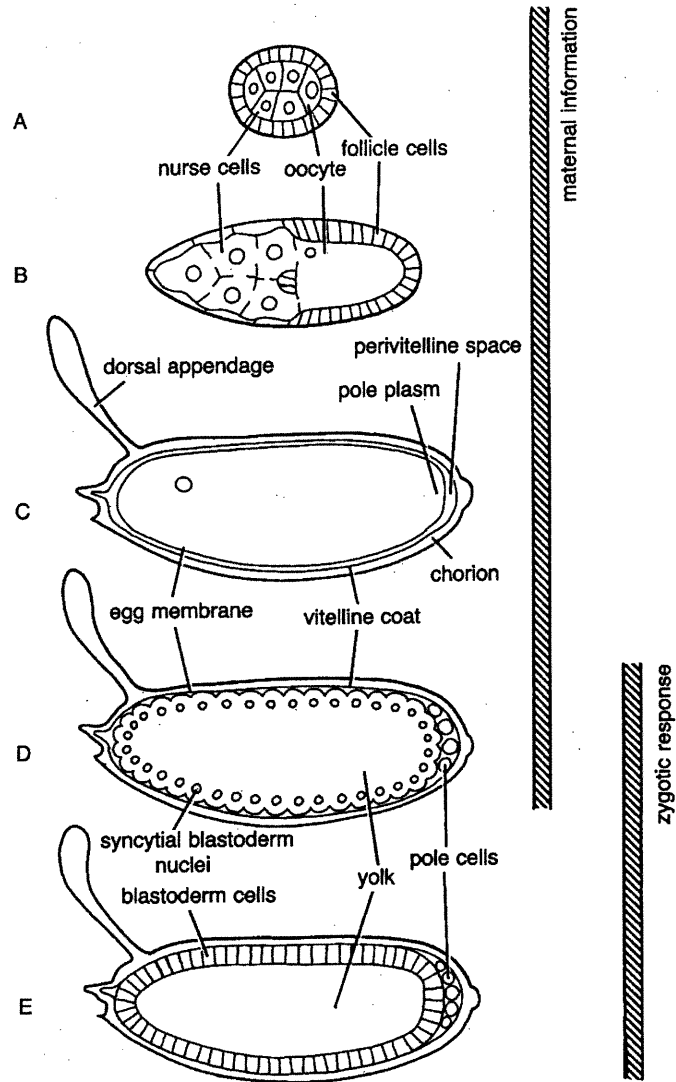
### *Survol de l'ovogenèse*

Une représentation schématique du développement de l'ovocyte de *Drosophila* est présentée à la Figure 1. L'ovaire de la drosophile contient plusieurs germariae qui sont, en quelques sortes, des « chaînes de montage » d'œufs. Ceux-ci contiennent une multitude de cystes qui progressent dans le germarium au fil de leurs stades de maturation. Les cystes y réalisent ainsi 4 divisions cellulaires. Lorsque le cyste est constitué de 16 cellules (Spradling, 1993), une seule d'entre elles développera un Centre d'Organisation des Microtubules (MTOC). Un réseau structuré de microtubules traversera l'ensemble des 16 cellules par un arrangement de canaux reliant leurs cytoplasmes appelés « canaux en anneaux » (Ring canals). Seule la cellule ayant développé le MTOC se différenciera en ovocyte, alors que les 15 autres cellules se différencieront en cellules nourricières (Lin et Spradling, 1995). Ces cellules germinales fabriquent les transcrits, les protéines et autres matériaux nécessaires à la maturation de l'ovocyte et à l'établissement de ses axes.

**Figure 1 :** Représentation schématique de l'ovogenèse et des étapes précoces de l'embryogenèse de la drosophile.

A) et B) représentent deux stades de l'ovogenèse. L'ovocyte est bordé par les cellules-nourrices et par les cellules folliculaires d'origine somatique. C) Ovocyte au moment de la ponte. Les cellules folliculaires sont dégradées et le contenu de leur cytoplasme est absorbé par l'ovocyte. D) Après la fécondation et une série de divisions sans cellularisation, les noyaux sont distribués en périphérie de l'embryon et forment ainsi le blastoderme syncytial. Les noyaux qui ségrégent au pôle postérieur ont formé les cellules polaires qui formeront la lignée germinale. E) Embryon après la cellularisation.

Figure tirée de Nüsslein-Volhard (1991).



Les facteurs synthétisés seront acheminés à l'ovocyte en développement, en premier lieu par le cytosquelette traversant les canaux en anneaux. Ultiment et dans une étape plus tardive de l'ovogenèse, presque tout le contenu de ces cellules sera déversé dans l'ovocyte et les cellules nourricières seront dégradées. Une contribution majeure au développement de l'œuf est réalisée par diverses populations de cellules folliculaires, des cellules somatiques qui bordent les cystocytes. Par un ensemble de signaux et de contacts extracellulaires, ces cellules contribuent aussi à l'établissement des axes de l'embryon. De plus, les cellules folliculaires produisent l'enveloppe vitelline, la coquille de l'œuf et le micropyle, une structure de l'œuf spécialisée pour la fécondation .

### *Établissement du plan d'une drosophile*

#### Axe Antéro-Postérieur

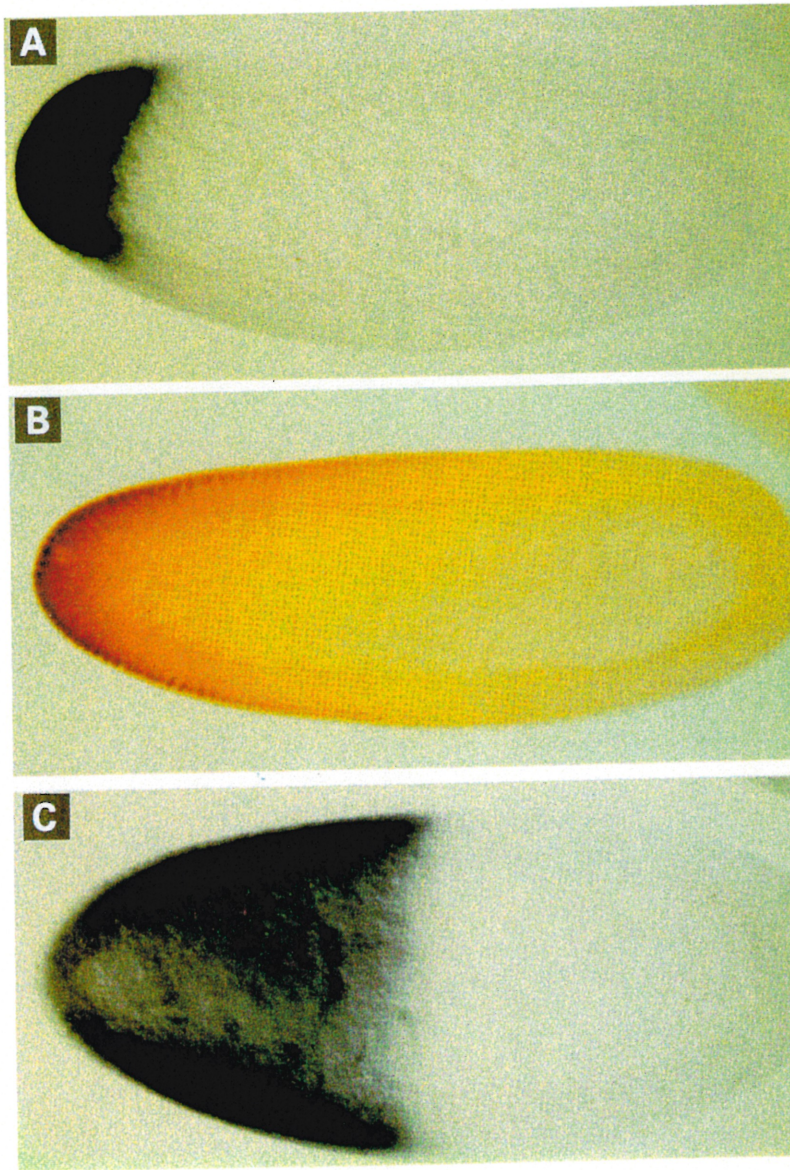
Au cours de l'ovogenèse, la mère localisera, depuis les cellules nourrices jusqu'à l'ovocyte, les morphogènes qui seront responsables de l'établissement de l'axe antéro-postérieur de l'embryon (pour une revue, voir van Eeden et St Johnston, 1999). Les transcrits des gènes *bicoid* et *nanos* sont synthétisés par les cellules nourricières, puis transportés et ancrés très précisément aux cortex du pôle antérieur pour *bicoid* et postérieur de l'œuf pour *nanos*. Ils n'y seront traduits qu'après la fertilisation. Les protéines Bicoid et Nanos diffusent alors du site précis de traduction, formant ainsi des gradients décroissants dans le cytoplasme de l'embryon (Figure 2 A et B, pour le transcrit de *bicoid*).

**Figure 2 :** Distribution du transcrit de *bicoid*, apparition du gradient de Bicoid et patron d'expression de *hunchback* dans l'embryon.

A) Hybridation *in situ* d'un blastoderme syncytial révélant le transcrit de *bicoid*. Celui-ci est ancré au pôle antérieur de l'embryon. B) La protéine Bicoid forme un gradient antéro-postérieur. C) Expression de *hunchback* dans un jeune embryon (hybridation *in situ*).

Figure tirée de Nüsslein-Volhard (1991).





Bicoid est un facteur de transcription à homéodomaine responsable d'enclencher la programmation génétique qui permettra la différenciation des structures du pôle antérieur de l'embryon. Pour sa fonction d'activateur transcriptionnel, Bicoid collabore avec un second facteur de transcription : le produit du gène *hunchback*, qui agit alors comme un co-morphogène (Simpson-Brose et al., 1994). Le transcrit de *hunchback* est localisé uniformément par la mère dans l'ovocyte. Nanos établit sa fonction de morphogène en empêchant la traduction du transcrit de *hunchback* au pôle postérieur de l'embryon, ce qui permet la formation d'un gradient du facteur Hunchback et l'exclut des structures postérieures (Gavis et Lehmann, 1992; Lehmann et Nusslein-Volhard, 1991; Wang et Lehmann, 1991; Wharton et Struhl, 1991) (Fig 2C). De plus, Nanos y réprime aussi la traduction du transcrit de Bicoid (Gavis et Lehmann, 1994). De concert avec la localisation du transcrit de *bicoid*, la répression traductionnelle de Nanos permet donc l'apparition des protéines Hunchback et Bicoid selon un gradient antéro-postérieur. L'exclusion postérieure de ces facteurs est cruciale pour que la transcription des gènes responsables de la différenciation de l'abdomen (*krüppel*, *knirps* et *giant*) s'y établisse correctement (Murata et Wharton, 1995; Struhl et al., 1992).

La protéine Nanos contient deux domaines de liaison du Zinc (CCHC) qui sont essentiels pour sa fonction de régulateur traductionnel (Curtis et al., 1997), mais la capacité de cette protéine à lier l'ARN semble non-spécifique *in vitro*. Des travaux plus récents ont démontré que Nanos lie le transcrit d'*hunchback* en collaborant avec la protéine Pumilio (Sonoda et Wharton, 1999; Wreden et al., 1997) et que ce

complexe recrute BRAT (Brain arrest). BRAT établit la répression traductionnelle du transcrit sur lequel il est recruté (Sonoda et Wharton, 2001).

Après la fécondation, l'embryon de la drosophile réalise plusieurs divisions nucléaires sans cellularisation, ce qui forme le blastoderme syncytial. Les noyaux y sont répartis en périphérie de l'embryon (Figure 1D). Plus tard, la cellularisation ségrégera différentes concentrations des protéines Bicoid, Hunchback et d'autres facteurs de transcription nouvellement synthétisés. La différenciation selon l'axe antéro-postérieur dépendra de la concentration cellulaire de ces déterminants, et donc de la position de chaque noyau selon ce même axe. Bicoid et Hunchback activeront ou inhiberont alors les promoteurs de gènes situés à divers niveaux d'une hiérarchie complexe de régulateurs génétiques. Des gènes *gap*, des gènes *pair-rule* de même que des gènes homéotiques figurent parmi leurs cibles d'activation. Ces gènes permettront ensuite la différenciation des cellules et des structures propres au pôle antérieur de l'embryon (Murata et Wharton, 1995).

Il est à présent clair que des niveaux supplémentaires de régulation font partie des fonctions des morphogènes *bicoid* et *nanos*. Il fut découvert récemment que la protéine Bicoid contrôle aussi la traduction d'un déterminant du pôle postérieur : le transcrit du gène *caudal* (*cad*). Une hélice  $\alpha$  de l'homéodomaine de Bicoid lie un signal dans la portion 3' non traduite (3'UTR) du transcrit. Pour ce faire, cette hélice adopte la forme de domaine ARM, un domaine de liaison à l'ARN similaire à la protéine REV du HIV (Niessing et al., 2000; Rivera-Pomar et al., 1996). Bicoid module donc l'expression génétique au niveau de la transcription, mais aussi au niveau de la traduction. De son côté, Nanos joue aussi des rôles supplémentaires

pendant le développement. Il est exprimé dans les cellules souches gamétiques maternelles où il régule la production continue de germariae. Finalement, des travaux suggèrent aussi que Nanos puisse activer directement ou indirectement la transcription de gènes nécessaires à la maturation des cellules propres à la lignée germinale de l'embryon (Kobayashi et al., 1996).

### Lignée germinale

L'établissement de la lignée germinale est aussi déterminée pendant l'ovogenèse. L'événement-clef de ce processus est la localisation du transcrit d'*oskar* au pôle postérieur de l'ovocyte (Ephrussi et al., 1991; Ephrussi et Lehmann, 1992; Kim-Ha et al., 1991). Le transcrit lui-même et la protéine qu'il encode, jouent un rôle critique dans l'échafaudage d'un microenvironnement biochimique appelé plasmé polaire. Cette portion du cytoplasme postérieur accumule de grosses structures nommées granules polaires. Ces granules contiennent de nombreuses composantes, dont les protéines Fat facets, Oskar, Vasa, Staufén et Tudor, des polysomes, de même que de nombreuses espèces d'ARN dont le transcrit d'*oskar* et un ARN ribosomique mitochondrial (revu dans Lasko, 1999). L'assemblage des granules polaires, de même que leurs fonctions exactes sont, encore à ce jour, mal comprises. Il est cependant clair que le transcrit d'*oskar* est essentiel pour leur établissement. Une localisation ectopique de cet ARN est suffisant pour en occasionner l'assemblage (Ephrussi et Lehmann, 1992). Après les divisions nucléaires dans le blastoderme syncytial, les noyaux qui se retrouveront dans le plasmé polaire adopteront la destinée des cellules germinales.

La fonction du transcrit d'*oskar* est aussi reliée à celle de *nanos*. L'établissement du plume polaire est nécessaire pour permettre la traduction locale de Nanos et donc pour sa fonction dans l'établissement de l'axe A-P (Clark et al., 2000; Dahanukar et Wharton, 1996). Tout au long de son trajet dans le cytoplasme de l'ovocyte, l'ARNm de *nanos* est maintenu sous silence par Smaug, une protéine de 130kDa qui reconnaît des éléments dans la portion 3'UTR du transcrit (Dahanukar et al., 1999; Smibert et al., 1996; Smibert et al., 1999). La dérégulation de la traduction de l'ARNm de *nanos* n'est permise que dans le plume polaire. Les gènes affectant la localisation du transcrit d'*oskar* affecteront donc indirectement l'établissement des structures postérieures de l'embryon, en ne permettant plus la traduction locale de Nanos.

#### *Localisation des transcrits de bicoid et d'oskar*

Comme nous venons de le voir, la localisation de trois transcrits pendant l'ovogenèse gouverne l'établissement de l'axe antéro-postérieur et de la lignée germinale chez la drosophile. Nous examinerons maintenant plus en détail les connaissances actuelles sur les événements qui dirigent les transcrits de *bicoid* et d'*oskar* vers leurs destinations respectives.

#### Transport et localisation du transcrit de *bicoid*

La localisation de l'ARNm de *bicoid* s'opère en plusieurs étapes. Tout d'abord, le transcrit s'accumule asymétriquement dans le cortex des cellules nourricières. Il s'accumule ensuite au pôle antérieur de l'ovocyte en maturation où il est finalement ancré (Stephenson et Pokrywka, 1992). Une bonne compréhension du

mécanisme de localisation de ce transcrit peut être obtenue en examinant les contributions des microtubules et des gènes *exuperentia (exu)*, *swallow (sww)* et *staufer (stau)*.

Comme pour la localisation de nombreux autres ARN, le cytosquelette et particulièrement les microtubules jouent un rôle de premier plan dans le transport du transcrit de *bicoid*. Premièrement, des mutations qui interfèrent avec la formation du réseau de microtubules reliant les cellules du cyste (ex. : *Bicaudal-D*) et qui affectent aussi la localisation d'autres transcrits dans l'ovocyte, empêchent la localisation normale de l'ARNm de *bicoid*. La contribution des microtubules peut aussi être démontrée par une approche pharmacologique. Une expérience classique qui en démontre l'implication est le traitement des cystes avec des agents qui déstabilisent les microtubules. Un tel traitement inhibe complètement la localisation du transcrit dans les cellules nourricières et au pôle antérieur de l'ovocyte (Pokrywka, 1995; Pokrywka et Stephenson, 1991; Theurkauf et al., 1993). Troisièmement, des mutations qui affectent la polarité des microtubules dans l'ovocyte (*grk*, *N<sup>ts</sup>* et *PKA*), relocalisent le transcrit de *bicoid* à l'extrémité négative ectopique des microtubules (Gonzalez-Reyes et al., 1995; Lane et Kalderon, 1994; Ruohola et al., 1991). Finalement, un support supplémentaire pour l'implication des microtubules dans le transport de ce transcrit est révélé par les travaux menés sur les autres gènes impliqués dans le processus.

La protéine Exu joue un rôle dans les étapes précoces du transport du transcrit (St Johnston et al., 1989). Dans des mutants *exu*, l'ARNm de *bicoid* n'est pas accumulé dans le cortex des cellules nourricières. Aussi, il n'est retrouvé dans

l'ovocyte qu'à la fin de l'ovogenèse (l'étape de dissolution des cellules nourricières) et il y adopte une distribution uniforme (Berleth et al., 1988; Nusslein-Volhard et al., 1987). Outre ce phénotype, plusieurs observations supportent le modèle selon lequel *exu* serait directement impliqué dans les premières étapes du transport. D'abord, cette protéine co-localise avec l'ARNm de *bicoid* dans les cellules nourricières et au cortex antérieur de l'ovocyte, mais disparaît un peu plus tard alors que la localisation du transcrit est maintenue (Macdonald et al., 1991). Ensuite, une fusion Exu-GFP est transportée au cortex de l'ovocyte par un mécanisme qui nécessite le réseau de microtubules (Wang et Hazelrigg, 1994). En fait, la localisation de cette protéine et du transcrit de *bicoid* semble avoir les mêmes nécessités en regard du cytosquelette. De plus, dans les cellules nourricières, Exu et l'ARNm de *bicoid* sont retrouvés ensemble dans des structures denses aux électrons appelées corps-éponges, qui joueraient en quelques sortes le rôle cargo pendant le transport (Wilsch-Brauninger et al., 1997). Or, bien qu'Exu lie l'ARN *in vitro*, elle n'y présente pas de spécificité particulière pour le transcrit de *bicoid* (Wang et Hazelrigg, 1994). La contribution d'Exu dans la reconnaissance directe du transcrit est donc nébuleuse. Deux facteurs sont toutefois de bons candidats pour une implication complémentaire dans cette fonction : les protéines Exl et Yps. Exl (pour Exu-like) a été isolée par affinité pour un élément minimal de localisation du transcrit de *bicoid*, nommé BLE1 et montre une affinité spécifique pour cet élément d'ARN *in vitro*. Comme Exl comporte d'importantes similitudes structurelles avec Exu, il a été suggéré que ces deux protéines collaborent dans la reconnaissance du transcrit transporté (Macdonald et al., 1995). Dans une approche parallèle, Whilelm et al. ont purifié un complexe sensible

à la RNase contenant Exu et le transcrit de *bicoid*. Ce complexe contient au moins sept facteurs dont l'un d'entre eux est la protéine Ypsilon Schachtel (Yps), qui contient un domaine de liaison à l'ARN (Wilhelm et al., 2000). Une contribution de cette propriété dans le transport de l'ARN de *bicoid* demeure toutefois à démontrer.

Des facteurs distincts sont nécessaires pour les étapes subséquentes de la localisation de l'ARNm de *bicoid*. Des mutants pour le gène *sww* établissent la localisation du transcrit de *bicoid* au pôle antérieur, mais celle-ci est imprécise et n'est pas maintenue (Berleth et al., 1988; Stephenson et al., 1988). Une percée récente a permis, d'une part, de suggérer une fonction pour la protéine Sww et d'autre part, de révéler une implication supplémentaire du cytosquelette dans le transport du transcrit de *bicoid*. Il a été longtemps assumé qu'une protéine-moteur était responsable de fournir la force motrice essentielle au mouvement du complexe en transit, mais une telle molécule n'a pas été identifiée jusqu'à maintenant. Récemment, la chaîne légère de la dynéine (Ddlc-1) a été repêchée dans le système des deux hybrides en utilisant comme appât une portion de la protéine Sww. Bien que la fonction exacte de Ddlc-1 ne soit pas connue à ce jour, sa distribution dans le temps et l'espace suggèrent que la dynéine pourrait jouer le rôle de moteur pour le complexe de transport (Schnorrer et al., 2000).

Le phénotype qui affecte la localisation du transcrit de *bicoid* dans son étape la plus tardive est observé dans les ovocytes issus des mouches mutantes pour le gène *staufer*. Outre d'autres effets que nous examinerons plus tard, cette mutation entraîne des défauts importants dans l'ancrage final du transcrit dans le cortex antérieur (Ferrandon et al., 1994; St Johnston et al., 1991). L'embryon qui en résulte présente



un gradient de la protéine Bicoid beaucoup plus large après sa traduction, ce qui a des conséquences catastrophiques pour l'établissement des structures du pôle antérieur. Comme nous le verrons en détails plus bas, la protéine Staufén lie l'ARN bicaténaire (ARNdb) et beaucoup d'observations supportent la possibilité qu'elle s'associe directement à de multiples portions de la séquence 3'UTR du transcrit de *bicoid in vivo*.

#### Anatomie d'un signal de localisation : la portion 3'UTR du transcrit de *bicoid*

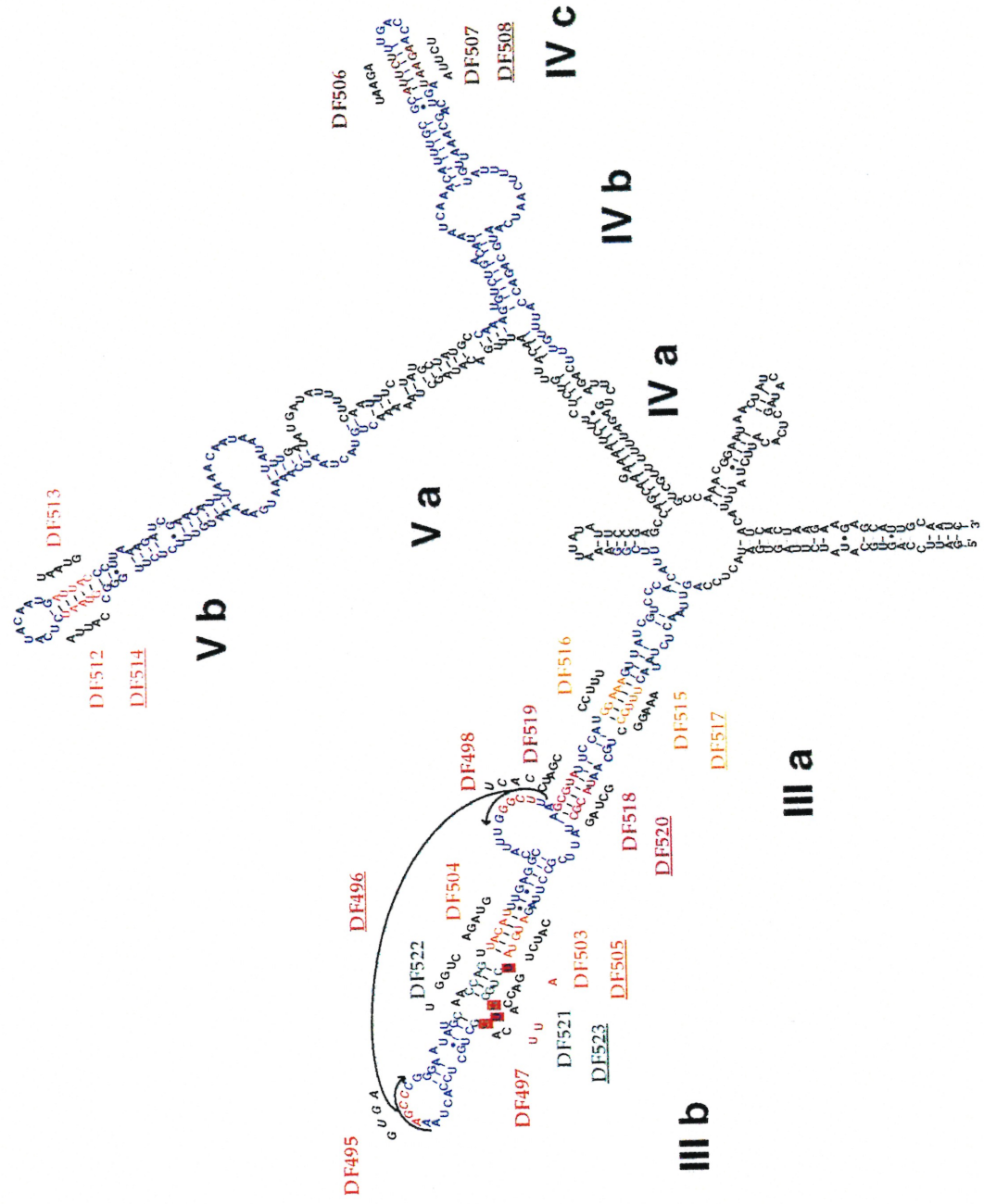
Comment le transcrit de *bicoid* est-il recruté par différents facteurs aux différentes étapes de son transport? Où est encodée l'information spécifiant la destination du transcrit? Ces questions dirigent les travaux qui visent à comprendre les signaux de transport dans les transcrits transportés, ou déterminants en *cis*.

Les signaux de transport du transcrit de *bicoid* furent cartographiés dans sa portion 3'UTR. Une fusion d'un fragment de 625 nucléotides de cette portion avec un gène rapporteur localise ce nouveau transcrit selon la distribution caractéristique à l'ARNm de *bicoid* (Macdonald et Struhl, 1988). Ce signal demeure à ce jour l'élément de localisation d'ARN le mieux caractérisé. Une analyse phylogénique et des prédictions assistées par ordinateur suggèrent que cette portion adopte une structure tertiaire complexe de trois grandes tige-boucles (Macdonald, 1990), qui est représentée à la figure 3. Bien que les détails de cette structure ne soient pas bien connus expérimentalement, sa prédiction permet aux travaux de s'appuyer sur un modèle de travail remarquablement utile.

**Figure 3 :** Modèle de la structure du signal de localisation du transcrit de *bicoid* (nt 181-720 de la 3'UTR).

Les régions identifiées en bleu et en couleur sont des sites essentiels pour la reconnaissance par Staufén. Les deux flèches noires indiquent le site d'appariement Watson-Crick entre les protomères d'ARN. Le site BLE1, de 53nt, est retrouvé entre les nucléotides 453 et 505.

Figure tirée de Ferrandon et al. (1997).



Les premiers efforts pour identifier une séquence nécessaire et suffisante pour la localisation du transcrit de *bicoid* a mené l'équipe de Macdonald à l'identification d'un élément nommé BLE1 (pour *bicoid* localisation element) (Macdonald et al., 1993). Cet élément récapitule bien la localisation du transcrit au pôle antérieur de l'ovocyte aux stades précoces. Une analyse détaillée a démontré que la séquence contient des éléments superposés permettant deux événements de reconnaissance. Alors que la fonction de Sww est nécessaire pour ces deux événements, Exu ne serait impliquée que dans l'événement le plus précoce (Macdonald et Kerr, 1997). L'élément BLE1 n'est cependant pas suffisant pour le maintien de l'ancrage du transcrit au pôle antérieur, fonction médiée par la protéine Staufén. Afin qu'un transcrit soit reconnu par cette protéine, de nombreuses portions bicaténaires réparties dans les 625 bases du signal sont essentielles (Figure 3, portions colorées). De plus, le signal établit un pairage Watson-Crick intermoléculaire permettant la formation de complexes multimériques d'ARN (Figure 3, flèches noires). Cette interaction est essentielle pour une association avec Staufén et pour sa fonction (Ferrandon et al., 1997). Il est intéressant de mentionner que la tige bicaténaire du BLE1 est aussi importante pour la reconnaissance médiée par Staufén. Ceci suggère que cette portion est successivement reconnue par deux protéines, ou deux groupes de protéines, qui s'assemblent à des étapes distinctes du parcours du transcrit.

En conclusion, l'ensemble des observations faites à ce jour démontre que des déterminants distincts du signal de localisation du transcrit de *bicoid* sont responsables des différentes étapes de localisation. Pour ce, ces déterminants en *cis* sont reconnus par des facteurs en *trans* distincts.

### Transport et localisation du transcrit d'*oskar*

Le transcrit d'*oskar* est synthétisé dans les cellules nourricières et accumulé dans l'ovocyte en devenant extrêmement tôt dans la progression de celui-ci dans le germarium. Sa localisation change ensuite et le transcrit s'accumule temporairement au pôle antérieur de l'ovocyte. Finalement, cette accumulation disparaît et le transcrit est ancré précisément au pôle postérieur où il demeure jusqu'à sa traduction (Ephrussi et al., 1991; Kim-Ha et al., 1991). Comme nous l'avons vu plus tôt, la localisation et la traduction du transcrit d'*oskar* permettent l'assemblage du plasmé polaire, qui spécifiera la lignée germinale de l'embryon. Nous examinerons ici les facteurs qui sont impliqués dans le transport et dans la traduction de de l'ARNm d'*oskar*.

Comme pour le transcrit de *bicoid*, la localisation en plusieurs étapes du transcrit d'*oskar* requiert les fonctions du cytosquelette et de multiples autres gènes. Parmi ceux-ci, les fonctions des gènes *PKA*, *cappuccino*, *spire*, *Par-1*, *chickadee* et *Tropomyosin-II* mettent en évidence l'importance du cytosquelette dans la dernière étape du transport, soit la localisation postérieure du transcrit (revu dans Lasko, 1999). Cette étape nécessite un remaniement général du réseau de microtubules dans l'ovocyte : le MTOC qui était jusqu'alors retrouvé au pôle postérieur sera dissolu et réassemblé au pôle antérieur de l'ovocyte. Une conséquence cruciale pour la localisation du transcrit d'*oskar* est que l'extrémité positive des microtubules se retrouvera alors au pôle postérieur de l'ovocyte. Les protéines encodées par les gènes *PKA*, *cappucino* et *spire* sont impliquées dans les signaux et dans l'établissement du nouvel arrangement de microtubules. Récemment, la sérine/thréonine kinase Par-1

fut aussi impliquée dans les remaniements du cytosquelette qui sont essentiels pour la localisation postérieure du transcrit d'*oskar*. Dans la descendance d'un mutant pour ce gène, le réseau de microtubules est organisé de façon anormale et l'ARNm d'*oskar*, de même que la protéine Staufen, sont anormalement localisés au centre de l'embryon (Shulman et al., 2000). Ce phénotype illustre bien la complexité des signaux impliqués dans la réorganisation du réseau de microtubules nécessaire pour le transport du transcrit. Le processus de relocalisation semble aussi impliquer directement ou indirectement des facteurs reliés à la régulation ou à l'établissement de structures dépendantes de l'actine (*Tropomyosin-II*) et de la profiline (encodée par le gène *chickadee*). Leur implication démontre une fonction pour plusieurs composantes cytosquelettiques dans le mécanisme.

Le gène ayant sans doute généré le plus d'intérêt pour une fonction directe dans le transport du transcrit d'*oskar* est *staufen*. Plusieurs observations suggèrent une interaction directe entre Staufen et le transcrit d'*oskar* et suggèrent aussi que cette interaction est importante pour son transport au pôle postérieur. Premièrement, les ovocytes de mutants pour le gène *staufen*, n'accomplissent pas la dernière étape du transport du transcrit d'*oskar* et celui-ci demeure ancré au pôle antérieur (Ferrandon et al., 1994; St Johnston et al., 1991). Plus spécifiquement encore, une mutation ponctuelle dans le déterminant majeur de liaison à l'ARNdb de Staufen, qui affecte sa fonction sans interférer avec la structure globale du domaine, récapitule bien ce phénotype (Ramos et al., 2000). De plus, la distribution de la protéine Staufen imite très bien la répartition du transcrit d'*oskar* tout au long de son trajet dans l'ovocyte (St Johnston et al., 1991). Finalement, des drogues ou des mutations

qui déstabilisent les microtubules interfèrent de la même façon avec la distribution de l'ARNm d'*oskar* et de la protéine Staufen (Clark et al., 1994; Theurkauf et al., 1993; Theurkauf, 1994).

Le modèle actuel du mécanisme de transport est que Staufen s'associe avec le transcrit d'*oskar* et que le complexe est recruté et transporté sur le réseau de microtubules depuis le pôle antérieur jusqu'au pôle postérieur. En fait, depuis plusieurs années, un support indirect pour l'implication d'une forme de kinésine dans le mouvement du complexe Staufen-ARNm d'*oskar* s'est accumulé. Très récemment, une telle protéine fut directement impliquée dans cette fonction. Le gène de la chaîne lourde de la kinésine (KHC) est essentiel pour la relocalisation postérieure du transcrit. Cette protéine co-localise avec le transcrit d'*oskar* et la protéine Staufen. De plus, comme pour des mutants pour *staufen*, le transcrit demeure ancré au pôle antérieur de l'ovocyte dans les mutants *KHC*. Ces observations, de même que les propriétés intrinsèques de la protéine, suggèrent fortement que la KHC puisse interagir avec une partie du complexe transportant l'ARNm d'*oskar* (Brendza et al., 2000). Le déterminant pour une telle interaction n'est cependant pas connu à ce jour.

#### Signaux en *cis* du transcrit d'*oskar*

Les déterminants de localisation d'*oskar* sont aussi retrouvés dans sa portion 3'UTR. Comme pour les signaux présents dans la portion 3'UTR du transcrit de *bicoid*, des éléments dirigent la localisation du transcrit d'*oskar* aux étapes successives de son voyage dans l'oeuf. Ainsi, un élément entraîne l'accumulation du transcrit dans l'ovocyte tôt dans l'ovogenèse, deux petites portions permettent la relâche de l'ARN du pôle antérieur de l'ovocyte et finalement, un élément dirige la

relocalisation du transcrit au pôle postérieur (Kim-Ha et al., 1993). En dépit de l'excellente cartographie de ces éléments, aucune description ou prédiction de leur structure n'a été rapportée. Ceci permettrait certainement d'en connaître un peu plus sur les propriétés des facteurs en *trans* impliqués dans les étapes de la localisation du transcrit.

*Traduction d'oskar au bon endroit et au bon moment...*

#### Réprimer

Le transport de l'ARN est très souvent couplé au contrôle traductionnel. Afin d'accomplir l'expression locale d'un transcrit, on doit en réprimer la traduction pendant le transport. Cette affirmation est supportée par les données relatives à plusieurs systèmes de transport d'ARN, mais la localisation du transcrit d'*oskar* en est certainement l'exemple le mieux caractérisé. Ce transcrit n'est traduit qu'après sa localisation au pôle postérieur. En fait, les deux mécanismes sont si intimement liés que l'altération des séquences qui médient la localisation du transcrit empêche aussi sa traduction (Markussen et al., 1995; Rongo et al., 1995). Le couplage entre les deux mécanismes se fait en bonne partie par la portion 3'UTR du transcrit, où des éléments de répression traductionnelle y sont dispersés (Kim-Ha et al., 1995). Le contrôle traductionnel de ce transcrit est principalement médié par la protéine Bruno, qui reconnaît directement jusqu'à six copies d'un élément de répression traductionnelle de neuf nucléotides nommé BRE (Bruno Response Element). Un transgène dans lequel ces éléments ont été tronqués entraîne une expression ectopique et indépendante de la localisation du transcrit encodé (Webster et al.,



1997). Peu est connu, pour le moment, sur le mécanisme de la répression médiée par Bruno. Des travaux récents ont toutefois démontré que cet effet n'était pas réalisé par une altération dans la reconnaissance de la coiffe (7-méthylguanosine) ou par une modification de la longueur de la queue de poly(A) du transcrit d'*oskar* (Lie et Macdonald, 1999).

#### Dé-réprimer la traduction

La répression traductionnelle du transcrit d'*oskar* est stricte dans l'espace comme dans le temps. Un mécanisme doit donc permettre la dé-répression de sa traduction au moment et à l'endroit qui exigent la fonction d'Oskar. En accord avec cette prédiction, un élément a été identifié qui est nécessaire pour la dé-répression traductionnelle du transcrit. En contraste avec les éléments de transport et de répression traductionnelle, celui-ci se retrouve dans la portion 5'UTR. Lorsqu'on enlève cette portion du transcrit d'*oskar* et qu'on la remplace par la 5'UTR d'un autre transcrit, le nouveau transcrit demeure silencieux et cet effet est indépendant de sa localisation. Par contre, inclure cet élément dans un transgène localisé au pôle postérieur par la portion 3'UTR d'*oskar* rétablit la dé-répression dépendante du transport. Ces résultats mettent en évidence le dialogue fonctionnel entre les éléments qui permettent la localisation et ceux qui répriment la traduction du transcrit en 3'UTR, et ceux qui en permettent la dé-répression en 5'UTR (Gunkel et al., 1998).

### Facteurs en *trans*

Plusieurs facteurs en *trans* sont spécifiquement impliqués dans le mécanisme de dé-répression traductionnelle. Un facteur critique est l'hélicase à ARN Vasa (Breitwieser et al., 1996; Hay et al., 1990). Cette protéine est apparentée de près au facteur d'initiation de la traduction eIF4A et pourrait être impliquée dans le contrôle de l'initiation de la traduction du transcrit d'*oskar*. La protéine Vasa est recrutée au pôle postérieur tôt dans l'ovogenèse, où elle remplit une fonction essentielle dans la traduction des transcrits d'*oskar* et de *nanos* dans le plasme polaire (Gavis et al., 1996).

Un autre facteur impliqué dans la dé-répression du transcrit d'*oskar* est la protéine Staufen. Staufen semble donc jouer un rôle dans la coordination des événements de transport et de contrôle traductionnel (Gunkel et al., 1998). Ces contributions sont toutefois distinctes : comme nous le verrons sous peu, elles peuvent être découplées en altérant spécifiquement des déterminants précis et distincts de cette protéine.

Finalement, la protéine Oskar est elle-même nécessaire pour le maintien de l'ancrage de son transcrit et de sa traduction au pôle postérieur. Cette observation est encore interprétée comme une boucle de rétroaction positive pour le processus d'assemblage du plasme polaire (Breitwieser et al., 1996).

À l'image de la relation entre les différents éléments d'ARN présents dans le transcrit d'*oskar*, un réseau complexe d'interactions existe entre les facteurs qui réalisent ces effets. D'une part, la protéine Oskar interagit avec Staufen et Vasa dans le système des deux hybrides et par des essais d'affinité *in vitro* (Breitwieser et al., 1996) et

d'autre part, Bruno interagit avec *Vasa in vitro* (Webster et al., 1997). Or, la signification de ces interactions de même que les détails des événements de régulation traductionnelle et de coordination avec le processus de transport demeurent évasifs. Le développement d'un système d'extraits embryonnaires qui reconstitue bien le contrôle traductionnel par Bruno permettra possiblement d'en élucider le mécanisme en apparence complexe.

### **Staufen**

Dans les deux événements de transport d'ARN que j'ai décrit, de même que dans le contrôle traductionnel du transcrit d'*oskar*, le produit du gène *staufen* joue un rôle de premier plan. J'effectuerai, dans la section qui suit, une revue détaillée des connaissances relatives à cette protéine.

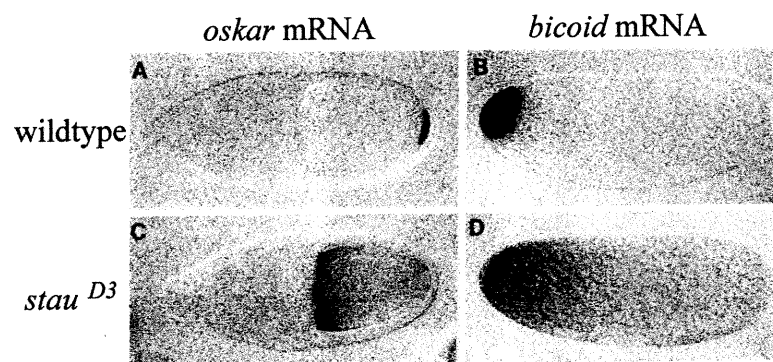
#### *Identification et fonctions*

*staufen* fut identifié lors d'un criblage pour des gènes à effet maternel. Sa mutation et une perte complète de sa fonction entraînent des conséquences catastrophiques dans l'établissement des structures de la tête, du thorax, de l'abdomen et du plasme polaire des embryons (St Johnston et al., 1991). Dans de tels mutants, les structures abdominales sont réduites ou absentes et les cellules germinales ne se forment pas. Ce phénotype est principalement dû à une localisation incomplète du transcrit d'*oskar* et au défaut de dérégulation de sa traduction (Figure 4 A et C) (Gunkel et al., 1998; St Johnston et al., 1991). En l'absence de plasme polaire, la traduction du transcrit de *nanos* est impossible, ce qui cause l'atrophie ou l'absence de structures abdominales.

**Figure 4 :** Effet de la mutation de *stau* sur la localisation des transcrits de *bicoid* et d'*oskar*.

Distribution des transcrits d'*oskar* (A et C) et de *bicoid* (B et D) dans les embryons WT (A et B) et mutants pour *stau* (C et D).

Figure tirée de Ferrandon et al. (1994).



D'autre part, des défauts dans les structures de la tête et du thorax résultent de la perte de l'ancrage du transcrit de *bicoid* pendant l'ovogenèse (Figure 4B et D).

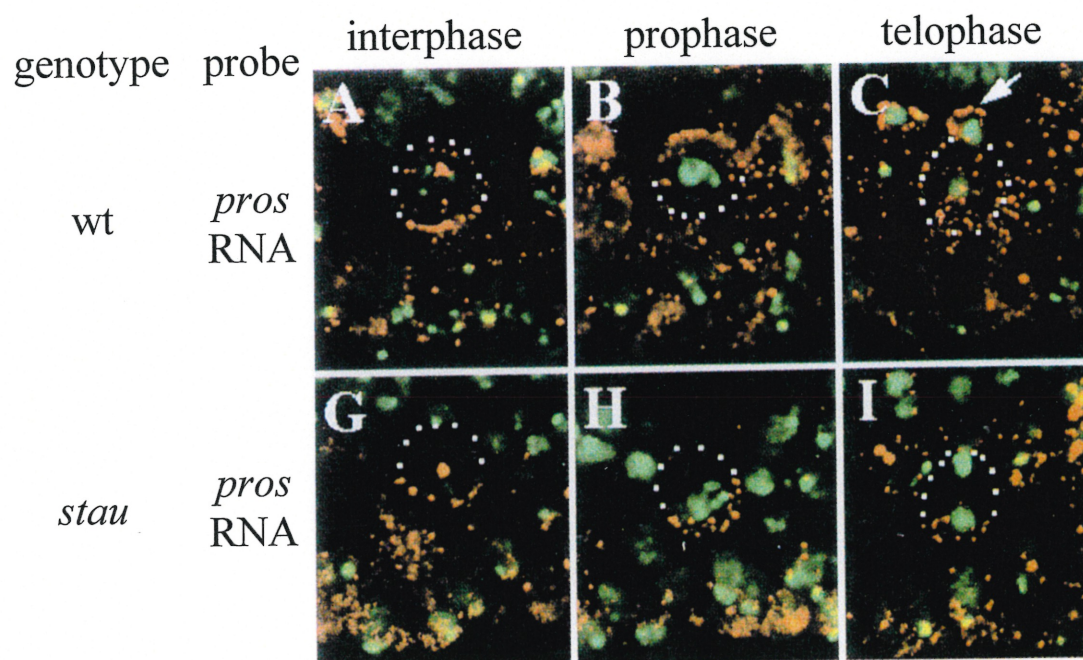
Outre ses fonctions pendant la formation de l'oeuf, *staufen* fut aussi impliquée dans la division asymétrique des neuroblastes pendant le développement du système nerveux de la drosophile. *Staufen* s'y associe aux protéines Inscutable (Li et al., 1997) et Miranda, de même qu'au transcrit de *prospero* (Broadus et al., 1998; Shen et al., 1998). Ce déterminant permet une prise de décision développementale distincte dans les cellules-filles du neuroblaste. Le transcrit et la protéine Prospero sont localisés dans le cortex apical du neuroblaste en télophase et ces déterminants sont ségrégués dans la cellule-fille appelée GMC (pour *Ganglion Mother Cell*; Figure 5C). La fonction du gène *staufen* est essentielle pour cette localisation. Plus précisément, la localisation du transcrit est dépendante sur l'interaction entre *Staufen* et Miranda (Schuldt et al., 1998). Comme pour l'association avec le transcrit d'*oskar*, les détails de l'interaction avec le transcrit de *prospero* ne sont pas clairs, mais des essais de liaison *in vitro* et *in vivo* suggèrent fortement que *Staufen* puisse reconnaître directement la portion 3'UTR du transcrit. Le cytosquelette joue aussi un rôle important dans la localisation asymétrique du transcrit de *prospero*. Or, contrairement aux localisations des transcrits de *bicoid* et d'*oskar*, ici le mécanisme n'implique pas le réseau de microtubules, mais plutôt les microfilaments d'actine (Shen et al., 1998).

*Staufen* joue donc un rôle majeur dans de nombreux événements de localisation d'ARN et réalise aussi, du moins dans le cas du transport du transcrit d'*oskar*, une fonction-pivot dans le contrôle de la traduction d'un transcrit localisé.

**Figure 5 :** Distribution du transcrit de *prospero* aux différents stades de la division asymétrique du neuroblaste et effet de la mutation de *staufen*.

Dans les embryons WT, ce transcrit se retrouve dans la cellule-fille qui bourgeonne du cortex apical du neuroblaste. Dans les embryons *stau*, le transcrit n'est pas relocalisé au cortex apical au moment de la télophase.

Figure tirée de Li et al. (1999).





On peut noter de nombreux parallèles entre les événements de transport dans lesquels cette protéine est impliquée. Or, des différences remarquables existent qui mettent en perspective des aspects divergents entre ces systèmes (ex. : la relation avec l'actine dans le neuroblaste). La caractérisation moléculaire de la protéine Staufen était donc justifiée pour mieux comprendre sa relation avec ces différents aspects et pour mieux en comprendre les mécanismes .

#### *Description de la protéine*

Staufen fut clonée en prenant avantage de mutants réalisés par l'insertion d'un transposon appelé élément P (St Johnston et al., 1991). Des banques génomiques furent générées, à partir des mutants au phénotype *staufer*, qui purent ensuite être criblées par hybridation avec la séquence de l'élément P. Le transcrit de *staufer* détecté par Northern est d'environ 5,3kb et le cadre de lecture qui y est retrouvé code pour une protéine de poids moléculaire de 110kDa. Cependant, par immunobuvardage une protéine de poids moléculaire apparent d'environ 150kDa est détectée. La protéine prédite contient une forte représentation en acides aminés basiques, lysines et arginines, ce qui lui confère un pKa de 9.5. Une concentration élevée de glutamines et de prolines est aussi retrouvée dans sa portion la plus N-terminale. Les auteurs présumèrent que la migration non-conforme à la prédiction de son poids moléculaire est le résultat de ses particularités au niveau de la structure primaire. Il est cependant possible qu'une partie de la discordance entre la prédiction du poids moléculaire et la migration apparente en électrophorèse de cette protéine soit le résultat de modifications post-traductionnelles. Cette avenue intéressante de recherche n'a pas encore été explorée.

### *Distribution*

Au cours du développement, la distribution de Staufen imite bien la distribution des transcrits de *bicoid* et d'*oskar*. Après la ponte, Staufen est retrouvée en forte concentration aux pôles antérieurs et postérieurs de l'embryon. Au pôle postérieur, Staufen est retrouvée en association avec les granules polaires, structures propres au plasme polaire, assemblés par Oskar. Plus tard dans le développement, la protéine est aussi détectée dans une région du système nerveux. On attribue ce signal à la fonction de Staufen dans les neuroblastes en division.

### *Qu'est-ce qu'un dsRBD?*

Une analyse détaillée de la structure primaire de la protéine Staufen permet, de concert avec la croissance importante des séquences accessibles dans les bases de données, d'identifier le domaine de liaison à l'ARN double-brin (dsRBD; St Johnston et al., 1992). Ce domaine d'environ 65-70 acides aminés a été identifié dans une quantité grandissante de protéines incluant XlrbpA, TRBP, PKR/DAI, les protéines de la famille Rnase III d'*E. coli* et ses homologues eucaryotes, de même que certaines protéines virales comme la protéine E3L de Vaccinia et la protéine ns34 du rotavirus porcine. Dans plusieurs de ces protéines, le dsRBD est présent en plusieurs copies. Cinq furent identifiées dans la séquence primaire de Staufen.

À partir des premières analyses de séquences, deux sous-types de dsRBD ont été décrits. Alors que l'une des classes respecte strictement un consensus tout au long des 70 acides aminés du domaine, une autre classe ne le respecte que dans le tiers le plus C-terminal. Une diversité structurale est donc présente dans les domaines de cette famille. Les essais de liaison à l'ARN ont aussi confirmé leur diversité

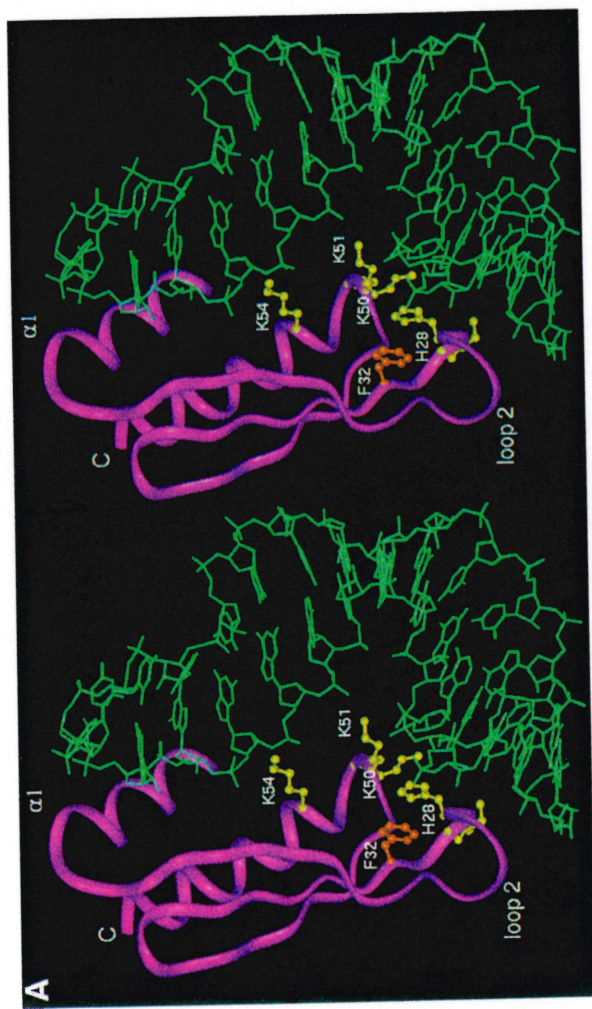
fonctionnelle. Certains domaines s'associent fortement à l'ARNdb alors que d'autres en sont virtuellement incapables. Même parmi les dsRBD dont la séquence s'approche du consensus sur toute sa longueur, seule une fraction de ce sous-groupe peut lier efficacement l'ARNdb (Bevilacqua et Cech, 1996; St Johnston et al., 1992). Il fut suggéré que les domaines qui ne lient pas individuellement l'ARN puissent contribuer en coopérant dans le contexte de la protéine entière. Cependant, bien que pour certaines protéines cette hypothèse semble trouver appui, le gain d'affinité fourni par ces domaines est relativement modeste (Krovat et Jantsch, 1996). Comme c'est le cas pour plusieurs des dsRBD de Staufen, il apparaît aujourd'hui que nombre d'entre eux servent à d'autres fonctions. Dans plusieurs cas, ils établissent plutôt, ou en même temps, des interactions protéine-protéine.

#### *Structure du domaine*

La structure de dsRBD fut obtenue par résonance magnétique nucléaire (RMN) et par cristallographie pour un domaine de la kinase dépendante de l'interféron (PKR) (Bevilacqua et Cech, 1996) et de la protéine XlrpbA (Ryter et Schultz, 1998) de même que pour le dsRBD3 de Staufen. Pour ce dernier, la structure par RMN en absence et en présence d'ARNdb a été récemment publiée (Ramos et al., 2000). Cette structure est présentée à la Figure 6 et une analyse de cette structure de même que de ses contacts avec l'ARNdb sera maintenant présentée. Tout d'abord, le domaine adopte une topologie de type  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$ . Les branches  $\beta$  sont regroupées en un feuillet plissé antiparallèle et les deux hélices  $\alpha$  sont compactées sur l'une des faces du feuillet. Une série de boucles, de longueurs inégales, et de coudes relie ces motifs de structure secondaire.

**Figure 6 :** Image stéréo d'une structure à faible énergie du complexe dsRBD3-ARNdb. Phe32 et cinq acides aminés critiques pour l'interaction sont mis en évidence.

Figure tirée de Ramos et al. (2000).



Les boucles 2 et 4 se retrouvent sur une des extrémités du plan formé par le feuillet plissé  $\beta$  antiparallèle.

#### *Liaison de l'ARNdb par le dsRBD3: détails et implications*

Dans la structure établie avec l'ARNdb, plusieurs contacts sont visibles. La bordure du domaine formée par les extrémités N-terminales des hélices et par les boucles 2 et 4 contient les déterminants de liaison de l'ARNdb. Principalement, les boucles 2 et 4, qui étaient très flexibles dans la structure sans ARN, adoptent maintenant des structures plus stables et établissent des contacts avec l'ARNdb. La boucle 2 contacte le sillon mineur alors que la boucle 4 contacte le squelette phosphate à travers le sillon majeur adjacent. Un autre déterminant d'interaction avec l'ARNdb est l'hélice  $\alpha_1$ . Cette hélice se retrouve à proximité de la boucle d'ARN formée par le ligand, à près de 12pb (environ un tour d'hélice) du site d'interaction des boucles 2 et 4.

Une des révélations majeures de cette structure est que les interactions sont réalisées avec des déterminants qui permettent peu de spécificité de reconnaissance au niveau de la séquence de l'ARNdb. L'hélice d'ARNdb forme un sillon mineur large et peu profond et un sillon majeur étroit et profond en comparaison avec l'ADN. Les contacts des boucles du dsRBD3 avec l'ARN n'y sont en conséquence réalisés qu'avec les groupements 2'-OH et les groupements phosphate de l'épine dorsale de l'ARNdb. Dans la boucle, l'hélice  $\alpha_1$  fait aussi des contacts avec les groupements 2'-OH et phosphates de même qu'un empilement (stacking) et une interaction de Van der Waals avec les bases, mais encore une fois, ces interactions offrent peu de spécificité à la reconnaissance des bases exposées dans la boucle du

ligand. Il est aussi important de mentionner que la présence d'une boucle dans le ligand d'ARNdb n'est pas nécessaire à la liaison de Staufen ou d'autres dsRBD (Krovat et Jantsch, 1996; Schmedt et al., 1995; St Johnston et al., 1992). La signification des contacts avec la boucle d'ARNdb dans la structure présentée ici est donc, pour le moment, inconnue.

En conclusion, les interactions révélées par cette structure sont donc consistantes avec le peu de spécificité pour la séquence observée dans les essais de liaison *in vitro* pour Staufen et pour d'autres protéines de cette famille.

### *L'énigme de la spécificité*

L'absence de spécificité présentée par la protéine Staufen *in vitro*, de même que les détails de son interaction avec l'ARNdb dans la structure présentée sont, à ce jour encore, à l'origine d'un paradoxe. Des portions d'ARNdb existent dans une grande partie des 3'UTR de nombreux transcrits présents dans une cellule. Beaucoup d'autres ARN non-codants fortement structurés y sont aussi abondants. S'il suffit pour Staufen de s'associer à ces portions d'ARNdb pour en entraîner le transport ou l'ancrage, pourquoi tous ces ARN ne sont-ils pas localisés en même temps et aux mêmes endroits? En fait, *in vivo*, Staufen montre une spécificité de reconnaissance pour certains transcrits (Broadus et al., 1998; Ferrandon et al., 1994). La protéine ne semble s'associer qu'avec les transcrits pour lesquels elle joue un rôle dans la localisation soit, les transcrits de *bicoid* et d'*oskar* pendant l'ovogenèse et de *prospero*, plus tard dans le développement du système nerveux.

Cette spécificité fut aussi mise en évidence par un essai de transport d'ARN *in vivo* développé par Ferrandon et al. (1994). Cet essai consiste à injecter différents

ARN marqués dans un blastoderme syncitial. Après une courte incubation, l'embryon est fixé et un marquage de la protéine Staufen est réalisé pour en comparer la distribution avec celle du transcrit injecté. En procédant ainsi avec la portion 3'UTR de bicoid, on entraîne l'assemblage de cet ARN dans de gros granules (jusqu'à 1µm) qui contiennent Staufen et qui sont ensuite recrutés sur les microtubules (Ferrandon et al., 1994). Ce recrutement est dépendant de Staufen puisque les particules RNP ne se forment pas dans un embryon mutant pour *staufer*. Une grande variété d'autres transcrits, dont certains contiennent des structures, ne sont pas ou sont faiblement assemblés dans de telles particules et ne sont pas recrutés sur les microtubules. Ces résultats démontrèrent clairement qu'un niveau de spécificité d'association de Staufen avec certains transcrits existe *in vivo*, qui n'a pas été observé *in vitro*.

Un niveau supplémentaire de spécificité fut aussi révélé par cet essai: lorsque le transcrit d'*oskar* est injecté, il n'y a aucun assemblage de particules avec Staufen. Cette observation est en accord avec le fait que Staufen transporte le transcrit d'*oskar* au pôle postérieur à un stade de l'ovogenèse qui précède celui de la localisation de *bicoid*. Il semble donc qu'à l'image de ce qui fut observé dans l'ovogenèse, la protéine Staufen acquiert des spécificités distinctes à différents stades du développement, modulant ainsi son recrutement dans les événements de transport.

Une hypothèse passablement établie pour expliquer ces observations propose que des facteurs supplémentaires s'associent avec la protéine Staufen au moment de l'assemblage des particules et qu'ils modulent la spécificité de recrutement des



transcrits. Des co-facteurs distincts pourraient ainsi s'associer aux différents stades de la fonction de *Staufen*.

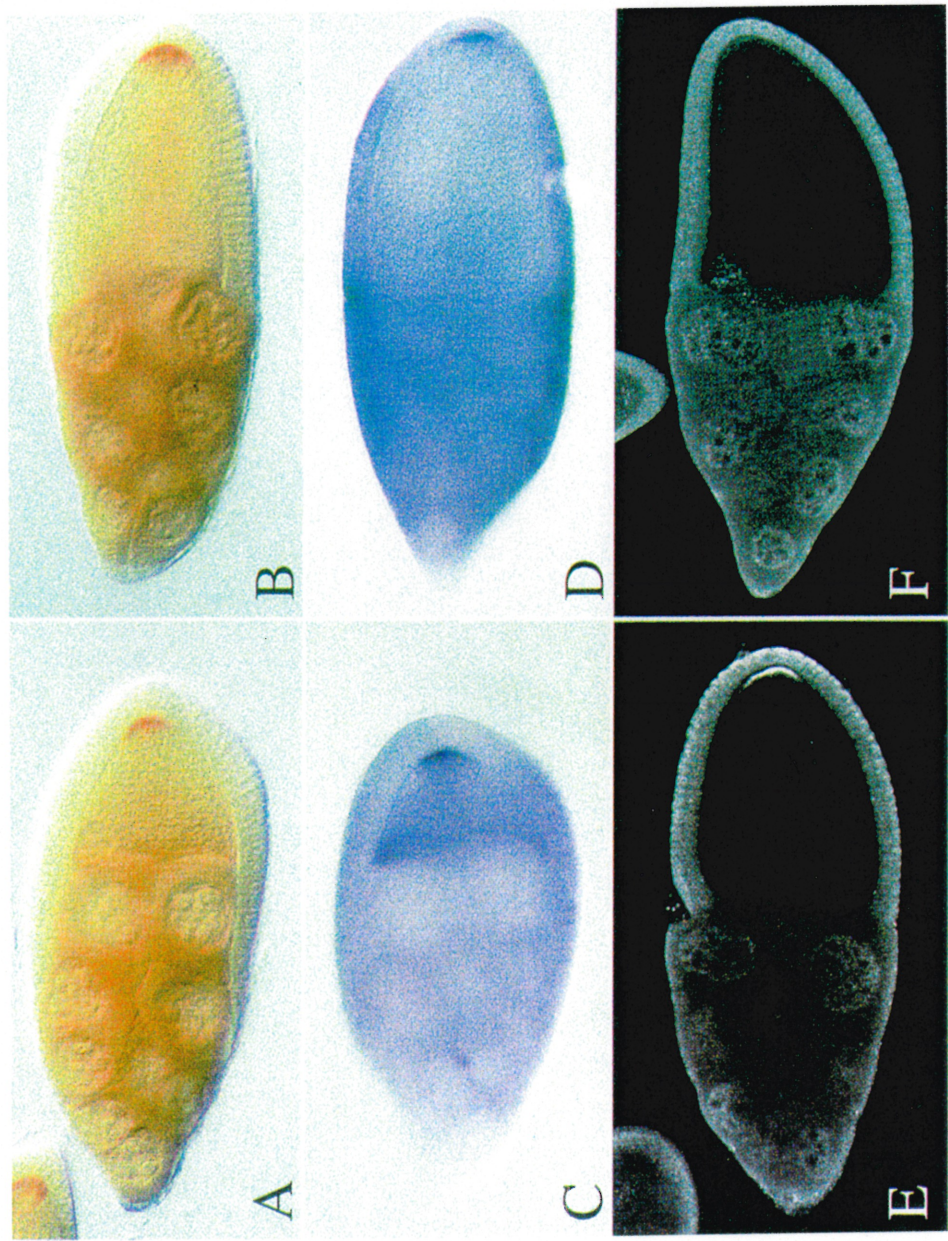
#### *Interactions et fonctions des dsRBD de Staufen*

Comme le suggère leur diversité structurale, les dsRBD de *Staufen* réalisent des aspects distincts des fonctions de la protéine. Premièrement, ces domaines ne peuvent pas tous lier l'ARNdb. Les dsRBD1, 3 et 4 de *Staufen* peuvent lier l'ARNdb *in vitro* lorsqu'isolés en fusion avec la GST. Cependant, le dsRBD3 est le déterminant majeur de liaison de la protéine et les domaines 1 et 4 présentent des affinités moindres. En fait, les déterminants nécessaires pour la liaison de l'ARNdb ne sont pas présents dans tous les dsRBD de *Staufen* (Micklethwait et al., 2000). Plusieurs des acides aminés auxquels furent attribuée une contribution critique dans la reconnaissance de l'ARNdb ne sont pas présents dans le dsRBD5. La structure atypique de ce domaine suggère donc qu'il réalise une autre fonction que la reconnaissance de l'ARNdb. Or, ce domaine est essentiel pour des aspects précis de la fonction de la protéine. L'expression d'un transgène qui encode la protéine tronquée du dsRBD5 dans une mère qui n'exprime pas le gène *staufen* localise correctement l'ARNm d'*oskar* pendant l'ovogenèse, mais la dé-répression traductionnelle du transcrit n'a pas lieu (Figure 7E et F). Le transcrit d'*oskar* y demeure donc silencieux et l'embryon développera les défauts caractéristiques de l'absence d'assemblage du plasme polaire. Plus tard dans le développement, une contribution de ce domaine est aussi importante pour la localisation adéquate du transcrit de *prospero* pendant la division du neuroblaste.

**Figure 7** : Le dsRBD5 est nécessaire pour la traduction du transcrit d'*oskar*.

A) et B) présentent la localisation du produit d'un transgène exprimant *Staufen* sans son dsRBD5, dans des ovocytes mutant pour *staufen*, aux stades 9 et 10. C) et D) y présentent la distribution du transcrit d'*oskar*. E) et F) présentent (en blanc) la distribution de la protéine Oskar dans un ovocyte WT (E) et dans un ovocyte mutant qui exprime le transgène (F).

Figure tirée de Micklem et al. (2000).



Ce domaine y interagit avec Miranda, une protéine qui coordonne les événements de division asymétrique (Schuldt et al., 1998).

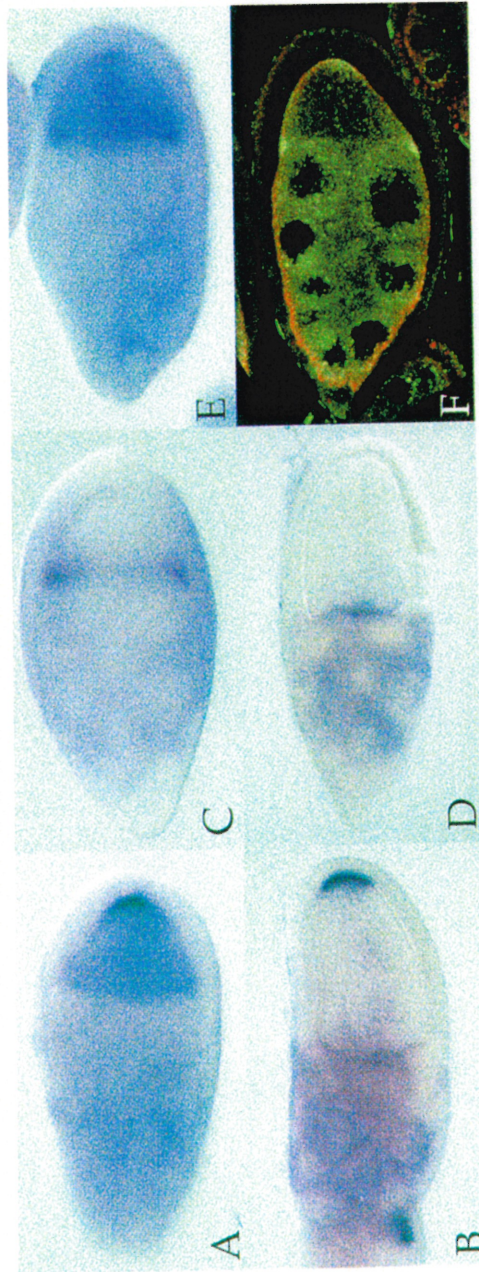
Le dsRBD2 comporte aussi des particularités structurales : la seconde boucle du motif est très longue et elle contient un motif riche en prolines qui est conservé entre les espèces (Micklem et al., 2000). Bien que le domaine ne puisse lier l'ARNdb *in vitro*, la troncation de la boucle par mutagenèse dirigée permet au domaine d'être fonctionnel dans de tels essais. Cependant, la présence de la boucle, plutôt que la capacité du domaine à lier l'ARNdb, semble jouer un rôle critique pour la fonction de la protéine. Un mutant dans lequel cette boucle a été exclue ne rétablit pas la localisation postérieure du transcrit d'*oskar* (Figure 8). En contraste avec ce qui se produit lors de la délétion du dsRBD5, le transcrit d'*oskar* est traduit de façon aberrante au pôle antérieur, où il s'accumule plus tôt pendant l'ovogenèse. D'autre part, une telle mutation n'interfère pas avec le mécanisme de localisation du transcrit de *prospero*. Ces travaux impliquent donc la boucle du dsRBD2 dans une fonction spécifique pour le recrutement de l'appareil de transport du transcrit d'*oskar*.

En plus de démontrer la diversité des interactions médiées par les dsRBD de Staufén, ces résultats révèlent une implication de déterminants distincts dans les différentes fonctions de la protéine. L'exploitation de Staufén dans divers systèmes de localisation a suscité beaucoup d'intérêt dans la communauté scientifique. La diversité de ses fonctions a aussi suggéré qu'elle puisse être la pierre angulaire de nombreux événements de transport d'ARN.

**Figure 8 :** La seconde boucle du dsRBD2 est nécessaire pour la localisation postérieure du transcrit d'*oskar*.

A) et B) Localisation postérieure du transcrit dans des ovocytes WT aux stades 9 et 10A. C) et D) et E) Localisation ectopique au pôle antérieur de l'ovocyte dans des mutants pour *stau* qui expriment un transgène ne comportant pas la boucle du dsRBD2. F) Distribution de la protéine du transgène (en jaune) dans le même ovocyte que E), démontrant sa colocalisation avec le transcrit.

Figure tirée de Micklem et al. (2000).



### **Le transport cytoplasmique de l'ARN : vers un mécanisme universel?**

Le transport de transcrits est loin d'être un phénomène limité à l'ovocyte de la drosophile. Des exemples ont été décrits dans une grande variété de cellules, somatiques et germinales. De même, le transport d'ARN a été observé dans une toute aussi grande variété d'organismes, de *H. sapiens* à *S. cerevisiae*. Il n'est pas dans l'objectif de cette thèse de décrire en détails un large échantillonnage de ces systèmes. D'excellentes revues de la littérature sont disponibles pour le lecteur intéressé (Jansen, 2001; Kiebler et DesGroseillers, 2000). Il importe plutôt de mettre en perspective une caractéristique du transport cytoplasmique d'ARN, soit les très grandes similitudes qui existent entre les différents systèmes qui furent étudiés. Pour illustrer par des exemples ce concept, je décrirai ici trois paradigmes : le transport de l'ARNm de la MBP dans l'oligodendrocyte de souris, le transport du transcrit de *Vg1* dans l'ovocyte du xénope et le transport du transcrit de la  $\beta$ -actine dans le fibroblaste de poulet. Bien qu'à prime abord ils paraissent très différents les uns des autres, ces systèmes comportent beaucoup de similarités entre eux et avec les autres événements de localisation d'ARN. Après une brève description, je mettrai en relief leurs similitudes en décrivant un modèle général de transport d'ARN.

#### *Localisation du transcrit de la MBP dans les oligodendrocytes*

Les travaux du laboratoire de J. Carson ont mené à une très bonne caractérisation du mécanisme de transport du transcrit de la MBP. Par un essai de microinjection dans des oligodendrocytes en culture primaire, cette équipe put suivre l'ARNm de la MBP marqué avec un fluorophore tout au long de son trajet dans les prolongements

cellulaires. Lorsqu'il est injecté dans le soma, le transcrit s'assemble en d'immenses granules (de 0,6 à 0,8 $\mu$ m de diamètre), qui s'alignent le long des microtubules et se meuvent à une vitesse de 0,2  $\mu$ m/seconde (Ainger et al., 1993). En réalisant un marquage unique par molécule d'ARN, l'équipe de Carson a pu démontrer que les granules transportées contenaient plusieurs copies du transcrit. D'autre part, ces granules colocalisent avec plusieurs composantes de l'appareil traductionnel dont l'arginyl-tRNA synthétase et le facteur d'élongation EF1 $\alpha$ . Leurs observations suggèrent que ces granules contiennent aussi des ribosomes (Barbarese et al., 1995). En fait, leurs travaux pointent fortement en direction d'un mécanisme de transport actif du granule assemblé. Un traitement avec des agents qui dépolymérisent les microtubules inhibent le recrutement des granules dans les prolongements cellulaires et l'injection d'antisens dirigés contre le transcrit de la kinésine affecte aussi la localisation du transcrit (Carson et al., 1997). Des facteurs en *cis* et en *trans* du transcrit de la MBP furent aussi identifiés pour leur implication dans le transport. Un élément de 21 nucléotides appelé RTS (RNA Transport Sequence) fut identifié dans la 3'UTR du transcrit, qui est suffisant pour un assemblage dans les granules de transport et un recrutement dans les prolongements cellulaires. Cependant, un élément supplémentaire est nécessaire pour un recrutement efficace de la MBP dans le compartiment de traduction (Ainger et al., 1997). Finalement, un complexe de six protéines fut purifié par affinité pour le RTS. Une des protéines qui est présente dans ce complexe est hnRNPA2 (Hoek et al., 1998)

Beaucoup de parallèles peuvent être soulevés en comparant ce système de transport avec celui du transcrit d'*oskar*, chez la drosophile, par exemple. Pourtant, il s'agit de



cellules et de transcrits très différents. Les éléments en *cis*, nécessaires pour le transport et le contrôle traductionnel, la formation de grosses granules de transport, la dépendance par rapport au cytosquelette et l'implication de moteurs, de même que le couplage entre le transport d'ARN et le contrôle traductionnel, font partie des analogies qui peuvent être facilement dégagées par une telle comparaison.

#### *Localisation du transcrit de Vgl dans les ovocytes de Xenopus*

La différenciation de l'embryon du xénope est aussi établie, en partie du moins, par une contribution maternelle. Le transcrit de *Vgl*, qui code pour un membre de la famille des TGF- $\beta$ , est transporté en plusieurs étapes au pôle végétal de l'ovocyte en maturation (Dale et al., 1989; Yisraeli et Melton, 1988). La fécondation permet la traduction locale de ce transcrit, ce qui fait émerger les signaux impliqués dans l'induction mésodermique et l'établissement de l'axe gauche-droite de l'embryon (Hyatt et Yost, 1998; Tannahill et Melton, 1989). Au cours des dix dernières années, beaucoup d'information fut obtenue sur les différentes étapes du processus de transport de même que sur les éléments en *cis* et les facteurs en *trans* impliqués dans le mécanisme. Les signaux de localisation sont présents dans la portion 3'UTR du transcrit de *Vgl*. Une grande partie (340 nt) de la 3'UTR adopte une structure complexe (Mowry et Melton, 1992) et des éléments essentiels pour le transport, parfois redondants, y sont répartis. Des travaux de réticulation aux UV permirent d'identifier et de purifier une protéine de 69kDa, *Vgl*-RBP/*Vera* qui s'associe aux signaux de localisation *in vivo*. Cette protéine contient cinq domaines de liaison à l'ARN : un domaine RRM (RNA Recognition Motif), en N-terminal de

la protéine, et quatre copies du domaine KH (hnRNPK Homology) (Deshler et al., 1997; Elisha et al., 1995; Havin et al., 1998).

Il a été observé que le transport du transcrit de *Vg1* nécessite l'intégrité du réseau de microtubules. En accord avec ces observations, la protéine Vg1-RBP/Vera purifiée s'associe avec les microtubules *in vitro*. De plus, une immunodéplétion de ce facteur dans des extraits d'ovocytes détruit l'association du transcrit avec les microtubules, suggérant que Vg1-RBP/Vera peut jouer le rôle de lien entre le transcrit et le cytosquelette (Elisha et al., 1995; Havin et al., 1998; Yisraeli et al., 1990). Finalement, il fut aussi observé que Vg1-RBP/Vera co-sédimente et est retrouvée à proximité d'une portion du réticulum endoplasmique de l'ovocyte, suggérant pour la première fois une fonction de cette organelle dans le transport d'ARN (Deshler et al., 1997).

#### *Localisation du transcrit de l'actine $\beta$ dans les fibroblastes de poulet*

En contraste avec le transport du transcrit de *Vg1* dans l'ovocyte de Xénope, le transport du transcrit de l'actine  $\beta$  dans le fibroblaste de poulet dépend plutôt du réseau de microfilaments d'actine (Bassell et al., 1994; Kislauskis et al., 1993; Latham, Jr. et al., 1994). Un élément de 54 nucléotides appelé Zipcode entraîne la localisation de ce transcrit à la face émergente des lamellipodes des fibroblastes, permettant ainsi leur motilité (Kislauskis et al., 1997). Une purification avec une matrice d'affinité constituée de cet élément permet d'identifier plusieurs facteurs s'y associant. Au moins deux protéines associées à l'actine, soit la gelsoline et la tropomyosine furent ainsi purifiées. De plus, un facteur de 68kDa a aussi été purifié

par cette approche, qui fut nommé ZBP1 (pour Zipcode Binding Protein1) (Ross et al., 1997).

#### *Conservation de la ZBP1/Vg1-RBP/VERA*

À la surprise de tous, cette protéine s'avéra être un homologue (possiblement même un orthologue) de la protéine Vg1-RBP/Vera. Les deux protéines comportent plus de 84% de similitude de séquence et plus de 95% d'identité dans leurs domaines de liaison à l'ARN respectifs (Oleynikov et Singer, 1998). Or, malgré la grande similitude de leurs structures respectives, ces deux protéines reconnaissent différents éléments d'ARN. Les raisons structurales pour cette divergence, de même que ce qui médie le recrutement des facteurs par l'une ou l'autre des composantes du cytosquelette, ne sont toujours pas résolus.

Des indices supplémentaires indiquent que cette protéine peut être impliquée dans plusieurs autres systèmes de localisation de l'ARN. L'ARNm de Tau, qui est normalement localisé dans l'axone des neurones, contient dans sa portion 3'UTR une séquence qui ressemble énormément à l'élément reconnu par Vg1RBP/Vera. Lorsque cet ARN est injecté dans un ovocyte de xénope, le transcrit est transporté et localisé au pôle végétal avec une dynamique qui récapitule bien celle du transcrit de *Vg1* (Litman et al., 1996).

La conservation de cette protéine entre les espèces et son utilisation dans divers systèmes de transport d'ARN suggèrent que cette famille peut être recrutée dans différents complexes de transport. Ces complexes pourraient ensuite être transportés sur différents axes cytosquelettiques, les uns dépendants des microtubules, les autres dépendants des microfilaments d'actine. Un tel complexe

pourrait aussi être recruté à tour de rôle par deux composantes du cytosquelette le long d'un même parcours.

### **Recette pour transporter un transcrit**

Comme les événements de transport que j'ai présentés ici, de même que de nombreux autres systèmes, ont beaucoup de points en commun, il est intéressant d'en récapituler les principales caractéristiques communes avec l'aide d'un modèle. Cet exercice fut réalisé et publié par Whilelm et Vale en 1993 et ce modèle de travail trouva et trouve encore énormément de support et d'utilité. J'adapterai donc ici leur modèle afin de mettre en perspective les connaissances actuelles sur le transport et la localisation d'ARN. Les différentes étapes du transport cytoplasmique de l'ARN sont suggérées dans la figure 9.

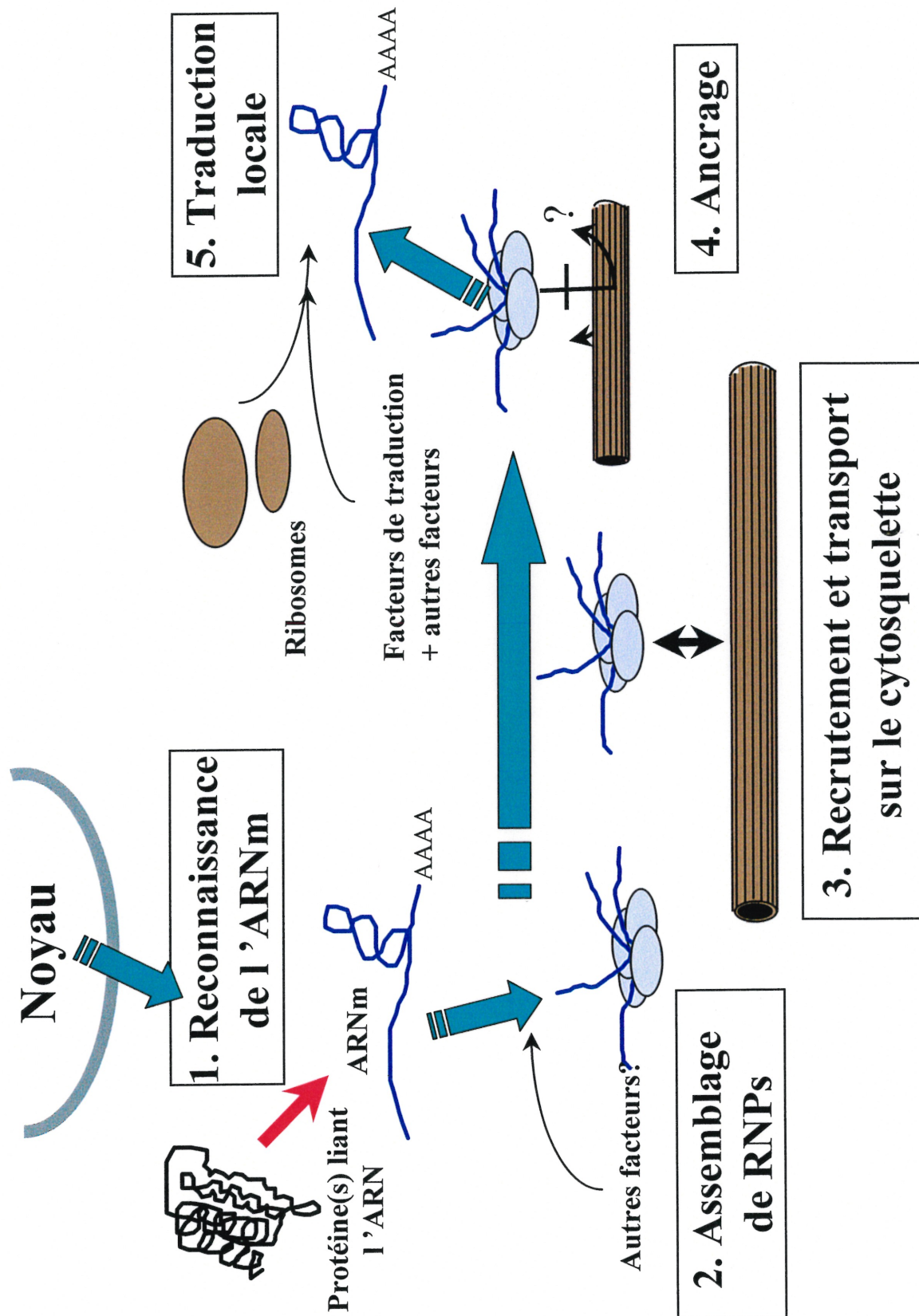
#### *1- Reconnaissance du signal de ciblage*

Il est présentement assumé que le transport d'ARN débute par la reconnaissance de signaux de transport dans un transcrit par une ou plusieurs protéines liant l'ARN. Un peu comme pour les signaux de ciblage des protéines membranaires entre les compartiments cellulaires, des « adresses postales » constituées d'une combinaison de structure et de séquence (ex. : tiges-boucles) sont encodées dans les transcrits transportés. Ces signaux, presque exclusivement retrouvés en 3'UTR, dictent la voie à emprunter et la destination finale par le type de protéine(s) qu'ils recrutent. Bien que cet assemblage puisse se faire dans le cytoplasme, pour plusieurs transcrits il semble qu'une ou des étapes critiques de cette reconnaissance se produise(nt) dans le noyau.

**Figure 9** : Modèle de mécanisme de transport cytoplasmique d'ARN.

Le signal de ciblage du transcrit est premièrement reconnu par une, ou plusieurs protéines (1), ce qui occasionne la formation d'un complexe ribonucléoprotéique (2). Celui-ci est ensuite recruté et transporté sur l'axe cytosquelettique (3) et ancré sur le cytosquelette à sa destination finale (4). Le processus culmine avec la traduction locale du transcrit (5).

Modèle inspiré de Wilhelm et Vale (1994).



Certains facteurs importants en *trans* s'assemblent donc même avant l'export du transcrit. Par exemple, il est connu que la protéine hnRNPA2 (Hoek et al., 1998), impliquée dans le transport du transcrit de la MBP, est aussi importante pour l'export nucléaire du transcrit. Il est possible que certaines protéines nucléaires puissent participer à la structure adéquate des signaux de transport, permettant une reconnaissance optimale des transcrits par l'appareil de transport cytoplasmique.

## 2- Empaquetage des complexes Ribonucléoprotéiques (RNP)

La reconnaissance du transcrit par les protéines agissant en *trans* cause la formation d'un complexe ribonucléoprotéique. Or, une caractéristique très répandue pour ce type de complexe est leur très grande taille. Pour les transcrits de *bicoid* et de la MBP, ces particules peuvent atteindre près de 1  $\mu\text{m}$ . Un autre exemple de la taille de ce genre de complexe est la grosseur du RNP formé lors du transport du transcrit d'ASH1 chez *S. cerevisiae*. Pour son transport, le transcrit est empaqueté dans une particule d'un diamètre moyen évalué à 2-3  $\mu\text{m}$  (Bertrand et al., 1998; Long et al., 1997).

Les interactions à l'origine de ces immenses complexes sont peu connues. Il est présentement proposé que la dimérisation ou la multimérisation de plusieurs des facteurs agissant en *trans* peut contribuer à la formation de complexes d'une telle envergure. Or, des interactions à plusieurs niveaux d'organisation doivent être en œuvre pour échaffauder un complexe de cet ordre de grandeur. Une partie de la solution de cette énigme réside possiblement dans la formation de complexes quaternaires du transcrit lui-même, comme c'est le cas pour le transcrit de *bicoid*.

L'association avec les ribosomes ou des organites comme le RE peut aussi, du moins dans certains cas, expliquer la grande taille des granules de transport observées.

La dynamique de cet empaquetage demeure aussi inconnue. Récemment, une fonction pour le cytosquelette a été démontrée lors de la formation de granules de plusieurs transcrits (revu dans Bassell et al., 1999; Kohrmann et al., 1999). Il apparaît donc que le cytosquelette peut aussi être nécessaire pour recruter les facteurs nécessaires aux sites d'empaquetage.

### *3- Recrutement et transport sur l'axe cytosquelettique*

Pour distribuer de façon asymétrique les transcrits dans la cellule, il doit y avoir des structures ou des « pistes » qui en relient les différents compartiments. Pendant le transport de l'ARN, ce rôle est joué par le cytosquelette. Cette fantastique composante cellulaire, à la plasticité remarquable, assure plusieurs fonctions critiques dans le mécanisme de transport d'ARN. L'identité et les propriétés de gènes impliqués, des études de colocalisation avec les particules transportées, de même que les expériences pharmacologiques supportent fortement la fonction multipartite du cytosquelette.

La nature de cette implication commence aujourd'hui à être mieux comprise avec l'identification de moteurs impliqués dans le transport de plusieurs transcrits. Outre ceux présentés dans le cadre du transport des transcrits de *bicoid* et d'*oskar*, un moteur récemment impliqué dans une telle fonction est la protéine She1p/Myo4a, qui joue un rôle critique dans le transport du transcrit d'ASH1 chez *S. cerevisiae*. Cette protéine interagit directement avec She3p qui, avec She2p, reconnaît directement les éléments de transport du transcrit d'*ASH1* (Long et al., 2000). Le complexe se meut



ainsi sur les microfilaments d'actine. Le modèle suggéré propose donc que le RNP assemblé soit associé avec un moteur permettant de fournir la force motrice pour le mouvement le long de l'axe cytosquelettique. Pour plusieurs transcrits, ce recrutement se fait en plusieurs étapes et peut même impliquer des composantes distinctes de cytosquelette et probablement aussi différents moteurs.

#### *4- Ancrage*

Le transport d'un transcrit implique, en sa dernière étape, son ancrage. Encore une fois à ce niveau, notre modèle implique une contribution du cytosquelette. Or, les interactions qui régissent l'ancrage peuvent être complètement distinctes de celles réalisant le transport actif du transcrit. C'est le cas, par exemple, pour le transcrit de *Vgl*. L'équipe de J. Yisraeli (Yisraeli et al., 1989; Yisraeli et al., 1990) a démontré que le transport de ce transcrit vers le pôle végétal de l'ovocyte de xénope était effectué en deux étapes qui exigent une contribution de composantes distinctes du cytosquelette. Dans ce système, une première étape, celle du transport, est dépendante des microtubules, alors que l'étape d'ancrage met plutôt en œuvre les microfilaments.

#### *5- Traduction locale et contrôle traductionnel*

Nous avons examiné l'importance de la coordination du contrôle traductionnel du transcrit d'*oskar* et de son transport au pôle postérieur de l'ovocyte. Le contrôle traductionnel d'un transcrit transporté implique donc, en principe, des signaux en *cis* et des déterminants en *trans* qui permettent, d'une part une répression du transcrit pendant le transport et d'autre part, une dérèglement au moment et à

l'endroit où l'expression est essentielle à la fonction. Bien que la nécessité de ces événements est en principe évidente pour réaliser l'expression localisée de l'ARNm, peu d'éléments et de facteurs impliqués ont été identifiés. Pour cette fonction, Staufen chez la drosophile demeure probablement la protéine la mieux caractérisée.

Un niveau supplémentaire de coordination entre la localisation de transcrits et leur traduction est réalisé par la ségrégation, dans certains sous-domaines du cytoplasme, de facteurs de traduction. EF1 $\alpha$  est ainsi retrouvé dans les fibroblastes, à des sites où les microfilaments d'actine s'entrecroisent (Jansen, 1999). Ce facteur a aussi été retrouvé dans les granules purifiés du transcrit de la MBP (Barbarese et al., 1995), suggérant que des facteurs de traduction peuvent aussi être transportés avec les transcrits jusqu'à leur destination finale. Enfin, comme nous le verrons bientôt, dans le système nerveux il est suggéré que même les ribosomes peuvent voyager jusqu'à des sites isolés de cytoplasme.

### **Le transport de l'ARN dans le système nerveux**

#### *Hypothèse : Implication du transport de l'ARN dans l'établissement de la mémoire*

Dans le dernier volet de mon introduction, je présenterai brièvement une fonction biologique fascinante pour laquelle le transport d'ARN suscite de plus en plus d'intérêt : la plasticité neuronale. Une percée majeure dans les travaux visant à comprendre l'établissement de la mémoire fut réalisée lorsque des expériences démontrèrent que la synthèse de nouvelles biomolécules était nécessaire à l'établissement de certaines formes cellulaires de mémoire. En fait, il est présentement admis que la modulation de la force synaptique entre deux neurones et

son maintien dépendent d'une synthèse finement régulée de nouveaux facteurs. Plus récemment, plusieurs approches ont démontré premièrement, que l'appareil traductionnel était présent dans les terminaisons post-synaptiques (dendrites) des neurones et deuxièmement, qu'il pouvait y avoir synthèse locale de protéines. En fait, d'autres travaux ont même établi que la synthèse locale de protéines dans les terminaisons dendritiques est nécessaire à l'établissement d'une forme cellulaire de mémoire appelée « *Long Term Potentiation* » ou LTP.

Comment l'appareil traductionnel est-il transporté jusqu'aux sites très distants de sa fonction, à la synapse? Comment et quand la traduction essentielle pour une modulation durable de la réponse synaptique est-elle enclenchée? Finalement, une question particulièrement pertinente à nos travaux : comment les transcrits qui sont traduits localement aux synapses y sont-ils localisés?

À toutes ces questions, très peu de réponses pour le moment, du moins du point de vue mécanistique. Mais pour ce qui est de la dernière question, une partie de la réponse semble clairement venir du transport cytoplasmique d'ARN (pour une revue, voir Kiebler et DesGroseillers, 2000 et Steward et Schuman, 2001). La localisation de nombreux transcrits dans les prolongements dendritiques fut décrite au cours des dernières années. Une liste des transcrits localisés dans les dendrites est présentée dans le tableau 1. La fonction exacte est connue pour peu d'entre eux, mais au moins quelques-uns jouent un rôle dans l'établissement de la LTP. Un exemple célèbre de cette implication est la localisation du transcrit de la  $\alpha$ CamKII. Des éléments de localisation furent identifiés dans la portion 3'UTR de ce transcrit qui permettent à un gène rapporteur d'être localisé aux terminaisons dendritiques.

**TABLE 1** mRNAs that have been shown to be localized within dendrites of neurons in vivo by in situ hybridization

mRNA	Cell type	Localization in dendrites	Class of protein
MAP2 <sup>a</sup>	Cortex, hippocampus, dentate gyrus	Proximal 1/3 – 1/2	Cytoskeletal
CAMII kinase <sup>b</sup> alpha subunit	Cortex, hippocampus, dentate gyrus	Throughout	Membrane-associated postsynaptic density
Arc/Arg 3.1 <sup>c</sup>	Cortex, hippocampus, dentate gyrus depending on inducing stimulus	Throughout (when induced)	Cytoskeleton-associated
Dendrin <sup>d</sup>	Hippocampus, dentate gyrus, cerebral cortex	Throughout	Putative membrane
G-protein <sup>e</sup> gamma subunit	Cortex, hippocampus, dentate gyrus, striatum	Throughout	Membrane-associated
Calmodulin <sup>f</sup>	Cortex, hippocampus, Purkinje cells	Proximal-middle (during synaptogenesis)	Cytoplasm- and membrane-associated
NMDAR1 <sup>g</sup>	Dentate gyrus	Proximal-middle?	Integral membrane
Glycine receptor <sup>h</sup> alpha subunit	Motoneurons	Proximal	Integral membrane
Vasopressin <sup>i</sup>	Hypothalamohypophyseal	Proximal-middle	Soluble
Neurofilament protein 68 <sup>j</sup>	Vestibular neurons	Proximal-middle	Cytoskeletal
InsP3 receptor <sup>k</sup>	Purkinje cells	Throughout (concentrated proximally)	Integral membrane (endoplasmic reticulum)
L7 <sup>l</sup>	Purkinje cells	Throughout	Cytoplasmic?
PEP19 <sup>l</sup>	Purkinje cells	Proximal one third	Cytoplasmic

Not shown are mRNAs that are localized only in the most proximal segments.

<sup>a</sup> Garner et al 1988.

<sup>b</sup> Burgin et al 1990.

<sup>c</sup> Link et al 1995, Lyford et al 1995.

<sup>d</sup> Herb et al 1997.

<sup>e</sup> Watson et al 1994.

<sup>f</sup> Berry & Brown 1996.

<sup>g</sup> Gazzaley et al 1997.

<sup>h</sup> Racca et al 1997.

<sup>i</sup> Prakash et al 1997.

<sup>j</sup> Paradies & Steward 1997.

<sup>k</sup> Furuichi et al 1993.

<sup>l</sup> Bian et al 1996.

La fonction précise de la protéine encodée dans la mémoire est pour le moment inconnue, mais l'ablation génique (K.O.) du gène de la  $\alpha$ CamKII crée un déficit dans le processus d'apprentissage chez la souris (Silva et al., 1992).

Le transport et la traduction locale de transcrits sont donc importants pour l'établissement de la mémoire. Or, au moment de commencer les travaux de cette thèse, les facteurs agissants en *trans* dans ces phénomènes et leurs mécanismes d'action exacts étaient particulièrement nébuleux.

## **HYPOTHÈSE DE TRAVAIL**

L'hypothèse à l'origine des travaux entrepris dans cette thèse fut à la fois fondée sur la conservation des événements du transport cytoplasmique de l'ARN, sur l'utilisation de Staufen dans divers exemples de transport de transcrits chez la drosophile et sur les propriétés particulièrement compatibles de cette protéine avec ce mécanisme. Elle peut simplement être énoncée comme suit : **si les événements du transport d'ARN peuvent être observés dans une si grande variété de types cellulaires et d'organismes, les molécules impliquées dans ce mécanisme doivent être, elles aussi, préservées au cours de l'évolution.** Depuis le début de nos travaux, un fort appui pour cette hypothèse est venu de la découverte de la conservation des protéines Vg1-RBP/Vera et ZBP1. Or, nous visions à répondre plus précisément à la question : **Staufen remplit-elle la même fonction de facteur agissant en *trans* sur le transport et/ou de régulateur traductionnel, chez les mammifères?**

## RÉSULTATS

**ARTICLE 1 : MAMMALIAN STAUFEN IS A DOUBLE-STRANDED RNA- AND TUBULIN-BINDING PROTEIN WHICH LOCALIZES TO THE ROUGH ENDOPLASMIC RETICULUM**



### **Mise en contexte**

Au moment de débiter ces travaux, Staufén chez *Drosophila* était la seule protéine à laquelle fut attribuée une implication directe dans le transport cytoplasmique d'ARN. Notre intérêt s'est donc porté sur l'identification d'un homologue chez les mammifères dans l'optique de déterminer l'importance de ce processus chez les mammifères et d'en élucider les mécanismes. Cet article présente le clonage et la caractérisation moléculaire de ce premier homologue.

**Note**

-Contribution de chacun des auteurs :

T. Duchaine : Clonage et séquençage de l'homologue murin de Stau1, cartographie des déterminants de liaison à l'ARNdb et à la tubuline, caractérisation de la liaison à l'ARN.

L. Wickham : Clonage et séquençage de l'homologue humain de Stau1, caractérisation des transcrits et essais d'immunobuvardage.

M. Luo : Étude de microscopie et confocale.

I. R. Nabi : Aide en microscopie.

L. DesGroseillers : Supervision générale, recherche en base de données.

\*Contribution égale des deux premiers auteurs, tel que mentionné à la section *Acknowledgments*.

Article publié dans *Mol Cell Biol* (1999) 19, 2220-2230.

## Mammalian Staufen Is a Double-Stranded-RNA- and Tubulin-Binding Protein Which Localizes to the Rough Endoplasmic Reticulum

LOUISE WICKHAM,<sup>1</sup> THOMAS DUCHAÎNE,<sup>1</sup> MING LUO,<sup>1</sup> IVAN R. NABI,<sup>2</sup> AND LUC DESGROSEILLERS<sup>1\*</sup>

*Departments of Biochemistry<sup>1</sup> and Pathology and Cell Biology,<sup>2</sup> University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7*

Received 9 September 1998/Returned for modification 23 October 1998/Accepted 17 November 1998

**Staufen (Stau) is a double-stranded RNA (dsRNA)-binding protein involved in mRNA transport and localization in *Drosophila*. To understand the molecular mechanisms of mRNA transport in mammals, we cloned human (*hStau*) and mouse (*mStau*) *staufen* cDNAs. In humans, four transcripts arise by differential splicing of the *Stau* gene and code for two proteins with different N-terminal extremities. In vitro, hStau and mStau bind dsRNA via each of two full-length dsRNA-binding domains and tubulin via a region similar to the microtubule-binding domain of MAP-1B, suggesting that Stau cross-links cytoskeletal and RNA components. Immunofluorescent double labeling of transfected mammalian cells revealed that Stau is localized to the rough endoplasmic reticulum (RER), implicating this RNA-binding protein in mRNA targeting to the RER, perhaps via a multistep process involving microtubules. These results are the first demonstration of the association of an RNA-binding protein in addition to ribosomal proteins, with the RER, implicating this class of proteins in the transport of RNA to its site of translation.**

It is now believed that the cytoskeleton is widely used to transport mRNAs between their transcription and processing sites in the nucleus and their translation and degradation sites in the cytoplasm (3, 42, 44). One consequence of the interaction between mRNAs and the cytoskeleton is to promote differential localization and/or transport of mRNAs in subcellular compartments. Indeed, examples of mRNA targeting have been observed in both germinal and somatic cells throughout the animal kingdom (51, 55, 63). The universal use of this mechanism is also apparent when we consider the nature of the proteins which are coded by the transported mRNAs; asymmetric localization involving mRNAs coding for cytosolic, secreted, membrane-associated, or cytoskeletal proteins have all been reported. Localization of mRNAs in the cytoplasm is now considered an essential step in the regulation of gene expression and an efficient way to unevenly distribute proteins in polarized cells. In general, it is believed that mRNA localization is used to determine and/or regulate local sites of translation (46, 51, 55). Indeed, ribosomes and many translational cofactors were found in association with the cytoskeletal elements, preventing both mRNAs and translation factors from being diluted by the cellular fluid (44). Transport and local translation of specific mRNAs have been shown to play an important role in processes such as learning and memory (38), synaptic transmission (9, 22, 26, 51, 61), axis formation during development (reviewed in reference 55), cell motility (30), and asymmetric cell division (7, 36, 37, 56).

The mechanisms underlying mRNA localization are not yet fully understood, mainly because of the lack of information on the principal constituents of the ribonucleoprotein (RNP) complexes involved in this process. Nevertheless, it is known to involve both *cis*-acting signals in mRNA and *trans*-acting RNA-

binding proteins which bind to this signal (55). The signals that allow mRNAs to be recognized as targets for transport and then to be localized have been mapped within their 3' untranslated regions (UTRs) (55, 63). In contrast, the nature of the RNA-binding proteins is still obscure. Recently, a 68-kDa protein which binds the  $\beta$ -actin mRNA zipcode localization domain was isolated and its transcript was cloned from chicken cDNA libraries (47). This protein, which binds to microfilaments, contains RNA-binding domains (RBDs) which share strong sequence similarities with the RNP and KH motifs. In addition, 69- and 78 kDa proteins in *Xenopus laevis* oocyte extracts have been shown to bind to the localization signal of *Vg1* mRNA (12, 50). While the 69-kDa protein was shown to bind microtubules (15), the 78-kDa Vera protein colocalized with a subdomain of the smooth endoplasmic reticulum (SER) (12). Surprisingly, molecular cloning of the two proteins revealed that they are identical and are similar to the chicken zipcode-binding protein (13, 23).

Genetic and molecular studies have shown that the activity of the *staufen* gene product in *Drosophila* is necessary for the proper localization of *bicoid* and *oskar* mRNAs to the anterior and posterior cytoplasm of oocytes, respectively, and of *prospero* mRNA in neuroblasts (7, 16, 28, 36, 52, 53). *Staufen* (Stau), a member of the double-stranded RNA (dsRNA)-binding protein family, contains (i) three copies of a domain consisting of a 65- to 68-amino-acid consensus sequence which is required to bind RNAs having double-stranded secondary structures and (ii) two copies of a short domain which retains the last 21 amino acids at the C-terminal end of the complete motif (53, 54). In vitro, it has been demonstrated that Stau binds directly to *bicoid* and *prospero* mRNAs (36, 54). However, since Stau seems to bind to any dsRNA in vitro, it is not clear whether it binds directly to these RNAs in vivo or needs cellular cofactors which make up part of a larger RNP complex to localize each mRNA. Many experiments have demonstrated that the localization of *oskar*, *prospero*, and *bicoid* mRNAs

\* Corresponding author mailing address: Department of Biochemistry, University of Montreal, P.O. Box 6128, Station Centre Ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7. Fax: (514) 343-2210. E-mail: [REDACTED]

occurs through a multistep mechanism of active transport that is dependent on elements of the cytoskeleton (7, 17, 45, 55, 58).

To understand the mechanisms of mRNA transport in mammals and determine the nature of both the RNAs and proteins in the RNA-protein complexes, we began the cloning of the human and mouse *stau* (*hStau* and *mStau*) cDNAs and the characterization of their encoded proteins. Recently, we showed by both Southern blot analysis of human DNA and fluorescent in situ hybridization on human chromosomes in metaphase that the human gene is present as a single copy in the human genome and is localized in the middle of the long arm of chromosome 20 (11). We now report the sequence of the *hStau* and *mStau* and show that the transcript is found in all tested tissues. We further demonstrate that *Stau* binds both dsRNA and tubulin in vitro via specific binding domains. *Stau* is also shown to be present in the cytoplasm in association with the rough endoplasmic reticulum (RER), implicating this protein in the targeting of RNA to its site of translation.

## MATERIALS AND METHODS

**Molecular cloning and sequencing of the cDNAs.** To clone an *hStau* homologue, we searched the GenBank database with *Drosophila* dsRBD sequences to find consensus sequences and eventually design degenerate oligonucleotide primers for reverse transcription (RT)-PCR. However, searching in the expressed sequence tag database identified a partial sequence, clone HFBDQ83 (GenBank accession no. T06248), with high homology to the *Drosophila* sequence. This clone was purchased from the American Type Culture Collection and used as a probe to screen both human brain (Clontech) and fetal total mouse (a generous gift from A. Royal) cDNA libraries as described previously (62). DNA from the isolated  $\lambda$ gt10 clones was subcloned into a pBluescript vector (Stratagene). Double-stranded DNA (dsDNA) was sequenced by the dideoxynucleotide method according to Sequenase protocols (United States Biochemical Corp.).

**Construction of fusion proteins.** The 1.2-kbp *Bam*HI fragment of the human HFBDQ83 cDNA was subcloned in frame in either pQE32 (Qiagen) or pMAL-c (New England Biolabs), thus generating the protein fused to a hexahistidine tag or to the maltose-binding protein (MBP), respectively. The protein was expressed in bacteria by induction with isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) as recommended by the manufacturer.

Full-length and internal fragments of the *mStau* protein were PCR amplified and cloned into pMal-c to produce MBP fusion proteins. For the expression of the internal domains, which do not contain an endogenous stop codon, the PCR fragments were cloned in a modified pMal-c vector (pMal-stop) in which stop codons were introduced at the *Hind*III site, by the ligation of the annealed complementary oligonucleotides 5'-AGCTTAATTAGCTGAC-3' and 5'-AGC TGTCAGCTAATTA-3'. The MBP-*mStau* fusion protein, containing the full-length *mStau* sequence, was generated by PCR amplification with Vent DNA polymerase (New England BioLabs), using the primer pair 5'-CCTGGATCCG AAAGTATAGCTTACCATTTG-3' plus 5'-TACATAAGCTTCTAGATGG CAGAAAAGTTTACGCA-3'. The resulting 1,562-bp fragment was digested with *Hind*III and *Bam*HI and ligated in the pMal-c vector. The C-terminal fragment (*mStau*-C) was amplified with the primer pair 5'-GGATGAATCCTA TTAGTAGACTTGCAC-3' plus 5'-TACATAAGCTTCTAGATGGCCAGAA AAGTTTACGCA-3', digested with *Hind*III, and cloned in the *Eag*I\* and *Hind*III sites of pMal-c. *Eag*I\* was created by filling in the cohesive ends of *Eag*I-digested pMal-c vector, using the Klenow fragment of DNA polymerase I. This fusion vector was then digested with *Sac*I and *Eco*RI, and the resulting fragment was subcloned in the pMal-stop vector to generate the *mStau*-RBD3 construct. The *mStau*-tubulin-binding domain (TBD) construct was prepared by PCR using the primer pair 5'-GCTCTAGATTCAAAGTCCCAGGCGCA G-3' plus 5'-TTAAGCTTCTCAGAGGGTCTAGTGCGAG-3'; the product was digested with *Xba*I and *Hind*III and cloned in the pMal-stop vector. *mStau*-RBD2 and *mStau*-RBD1 were constructed by first amplifying a fragment using the primer pair 5'-CAATGTATAAGCCCGTGGACCC-3' and 5'-AAAAAGC TTGTGCAAGTCTAATAGGATTCATCC-3'. The resulting product was digested with *Hind*III and cloned in the *Eag*I\* and *Hind*III sites of the pMal-stop vector. This vector was then used to purify the 398-bp *Pst*I and *Hind*III fragment, which was subcloned in the pMal-stop vector to generate the *mStau*-RBD2 construct. In the same way, the *mStau*-RBD1 vector was obtained by digestion with *Sma*I and *Stu*I, followed by recircularization of the digestion product using T4 DNA ligase. The *mStau*-RBD4 was PCR amplified by using the primer pair 5'-ATAGCCCGAGAGTTGTTG-3' plus 5'-TACATAAGCTTCTAGATGGC CAGAAAAGTTTACGCA-3'. The resulting fragment was digested with *Hind*III and ligated in the pMal-stop vector at the *Stu*I and *Hind*III sites. All MBP-*Stau* fusion plasmids were transformed in BL-21 *Escherichia coli*. The fusion proteins were obtained after induction with 1 mM IPTG for 2 to 3 h. Cells

were lysed in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) loading buffer for immediate use, or frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for storage.

**Antibody production and Western blotting.** For the production of antibodies, a large amount of the His-*hStau* fusion protein was purified on Ni-nitrilotriacetic acid (NTA) resin (Qiagen) as recommended by the manufacturer and injected into rabbits as done previously (2). For Western blotting, cells were lysed in 1% *n*-octylglucoside-1 mM phenylmethylsulfonyl sulfoxide- $\alpha$ -proteasin (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )-pepstatin A (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in phosphate-buffered saline (PBS). Protein extracts were quantified by the Bradford method (Bio-Rad), and similar amounts of proteins were separated on SDS-10% polyacrylamide gels and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked for 30 min in TBS (Tris-buffered saline; 10 mM Tris [pH 8.0], 150 mM NaCl)-5% dry milk and incubated with primary antibodies in TBS-0.05% Tween for 1 h at room temperature. Detection was accomplished by incubating the blots with peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) antibodies (Dimension Labs) followed by Supersignal Substrate (Pierce) as recommended by the manufacturer.

**RNA-binding assay.** Bacterial extracts from IPTG-induced cultures were separated on SDS-10% polyacrylamide gels and the proteins were transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were incubated in the presence of  $^{32}\text{P}$ -labeled RNA probes in 50 mM NaCl-10 mM  $\text{MgCl}_2$ -10 mM HEPES (pH 8.0)-0.1 mM EDTA-1 mM dithiothreitol-0.25% milk for 2 h at room temperature, washed in the same buffer for 30 min, and exposed for autoradiography. For competition assays, a 100- to 1,000-fold excess of cold homopolymers (Pharmacia) was added to the hybridization mixture along with the labeled probe. The 3' UTR of *bicoid* cDNA (positions 4016 to 4972), which was PCR amplified from *Drosophila* genomic DNA and subcloned in the pBluescript vector, was transcribed by using T7 RNA polymerase in the presence of  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{CTP}$ . Synthetic RNAs (Pharmacia) were labeled with T4 polynucleotide kinase in the presence of  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ . The specific activities of the *bicoid* and synthetic RNA probes were  $1.4 \times 10^6$  and  $0.5 \times 10^6$  cpm/ $\mu\text{g}$ , respectively.

For RNA-binding assay in solution, dilutions of the purified human His-*Stau* fusion protein were incubated with in vitro-labeled *bicoid* RNA (3' UTR), poly(rI)-poly(rC), poly(rI), or poly(rC) (20,000 cpm; specific activity,  $10^6$  cpm/ $\mu\text{g}$ ) in 10 mM  $\text{MgCl}_2$ -50 mM NaCl-0.1 mM EDTA-1 mM dithiothreitol-10 mM HEPES (pH 8.0) for 30 min at room temperature. The RNA-protein complexes were then filtered through a nitrocellulose membrane (0.45- $\mu\text{m}$  pore size), washed, and counted. Analyses were done with the Graph Pad PRISM (version 2.01) software.

**Tubulin-binding assay.** Bacterial extracts from IPTG-induced cultures were separated on SDS-10% polyacrylamide gels, and the MBP-tagged proteins were transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were incubated in TBS-1% Tween 20 for 45 min prior to an overnight overlay with tubulin (7  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Sigma) in TBS-0.2% Tween 20. Blots were washed several times in TBS-0.2% Tween 20 and then incubated with a mixture of mouse monoclonal anti- $\alpha$ - and anti- $\beta$ -tubulin antibodies (ICN). Bound antibodies were detected with secondary peroxidase-conjugated anti-mouse IgG antibodies (Dimension Labs) and Supersignal substrate (Pierce) as stated previously. Separate assays were performed with actin and antiaxin antibodies (both from Sigma).

**Immunofluorescence.** *hStau*-hemagglutinin (HA) and *hStau*-green fluorescent protein (GFP) were constructed by PCR amplification of the full-length cDNA, using the primer pair 5'-TACATGTCGACTTCTCTGCCA/GGGCTGC GGG-3' plus 5'-TACAATCTAGATTATACAGCGCCGACCTCCACACA CAGACAT-3'. The 3' primer was synthesized with a *Not*I site just upstream from the stop codon allowing ligation of a *Not*I cassette containing either three copies of the HA tag or the GFP sequence. The resulting fragment was cloned in pBluescript following digestion with *Sa*I and *Xba*I. The *Kpn*I/*Xba*I fragment was then subcloned in the pCDNA3/RSV vector (25), and a *Not*I cassette was introduced at the *Not*I site. For the TBD-GFP fusion protein, the TBD was PCR amplified with oligonucleotides on each side of this region (5'-TACATAAGCT TAAGCCACCATGGTCAAAGTTCCCAGGCGC-3' and 5'-TACAATCTA GAGCGCCGCGCTCAGAGGGTCTAGTGCGAG-3'). The sense primer contained an ATG initiation codon and the Kozak consensus sequence upstream from the TBD sequence. The antisense primer contained a *Not*I site just upstream from a stop codon. The resulting fragment was digested with *Hind*III and *Xba*I and cloned into the pCDNA3/RSV vector. The GFP *Not*I cassette was then introduced at the *Not*I site.

Mammalian cells were transiently transfected with the cDNAs by the calcium phosphate precipitation technique, fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 25 min at room temperature, and permeabilized with 0.3% Triton X-100 in PBS containing 0.1% bovine serum albumin (BSA). The cells were then blocked with 1% BSA in PBS-0.3% Triton X-100 and incubated with mouse anti-HA, rabbit anticalnexin, or rabbit anticalnexin antibodies for 1 h at room temperature, as indicated. Cells were washed in permeabilization buffer and incubated with fluorescein-conjugated or Texas red-conjugated species-specific secondary antibodies (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, Pa.) in blocking buffer for 1 h. GFP and GFP fusion proteins were detected by autofluorescence. Mounting was done in ImmunoFluor mounting medium (ICN). For the analysis of cytoskeleton-associated proteins, transfected cells were first extracted in 0.3% Triton X-100-130 mM HEPES (pH 6.8)-10 mM EGTA-20 mM  $\text{MgSO}_4$  for 5 min at  $4^{\circ}\text{C}$  as previously described (10). They were then fixed in 4% paraformaldehyde in PBS and processed for immunofluorescence as described above.



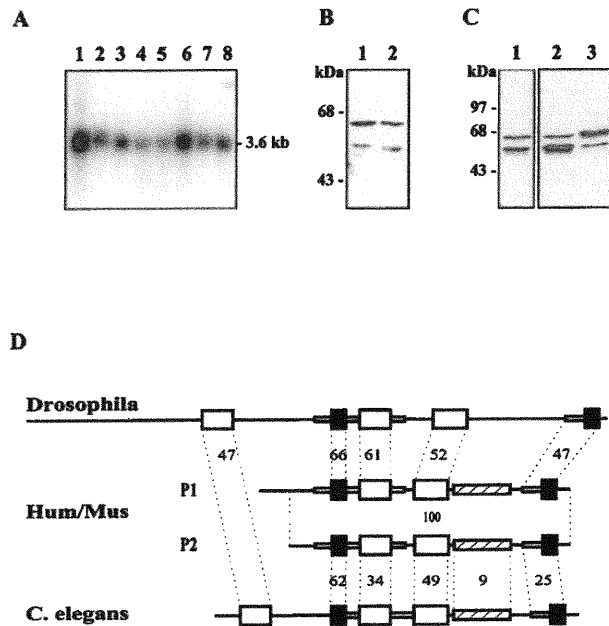


FIG. 2. Characterization of the *hStau* mRNA and proteins. (A) Northern blot analysis of *hStau* expression in human tissues. A human multiple-tissue Northern blot (Clontech) was hybridized with the 1.2-kbp *Bam*HI fragment of *hStau* cDNA. Lane 1, brain; lane 2, pancreas; lane 3, heart; lane 4, skeletal muscles; lane 5, liver; lane 6, placenta; lane 7, lung; lane 8, kidney. (B) Western blot experiment with anti-*hStau* antibodies. Lane 1, HeLa cell extracts; lane 2, HEK 293 cell extracts. (C) HEK 293 cells were transfected with cDNAs coding for either the short (lane 2) or the long (lane 3) *hStau* isoform, lysed, and analyzed by Western blotting using the anti-*hStau* antibodies. Mock-transfected cells are shown in lane 1. (D) Schematic representation of the *Drosophila* (accession no. M69111), human and mouse (Hum/Mus), and *C. elegans* (accession no. U67949) *Staufen* proteins. The human protein P1 has an insertion of 81 amino acids at its N-terminal extremity compared to protein P2. Large open and black boxes represent the full-length and short dsRBDs, respectively. Small boxes and lines are regions of high and low sequence similarity, respectively. The hatched boxes indicate the position of the region which is similar to the MAP1B microtubule-binding domain. The percentage of identity between the domains of the human and invertebrate proteins is indicated.

Cells were visualized by immunofluorescence, using the 63 $\times$  planApochromat objective of a Zeiss Axioskop fluorescence microscope.

Confocal microscopy was performed with the 60 $\times$  Nikon Plan ApoChromat objective of a dual-channel Bio-Rad 600 laser scanning confocal microscope equipped with a krypton-argon laser and the corresponding dichroid reflectors to distinguish fluorescein and Texas red labeling. No overlap was observed between the fluorescein and Texas red channels. Confocal images were printed with a Polaroid TX1500 video printer.

**Nucleotide sequence GenBank accession numbers.** The human and mouse sequences were deposited in the GenBank database under accession no. AF061938, AF061939, AF061940, and AF061941 (human) and AF061942 (mouse).

## RESULTS

**Molecular cloning of mammalian *staufen* cDNAs.** To understand the mechanism of mRNA transport in mammalian cells, we cloned the human and mouse *staufen* homologues. Thirteen overlapping human cDNAs, ranging in size between 0.8 and 2.5 kb, were isolated from a human central nervous system cDNA library, using the expressed sequence tag HFBDO83 cDNA as a probe (Fig. 1). Purified human HeLa cell poly(A)<sup>+</sup> RNAs were also reverse transcribed and PCR amplified, using different 5' RACE (rapid amplification of 5' cDNA ends) protocols, allowing us to clone the 5' end of the transcript. Two different cDNAs of 3,217 and 3,506 nucleotides were identified from overlapping clones (see below). One of the human cD-

NAs was then used to screen a fetal total mouse cDNA library under low-stringency conditions, which led to the isolation of a full-length cDNA (*mStau*). The human and mouse proteins are 90% identical (98% similarity).

Hybridization of a human multiple-tissue Northern blot with a human cDNA reveals that *hStau* mRNA is found in every tested tissue (Fig. 2A), unlike the *Drosophila staufen* gene, which is exclusively expressed in oocytes and in the central nervous system at the larval stage (53). The size of the cDNAs is close to that of the transcripts, which migrate on a Northern blot as an unresolved large band of around 3.6 kb.

**A differential splicing event generates two *hStau* proteins.** Characterization of the human cDNAs revealed the presence of two types of transcripts which differ only by an insertion of 289 bp at position 324 (T2 and T3 in Fig. 1). To confirm this result and determine the relative expression of the two classes of transcripts, we used RT-PCR to amplify the region of the transcript which overlaps the site of insertion. Unexpectedly, four different fragments were amplified. Cloning and sequencing of the fragments revealed that two correspond to the cDNA sequences (Fig. 1). Compared to the smallest cloned cDNA sequence (T2), a third fragment (T4) has an insertion of 132 bp at position 249, which corresponds to an *Alu* Sq sequence in an inverted orientation, while the other one (T1) has a deletion of 75 bp between positions 249 and 324. Within a single tissue, the four bands are not expressed at the same level, T2 being the most abundant. However, from one tissue to the other, the relative ratios of the four bands are roughly the same (not shown).

Translation of the cDNAs suggests that three of the four transcripts (T1, T2, and T4) may give rise to a protein of 55 kDa. Interestingly, the DNA insertion in transcript T3 introduces an ATG initiation codon upstream from the first one found in the other transcripts (Fig. 1). This finding suggests that a second putative protein of 63 kDa, exhibiting an 81-amino-acid extension at its N-terminal extremity compared to the other protein, may be translated. Using anti-*hStau* antibodies in Western blot experiments, we observed two protein bands of around 63 and 55 kDa in human cell extracts (Fig. 2B). To determine whether our cDNAs could account for the presence of the two proteins, we subcloned the T2 and T3 transcripts in an expression vector and expressed them in mammalian cells. As seen in Fig. 2C, each cDNA gives rise to a single overexpressed protein which perfectly comigrates with one of the endogenous proteins. Altogether, these results demonstrate that the *hstaufen* gene produces four different transcripts and that the transcripts code for two highly homologous proteins which differ in their N-terminal extremities.

**Comparison of the mammalian and *Drosophila* *Staufen* proteins.** The amino acid sequences of the mammalian proteins are similar to that of the *Drosophila* *Staufen* protein and of the product of an uncharacterized open reading frame on the X chromosome of *Caenorhabditis elegans* (Fig. 2D). The overall structures and relative positions of the full-length and short RBDs are well conserved, and high sequence identity is found between corresponding dsRBDs. This is highly significant since an alignment of the domains found in the members of the dsRNA-binding protein family shows an average of only 29% amino acid identity to one another (54). In addition, domains 1 and 4 in the human sequence, which are short domains compared to the consensus, are nevertheless highly similar to the corresponding fly sequences, even in the region that extends far beyond the N-terminal side of the consensus sequence, suggesting that they must play an essential role in *Staufen* function.

Mammalian *Staufen* does not contain the first dsRBD or the

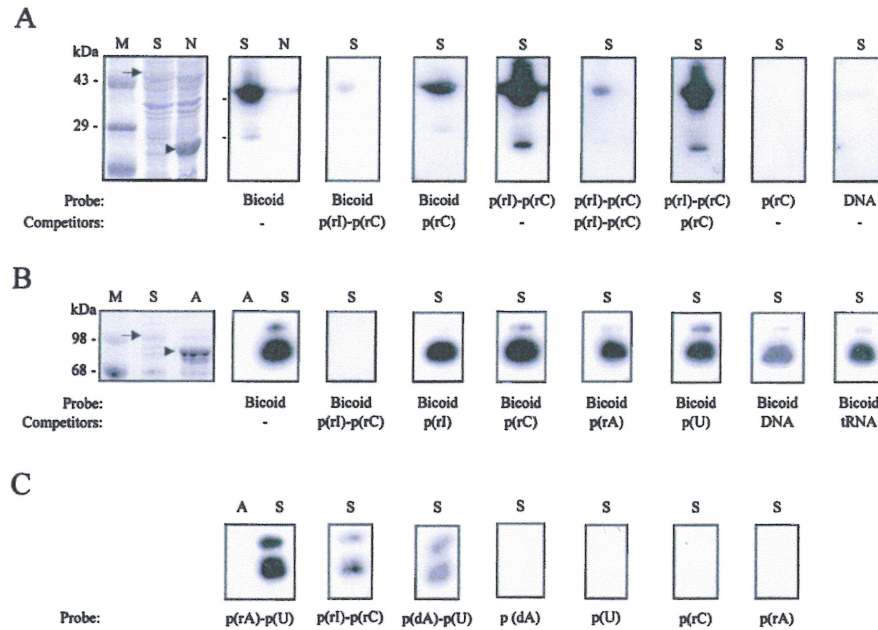


FIG. 3. RNA-binding assay. Bacterially expressed His-hStau (A, lanes S) and His-neutral endopeptidase (A, lane N) fusion proteins or bacterially expressed MBP-mStau (B and C, lanes S) or MBP-aminopeptidase (B and C, lanes A) fusion proteins were electrophoresed on a polyacrylamide gel, transferred to nitrocellulose, and incubated with  $^{32}\text{P}$ -labeled nucleic acids, in the presence or absence of cold competitors, as indicated below each gel. After extensive washing, binding was detected by autoradiography. A representative Coomassie blue staining of the blots is shown on the left (A and B). Arrows, positions of overexpressed Stau; arrowheads, positions of overexpressed control proteins. Lanes M, molecular weight markers.

long N-terminal sequence of the *Drosophila* protein which was shown to bind to oskar protein (5). In addition, a putative TBD located between the third and fourth dsRBDs of mammalian Stau is not found in the *Drosophila* protein, at least at the amino acid level. This region contains a stretch of 91 amino acids which show 25% amino acid identity (66% similarity) to a microtubule-binding domain of microtubule-associated protein 1B (MAP1B) (65). It is meaningful that the sequence similarity covers the full microtubule-binding domain of MAP1B and that it is restricted to this domain. Putative nuclear localization signals are also present.

**hStau and mStau bind dsRNAs.** As seen in Fig. 2D, mammalian Stau proteins contain multiple dsRBDs. To determine whether Stau binds RNAs, we used two bacterially expressed fusion proteins, His-hStau and MBP-mStau, in an RNA-binding assay. The fusion proteins were probed with in vitro-labeled *bicoid* mRNA, which is known to adopt an extensive secondary structure and to strongly bind to *Drosophila* Stau protein, both in vivo and in vitro (18, 54). Both fusion proteins strongly bind this RNA. The binding is competed by a 100-fold excess of cold poly(rI)-poly(rC) but not by a 1,000-fold excess of poly(rI), poly(rC), poly(rA), or poly(U) or by tRNA or dsDNA (Fig. 3A and B), suggesting that mammalian Stau recognizes double-stranded structures in the RNA rather than a sequence-specific region. Both fusion proteins also directly bind labeled dsRNAs and RNA-DNA hybrids but not single-stranded RNA or DNA homopolymers (Fig. 3A and C). As controls, bacterial extracts containing overexpressed His-neutral endopeptidase or MBP-aminopeptidase fusion proteins were also included on each blot; they did not bind any of these nucleic acids. We also tested other in vitro-labeled RNAs such as those coding for tubulin, neuropeptides from *Aphysia*, and nuclear RNP B. All of these RNAs bind to Stau in vitro, as reported previously for other members of the dsRNA-binding

protein family. This finding demonstrates that both hStau and mStau, regardless of the protein to which they are fused, are able to bind dsRNAs. However, there is no sequence specificity, as reported for other members of the dsRNA-binding protein family (21, 54, 55).

Filter binding assays, using Ni-NTA-purified His-hStau (inset), were used to determine the binding affinity of Stau (Fig. 4). High-affinity binding, with a  $K_d$  of about  $10^{-9}$  M, was observed when the 3' UTR of *bicoid* or double-stranded RNA was used as a probe (Fig. 4A). The resulting sigmoidal curves suggest that Stau cooperatively binds dsRNAs. In contrast, only low-affinity binding was observed with single-stranded RNAs, confirming that Stau specifically binds dsRNAs (Fig. 4B).

**hStau and mStau bind tubulin in vitro.** As described above, Stau contains a region which is similar to the microtubule-binding domain of MAP1B. To determine whether mammalian Stau can bind tubulin, bacterially expressed MBP-Stau fusion proteins were used in a tubulin-binding assay. As shown in Fig. 5, hStau binds tubulin in vitro. As a control, the bacterially expressed MBP-aminopeptidase fusion protein was also included on the blot; it did not show any tubulin-binding capability. Under the same conditions, hStau cannot bind actin (Fig. 5), which suggests that the binding of tubulin to Stau is specific. The same results were obtained with the MBP-mStau fusion protein (Fig. 6B, lane 1). Binding to mRNAs and microtubules are two of the characteristics expected of localizing proteins, making hStau and mStau very good candidates for mRNA transport and localization in mammals.

**Molecular mapping of the RBD and TBD.** To determine which Stau domain(s) is involved in RNA and/or tubulin binding, the MBP-mStau fusion protein was used to construct a series of deletion mutants (Fig. 6). The production and relative abundance of each fusion protein was first verified by Western blotting (not shown). Using the RNA-binding assay, we dem-

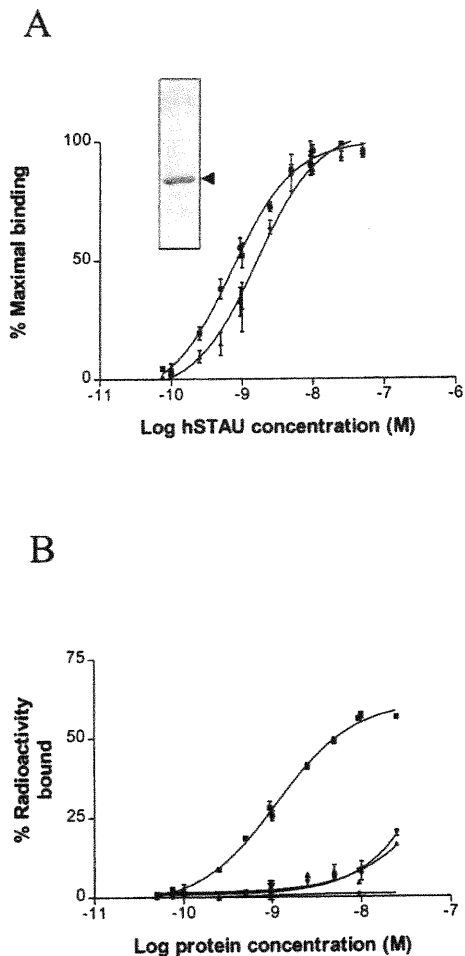


FIG. 4. RNA-binding assay in solution. Dilutions of the purified His-hStau fusion protein were incubated with fixed amounts of labeled RNAs, and the RNA-protein complexes were filtered through nitrocellulose membranes. (A) RNA-binding affinity to dsRNAs. Triangles, 3' UTR of *bicoid* RNA; squares, poly(rI)-poly(rC). The results are presented as a percentage of maximal retained probe and are the averages of three independent experiments done in duplicate. Inset, Coomassie blue staining of Ni-NTA-purified His/hStau after separation by SDS-PAGE. (B) RNA-binding affinity to RNAs. Squares, poly(rI)-poly(rC); triangles, poly(rI); inverted triangles, poly(rC); diamonds, BSA with poly(rI)-poly(rC), used as a control. The results are presented as a percentage of bound radioactivity and represent a single experiment done in duplicate. The same results were obtained in two other independent experiments.

onstrated that both of the full-size dsRBDs (dsRBD2 and dsRBD3) are independently sufficient to bind bicoid RNA (Fig. 6A). In contrast, the two short domains (dsRBD1 and dsRBD4) were unable to bind dsRNA in this assay. We also demonstrated that the C-terminal half of mStau is able to bind tubulin (Fig. 6B, lane 4). More specifically, the region which is similar to the MAP1B microtubule-binding domain is sufficient to bind tubulin (Fig. 6B, lane 6). These experiments confirm that the regions that we identified by sequence comparison as putative dsRBDs and TBDs are biochemically functional.

**Stau is associated with the detergent-insoluble fraction in vivo.** We next addressed the cellular distribution and cytoskeletal association of the two hStau proteins in vivo. To do so, we fused GFP or an HA tag to the 63- and 55-kDa hStau isoforms, respectively. Using confocal microscopy, we first showed that the two fusion proteins colocalize when coexpressed in mam-

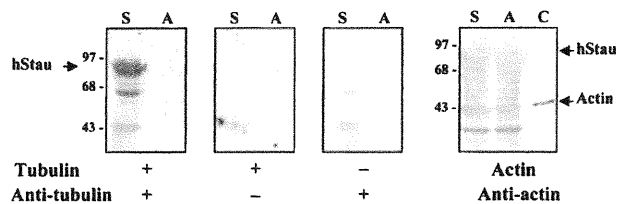


FIG. 5. Tubulin-binding assay. Bacterially expressed MBP-hStau (lanes S) or MBP-aminopeptidase (lanes A) fusion proteins were electrophoresed on SDS-polyacrylamide gels, transferred to nitrocellulose, and incubated with tubulin or actin. After extensive washing, tubulin and actin were detected with monoclonal anti-tubulin and antiactin antibodies, respectively. As controls, the same experiments were performed in the absence of either tubulin or anti-tubulin antibodies. Purified actin was also loaded on the gel as a control (lane C). Sizes are indicated in kilodaltons.

malian cells (not shown). Then, we showed that they are non-homogeneously distributed throughout the cytoplasm and label numerous vesicular and tubular structures which concentrate in the perinuclear region (Fig. 7A). Minimal staining was found in the nucleus. When the cells were treated with Triton X-100 prior to fixing, allowing soluble proteins to be separated from the cytoskeleton and cytoskeleton-associated proteins (44), the tubulovesicular labeling was still present, demonstrating that hStau is associated with the detergent-insoluble material in vivo (Fig. 7B). Labeled structures were also present in cell processes, suggesting that Stau may target mRNAs to peripheral ER elements. The same results were obtained following expression of the GFP-mStau protein (not shown). The association between hStau and the cytoskeletal-associated material was confirmed by in vitro cell fractionation in the presence of Triton X-100. In this assay, hStau partitioned mainly in the cytoskeleton-associated fractions, although a significant fraction was found in a soluble form, as judged by Western blotting (not shown).

To determine whether the tubulin-binding domain identified in vitro is truly involved in this function in vivo, we transfected mammalian cells with a cDNA coding for a fusion protein in which the minimal TBD was fused to GFP. In contrast to the full-length protein, the TBD-GFP fusion protein is randomly distributed in the cytoplasmic and nuclear domains of the cells (Fig. 7C), as is the GFP protein used as a control (Fig. 7D). This staining was completely extracted by the Triton X-100 treatment (not shown), suggesting that the minimal TBD found in vitro is not sufficient to render the protein insoluble and form a stable association with the microtubule network and/or the cytoskeleton-associated material.

**Stau localizes to the RER in vivo.** Interestingly, the pattern of localization of Stau resembles that of the ER. To test a putative localization of Stau to the ER, we transfected mammalian cells with a cDNA coding for a fusion protein in which a HA tag was introduced at the C-terminal end of the short hStau protein. We then double labeled transfected cells with anti-HA, to recognize hStau, and with anticalreticulin or anticalnexin, two markers of the ER. Using a confocal microscope, we showed that hStau completely colocalizes with anticalreticulin, although HA-staining appears to be absent in some parts of the ER, in particular around the nucleus (Fig. 8A to C). To confirm these results, we examined the colocalization of Stau and calnexin, a specific marker for the RER (24) (Fig. 8D to F). The patterns of staining obtained with anti-hStau and anticalnexin were identical, demonstrating that hStau colocalizes exclusively with the RER.



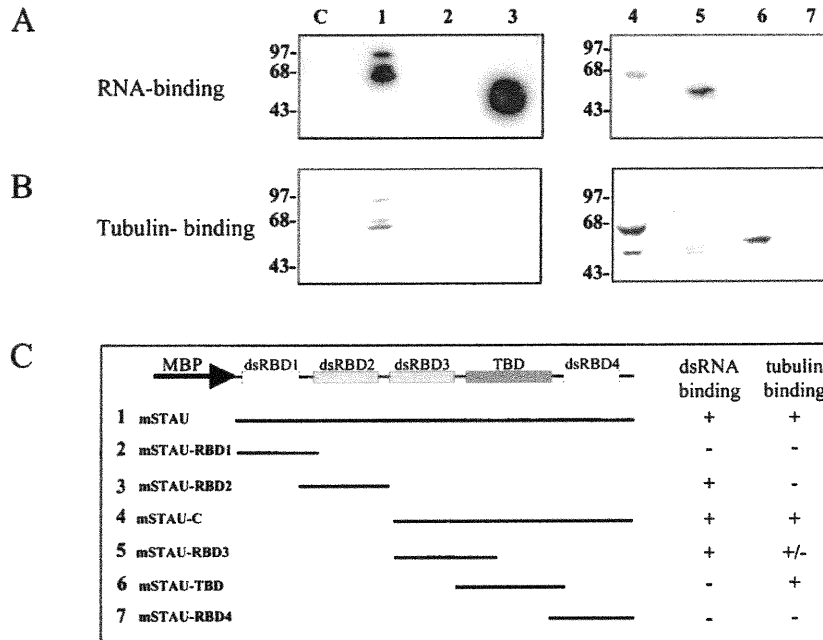


FIG. 6. Molecular mapping of the dsRBD and TBD. Bacterially expressed MBP-mStau (lanes 1), MBP-mStau deletion mutants (lanes 2 to 7), or MBP-aminopeptidase (lanes C) fusion proteins were electrophoresed on a polyacrylamide gel, transferred to nitrocellulose, incubated with either  $^{32}\text{P}$ -labeled 3'-UTR *bicoid* RNA (A) or tubulin and antitubulin antibodies (B), and revealed as described above. (C) Schematic representation of the mutant proteins. Their RNA- and tubulin-binding responses are indicated.

## DISCUSSION

The transport and localization of specific mRNAs have important functions in cell physiology. For example, mRNA targeting plays a key role in the formation of cytoskeletal filaments and in the establishment of morphogenetic gradients (55). However, the nature of the RNP complexes as well as the mechanisms involved in these processes are still largely uncharacterized. In this paper, we describe a novel RNA-binding protein which localizes to the RER in mammalian cells. Although its precise role is still unclear, its biochemical and molecular properties strongly suggest that it is involved in mRNA transport and/or localization. Consistent with such a role, we recently demonstrated that hStau is involved in human immunodeficiency virus type 1 genomic RNA encapsidation (41). Mammalian Stau was also found in the dendrites of rat hippocampal neurons in culture, but not in the axons, and colocalizes with RNPs known to contain mRNA, ribosomes, and translation factors, suggesting a role for Stau in the polarized transport and localization of mRNAs in mammalian neurons (27).

**A differential splicing event generates four *hStau* transcripts.** The significance of the four different classes of transcripts is unknown. They arise by differential splicing since each of the inserts that appears in the 5' end of the cDNAs is flanked by large introns containing typical consensus splicing sequences (6). They are observed in all the tissues tested by RT-PCR, suggesting that they are not cloning artifacts. The multiplicity of the transcripts and the short size of the alternatively spliced exons may explain the fact that a single but diffuse band is visible on the Northern blot, despite the presence of four transcripts. This alternative splicing, which changes the 5' UTR of the transcripts, could represent a mechanism by which translation is regulated, although the presence of similar relative levels of the four transcripts in each tissue

argues against this possibility. Alternatively, these different classes of transcripts may result from aberrant or incomplete splicing events. In fact, an unusually large number of cDNA clones containing intron sequences were isolated, and this may indicate that the splicing of the premature transcripts is a slow process. The presence of an *Alu* sequence in the 5' UTR may arise by the activation of a resident intronic *Alu* element as an exon, as reported previously (35). Many examples of recruitment, via splicing or intron sliding, of a segment of a resident *Alu* element into an mRNA have been reported. It is thought that the presence of a polypyrimidine tract which is the complement of the A-rich tail of the element when inserted in the reverse orientation contributes to the creation of the splicing acceptor site. A point mutation, downstream from this site, may generate the splicing donor site, as reported previously. The presence of an old *Alu* subfamily sequence and of only the right subunit segment of the *Alu* element is consistent with this interpretation.

**Structure and function of Stau.** We observed that mammalian Stau, like all members of the dsRNA-binding protein family (55), can bind any dsRNA or RNAs forming double-stranded structures in vitro, regardless of its primary sequence, as well as RNA-DNA hybrids. The latter adopt a conformation that is more closely related to that of dsRNA than dsDNA, which probably explains why they can bind to Stau. The fact that the full-length Stau protein, as observed with single dsRBD, binds to any dsRNA in vitro suggests that the correspondence between the position of the dsRBDs, and the arrangement of double-stranded stems in the folded RNAs may not be sufficient for specificity; posttranslational modifications and/or essential cofactors capable of forming complex RNP structures along with mRNA molecules could be necessary to discriminate between different RNA secondary structures. Packaging of mRNAs into RNP complexes (1, 18, 20, 32), the

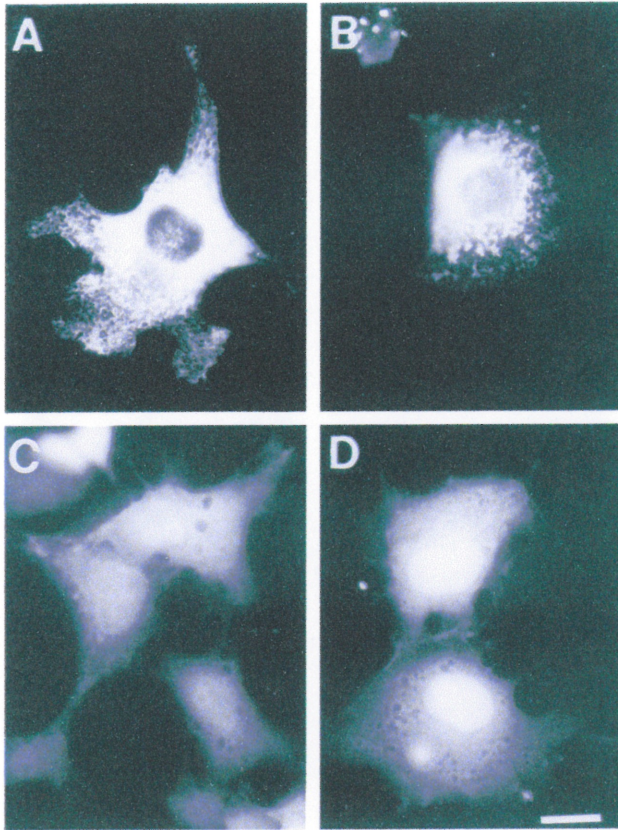


FIG. 7. Subcellular localization of the hStau-GFP fusion proteins. COS7 cells were transfected with cDNAs coding for either the hStau-GFP (A and B) or TBD-GFP (C) fusion protein, or GFP alone (D). Untreated (A, C, and D) or Triton X-100-treated (B) cells were fixed and visualized by autofluorescence. Bar = 20  $\mu$ m.

intermolecular dimerization of the localization signal of *bicoid* mRNA (19), and the involvement of untranslatable hnRNAs in mRNA transport (31, 59, 60) are consistent with this interpretation. Until now, specific mRNA-Stau interactions were shown in vivo only after injection of different RNAs into *Drosophila* embryos, but the mechanisms underlying the specificity are not known (18). Since specific RNA binding cannot be obtained in vitro, it precludes the use of classic techniques to isolate and identify relevant RNAs which would bind stau in vivo. Cross-linking of mRNA to Stau in vivo and isolation of the resulting complexes will be necessary to identify the nature of bound RNAs.

Regardless of their limitations, the in vitro assays did allow us to map the molecular determinants which are necessary and sufficient to bind RNAs. The presence of two functional domains in the mammalian Stau contrasts with what has been reported for other members of the dsRNA-binding protein family, which contain multiple full-length dsRBDs but only one that is biochemically functional (21, 34, 39, 48). Interestingly, full-length dsRBDs incapable to bind dsRNA by themselves can do so when joined to another inactive full-length domain, suggesting that multiple domains present in a given protein exhibit cooperative binding effect (34, 48). Whether the two mStau dsRBDs exhibit similar or different affinities is not yet clear.

We mapped the TBD to a region which is similar to a

microtubule-binding domain of MAP1B. Although this region can efficiently bind tubulin in vitro, it is not sufficient to bring a TBD-GFP fusion protein to the microtubule network. Binding of Stau to microtubules in vivo may involve more than one molecular determinant or the proper localization and folding of the TBD in the full-length protein. Indeed, in our in vitro assay, the fusion protein which contains the C-terminal region in addition to the TBD binds tubulin more efficiently than does the TBD alone, suggesting that this region may be necessary for binding to microtubules in vivo. Interestingly, the corresponding region of the *Drosophila* Stau protein was shown to bind inscuteable (36), a protein with ankyrin domains which is believed to associate with the cytoskeleton (33), suggesting that corresponding regions of the mammalian and *Drosophila* proteins may have functional similarities.

Alternatively, binding may be weak and/or transitory in vivo, for example during the early steps of mRNA recruitment, during mRNA transport, and/or at mitosis, as found in *Drosophila* (18, 45, 55). These steps may be difficult to observe by immunofluorescence in some cell lines (18) and/or be masked by the anchoring of the protein to the RER. A similar conclusion was reached when binding of MAP1B to the microtubule network was studied (65), suggesting that weak binding to the cytoskeleton may be a characteristic of proteins containing this type of TBD. These steps may nevertheless be necessary to allow the efficient and flexible transport of RNA along the cytoskeleton. Interestingly, the immunoelectron microscopic observation of dendrites of hippocampal neurons in culture showed the presence of abundant gold particles close to microtubules, strongly arguing in favor of a Stau-microtubule association in these cells (27). In *Drosophila*, there is no evidence that Stau directly binds to the microtubule network, although Stau-dependent mRNA transport was shown to rely on this structure (45, 55).

Our studies demonstrate that Stau is anchored to the RER and that the putative TBD is not involved in this function. Indeed, preliminary results suggest that the binding of Stau to the RER is carried out by one of the RBDs (40). Similar domains in other members of the dsRNA-binding proteins were previously shown to be involved in protein dimerization and/or in protein-protein interactions (4, 8). This finding also suggests that different Stau molecular determinants are necessary for binding to tubulin and anchoring to the RER. This is consistent with previous findings demonstrating that in *Xenopus* and *Drosophila*, mRNA localization was likely to occur via successive steps involving different elements of the cytoskeleton and overlapping molecular determinants (55).

**Localization of Stau to the RER.** When expressed in mammalian cells, Stau isoforms show a tubulovesicular pattern of localization which is found more abundantly in the perinuclear region. Besides ribosomal proteins, Stau is the first RNA-binding protein shown to be associated with the RER in mammals. No signal peptide or putative hydrophobic transmembrane domains are present in either the long or short Stau proteins, indicating that they are cytosolic proteins and not residents of the RER and that their association to the RER is likely to reflect their mRNA transport function. Two recent papers also suggest that mRNA transport may be linked to the ER or ER-like structures. In *Xenopus* oocytes, Vera, a *Vg1* mRNA-binding protein, was shown to cosediment with TRAP $\alpha$ , a protein associated with the protein translocation machinery of the ER. However, in contrast to Stau, Vera-*Vg1* complexes were found associated only with a small subdomain of the ER, which was of the smooth variety (12). Similarly, in *Drosophila*, at least some steps in mRNA transport in nurse cells and oocytes seem to occur within ER-like cisternae (64).

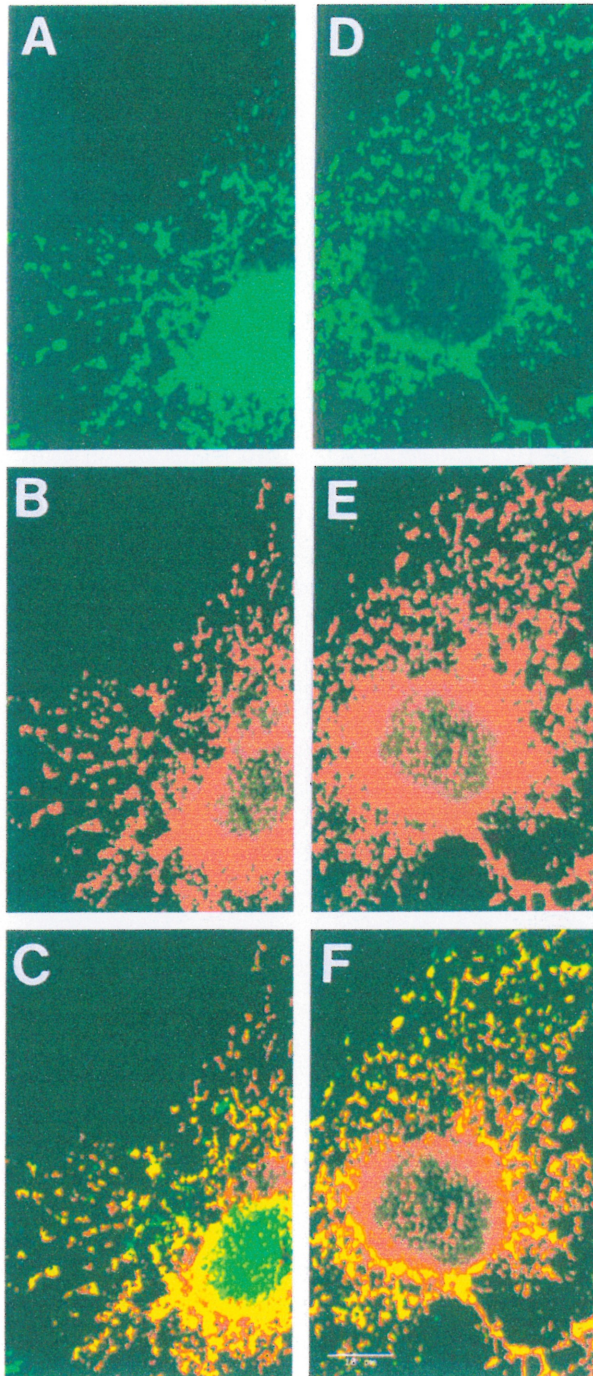


FIG. 8. Colocalization of hStau with markers of the RER by confocal microscopy. A cDNA coding for an hStau-HA fusion protein was transfected into COS7 cells. Triton X-100-treated cells were fixed and double labeled with anti-HA (B) and anticalreticulin (A) or with anti-HA (E) and anticalnexin (D). Anti-HA was detected with Texas red-coupled anti-mouse IgG antibodies, using the Texas Red channel; anticalreticulin and anticalnexin were detected with fluorescein-conjugated anti-rabbit IgG antibodies, using the fluorescein channel. Panels C and F are superpositions of panels A plus B and D plus E, respectively. No overlap was observed between the fluorescein and Texas red channels. Bar = 10  $\mu$ m.

As observed for the *Vg1* mRNA-SER interaction in *Xenopus*, this structure seems to exclude most ribosomes, suggesting that translation is not the major function of these associations.

hStau and mStau represent new members of a large family of proteins involved in the transport and/or localization of mRNAs to different subcellular compartments and/or organelles. Stau, the TAR RNA-binding protein and *X. laevis* homologue Xlrpba, and Spnr were shown to colocalize with the RER (this paper), with ribosomes and hnRNPs (14), and with the microtubular array of spermatids (49), respectively. Our results strongly suggest that Stau-mRNA RNP complexes are transported along the microtubule network and then anchored to the RER. It is well known that the ER is associated with the microtubule cytoskeleton (57). Therefore, a transient interaction between microtubules and Stau may facilitate the localization of Stau and the targeting of mRNA to the RER. One of the roles of Stau might be to transport and localize specific mRNAs to the RER, such as those coding for secreted or membrane proteins which have to be translocated to the RER. This would bring them in proximity to the signal recognition particles and RER, thus facilitating translation and translocation. The presence of Stau in cell processes, in association with ER structures, may represent a first clue to understanding the role of many mRNAs which were found to be localized in neuronal processes (51). Stau may facilitate the transport of mRNAs to cell processes to ensure efficient local translation and translocation. In addition, the presence of multiple Stau-like proteins in mammals creates the possibility that different members of the family can target subclasses of mRNAs to different subdomains of the ER. This phenomenon has been described before and is thought to be the first step in the differential targeting of proteins in polarized cells (43).

We do not exclude the possibility that Stau plays additional roles in mammals; Stau may first be linked to the RER for storage, and then a subset of molecules may be recruited by specific mRNAs and/or cofactors to form RNP complexes that will be transported along microtubules toward their final destination. The presence of large amounts of Stau in the perinuclear region, which could be awaiting the nucleocytoplasmic transport of mRNAs, is consistent with this possibility. The presence of a putative nuclear localization signal even suggests that Stau transits through the nucleus before being localized in the cytoplasm and plays a role in mRNA or rRNA export. Alternatively, Stau may play key roles in the translational regulation of localized mRNAs, as is the case for *Drosophila* Stau, which is essential for the translation of *oskar* mRNA, once it is localized at the posterior pole (29). Indeed, since polysomes and ER-bound ribosomes are not extracted by Triton X-100, it is possible that Stau is associated with the RER via ribosomes and/or mRNAs. Characterization of mRNAs and putative cofactors which bind to stauferin will be necessary to understand the process.

In vertebrates, the mechanisms which underly the transport of mRNAs have not yet been deciphered. Characterization of the RNAs and proteins involved in transport and localization is particularly important since understanding the mechanisms responsible for the transport of mRNAs is fundamental for learning more on the development of polarity in cells, both during mammalian development and in somatic cells, at a time where RNA-based gene therapy is being considered as a possible approach to cure different disorders.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Luis Rokeach (Department of Biochemistry, University of Montreal) for the anticalreticulin antibodies, John Bergeron (McGill University) for the anticalnexin antibodies, and André Royal (Depart-

ment of Pathology and Cell Biology) for the mouse cDNA library. We thank Luis Rokeach and Lea Brakier-Gingras for comments and discussion and Michael Kiebler for sharing unpublished information.

The first two authors contributed equally to this work.

This work was supported by a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada grant to L.D., a National Health Research Development Program grant to L.D., and a Medical Research Council of Canada grant to I.R.N.

#### REFERENCES

1. Ainger, K., D. Avossa, F. Morgan, S. J. Hill, C. Barry, E. Barbarese, and J. H. Carson. 1993. Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes. *J. Cell Biol.* 123:431-441.
2. Aloyz, R. S., and L. DesGroseillers. 1995. Processing of the L5-67 precursor peptide and characterization of LUQIN in the central nervous system of *Aplysia californica*. *Peptides* 16:331-338.
3. Bassell, G., and R. H. Singer. 1997. mRNA and cytoskeletal filaments. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:109-115.
4. Benkirane, M., C. Neuveut, R. F. Chun, S. M. Smith, C. E. Samuel, A. Gatignol, and K.-T. Jeang. 1997. Oncogenic potential of TAR RNA binding protein TRBP and its regulatory interaction with RNA-dependent protein kinase PKR. *EMBO J.* 16:611-624.
5. Breitwieser, W., F.-H. Markusens, H. Horstmann, and A. Ephrussi. 1996. Oskar protein interaction with Vasa represents an essential step in polar granule assembly. *Genes Dev.* 10:2179-2188.
6. Brizard, F., and L. DesGroseillers. Submitted for publication.
7. Broadus, J., S. Fuerstenberg, and C. Q. Doe. 1998. Staufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature* 391:792-795.
8. Cosentino, G. P., S. Venkatesan, F. C. Serluca, S. Green, M. B. Mathews, and N. Sonenberg. 1995. Double-stranded-RNA-dependent protein kinase and TAR RNA-binding protein from homo- and heterodimers in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9445-9449.
9. Crino, P. B., and J. Eberwine. 1996. Molecular characterization of the dendritic growth cone: regulated mRNA transport and local protein synthesis. *Neuron* 17:1173-1187.
10. Davis, L., G. A. Banker, and O. Steward. 1987. Selective dendritic transport of RNA in hippocampal neurons in culture. *Nature* 330:477-479.
11. DesGroseillers, L., and N. Lemieux. 1996. Localization of a human double-stranded RNA-binding protein gene (*STAU*) to band 20q13.1 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 36:527-529.
12. Deshler, J. O., M. I. Highett, and B. J. Schnapp. 1997. Localization of *Xenopus* Vg1 mRNA by Vera protein and the endoplasmic reticulum. *Science* 276:1128-1131.
13. Deshler, J. O., M. I. Highett, T. Abramson, and B. J. Schnapp. 1998. A highly conserved RNA-binding protein for cytoplasmic localization in vertebrates. *Curr. Biol.* 8:489-496.
14. Eckmann, C. R., and M. F. Jantsch. 1997. Xlrpba, a double-stranded RNA-binding protein associated with ribosomes and heterogeneous nuclear RNPs. *J. Cell Biol.* 138:239-253.
15. Elisha, Z., L. Havin, I. Ringel, and J. K. Yisraeli. 1995. Vg1 RNA binding protein mediates the association of Vg1 RNA with microtubules in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 14:5109-5114.
16. Ephrussi, A., L. K. Dickinson, and R. Lehmann. 1991. Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell* 66:37-50.
17. Erdelyi, M., A. M. Michon, A. Guichet, J. B. Glotzer, and A. Ephrussi. 1995. Requirement for *Drosophila* cytoplasmic tropomyosin in oskar mRNA localization. *Nature* 377:524-527.
18. Ferrandon, D., L. Elphick, C. Nüsslein-Volhard, and D. St Johnston. 1994. Staufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* 79:1221-1232.
19. Ferrandon, D., I. Koch, E. Westhof, and C. Nüsslein-Volhard. 1997. RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3'UTR-staufen ribonucleoprotein particles. *EMBO J.* 16:1751-1758.
20. Forristall, C., M. Pondel, and M. L. King. 1995. Patterns of localization and cytoskeletal association of two vegetally localized RNAs, Vg1 and Xcat-2. *Development* 121:201-208.
21. Gatignol, A., C. Buckler, and K.-T. Jeang. 1993. Relatedness of an RNA-binding motif in human immunodeficiency virus type 1 TAR RNA-binding protein TRBP to human P1/dsI kinase and *Drosophila* Staufen. *Mol. Cell Biol.* 13:2193-2202.
22. Gazzaley, A. H., D. L. Benson, G. W. Huntley, and J. H. Morrison. 1997. Differential subcellular regulation of NMDAR1 protein and mRNA in dendrites of dentate gyrus granule cells after perforant path transection. *J. Neurosci.* 17:2006-2017.
23. Havin, L., A. Git, Z. Elisha, F. Oberman, K. Yaniv, S. P. Schwartz, N. Standart, and J. K. Yisraeli. 1998. RNA-binding protein conserved in both microtubule- and microfilament-based RNA localization. *Genes Dev.* 12:1593-1598.
24. Hochstenback, F., V. David, S. Watkins, and M. B. Brenner. 1992. Endoplasmic reticulum resident protein of 90 kilodaltons associates with the T- and B-cell antigen receptors and major histocompatibility complex antigens during assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4734-4738.
25. Jockers, R., A. Da Silva, A. D. Strosberg, M. Bouvier, and S. Marullo. 1996. New molecular and structural determinants involved in  $\beta_2$ -adrenergic receptor desensitization and sequestration. *J. Biol. Chem.* 271:9355-9362.
26. Kang, H., and E. M. Schuman. 1996. A requirement for local protein synthesis in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity. *Science* 273:1402-1406.
27. Kiebler, M. Personal communication.
28. Kim-Ha, J., J. L. Smith, and P. M. Macdonald. 1991. Oskar mRNA is localized to the posterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Cell* 66:23-35.
29. Kim-Ha, J., K. Kerr, and P. M. Macdonald. 1995. Translational regulation of oskar mRNA by Bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential. *Cell* 81:403-412.
30. Kislauskis, E. H., X. Zhu, and R. H. Singer. 1997.  $\beta$ -Actin messenger RNA localization and protein synthesis augment cell motility. *J. Cell Biol.* 136:1263-1270.
31. Kloc, M., and L. D. Etkin. 1994. Delocalization of Vg1 mRNA from the vegetal cortex in *Xenopus* oocytes after destruction of Xlsrta RNA. *Science* 265:1101-1103.
32. Knowles, R. B., J. H. Sabry, M. E. Martone, T. J. Deerinck, M. H. Ellisman, G. J. Bassell, and K. S. Kosik. 1996. Translocation of RNA granules in living neurons. *J. Neurosci.* 16:7812-7820.
33. Kraut, R., and J. A. Campos-Ortega. 1996. Inscuteable, a neural precursor gene of *Drosophila* encodes a candidate for a cytoskeletal adaptor protein. *Dev. Biol.* 174:66-81.
34. Krovat, B. C., and M. F. Jantsch. 1996. Comparative mutational analysis of the double-stranded RNA binding domains of *Xenopus laevis* RNA-binding protein. *A. J. Biol. Chem.* 271:28112-28119.
35. Labuda, D., E. Zietkiewicz, and G. A. Mitchell. 1995. Alu elements as a source of genomic variation: deleterious effects and evolutionary novelties, p. 1-24. *In* R. J. Marais (ed.), *The impact of short interspersed elements (SINES) on the host genome*. R. G. Landes Company, Austin, Tex.
36. Li, P., X. Yang, M. Wasser, Y. Cai, and W. Chia. 1997. Inscuteable and staufen mediate asymmetric localization and segregation of prospero RNA during *Drosophila* neuroblast cell divisions. *Cell* 90:437-447.
37. Long, R. M., R. H. Singer, X. Meng, I. Gonzalez, K. Nasmyth, and R.-P. Jansen. 1997. Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of *ASH1* mRNA. *Science* 277:383-387.
38. Martin, K. C., A. Casadio, H. Zhu, E. Yaping, J. C. Rose, M. Chen, C. H. Bailey, and E. R. Kandel. 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.
39. McCormack, S. J., L. G. Ortega, J. P. Doohan, and C. E. Samuel. 1994. Mechanism of interferon action: motif 1 of the interferon-induced, RNA-dependent protein kinase (PKR) is sufficient to mediate RNA-binding activity. *Virology* 198:92-99.
40. Ming, L., and L. DesGroseillers. Unpublished data.
41. Moulant, A. J., J. Mercier, L. Wickham, L. DesGroseillers, and E. A. Cohen. Submitted for publication.
42. Nakielny, S., U. Fischer, W. M. Michael, and G. Dreyfuss. 1997. RNA transport. *Annu. Rev. Neurosci.* 20:269-301.
43. Okita, T. W., X. Li, and M. W. Roberts. 1994. Targeting of mRNAs to domains of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem. Sci.* 4:91-96.
44. Pachter, J. S. 1992. Association of mRNA with the cytoskeletal framework: its role in the regulation of gene expression. *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expr.* 2:1-18.
45. Pokrywka, N. J., and E. C. Stephenson. 1995. Microtubules are a general component of mRNA localization systems in *Drosophila* oocytes. *Dev. Biol.* 167:363-370.
46. Rings, E.H.H.M., H. A. Büller, A. M. Neele, and J. Dekker. 1994. Protein sorting versus messenger RNA sorting? *Eur. J. Cell Biol.* 63:161-171.
47. Ross, A. F., Y. Oleynikov, E. H. Kislauskis, K. L. Taneja, and R. H. Singer. 1997. Characterization of a  $\beta$ -actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol. Cell Biol.* 17:2158-2165.
48. Schmedt, C., S. R. Green, L. Manche, D. R. Taylor, Y. Ma, and M. B. Mathews. 1995. Functional characterization of the RNA-binding domain and motif of the double-stranded RNA-dependent protein kinase DAI (PKR). *J. Mol. Biol.* 249:29-44.
49. Schumacher, J. M., K. Lee, S. Edelhoff, and R. E. Braun. 1995. Spnr, a murine RNA-binding protein that is localized to cytoplasmic microtubules. *J. Cell Biol.* 129:1023-1032.
50. Schwartz, S. P., L. Aisenthal, Z. Elisha, F. Oberman, and J. K. Yisraeli. 1992. A 69-kDa RNA-binding protein from *Xenopus* oocytes recognizes a common motif in two vegetally localized maternal mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11895-11899.
51. Steward, O. 1997. mRNA localization in neurons: a multipurpose mechanism? *Neuron* 18:9-12.
52. St Johnston, D., W. Driever, T. Berleth, S. Riechstein, and C. Nüsslein-Volhard. 1989. Multiple steps in the localization of bicoid RNA to the

- anterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Dev. Suppl.* **107**:13–19.
53. St Johnston, D., D. Beuchle, and C. Nüsslein-Volhard. 1991. *Staufen*, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* **66**:51–63.
  54. St Johnston, D., N. H. Brown, J. G. Gall, and M. Jantsch. 1992. A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:10979–10983.
  55. St Johnston, D. 1995. The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell* **81**:161–170.
  56. Takizawa, P. A., A. Sil, J. R. Swedlow, I. Herskowitz, and R. D. Vale. 1997. Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast. *Nature* **389**:90–93.
  57. Terasaki, M., L. B. Chen, and K. Fujiwara. 1986. Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *J. Cell Biol.* **103**:1557–1568.
  58. Tetzlaff, M. T., H. Jäckle, and M. J. Pankratz. 1996. Lack of *Drosophila* cytoskeletal tropomyosin affects head morphogenesis and the accumulation of *oskar* mRNA required for germ cell formation. *EMBO J.* **15**:1247–1254.
  59. Tiedge, H., R. T. Fremeau, Jr., P. H. Weinstock, O. Arancio, and J. Brosius. 1991. Dendritic localization of neural BC1 RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:2093–2097.
  60. Tiedge, H., A. Zhou, N. A. Thorn, and J. Brosius. 1993. Transport of BC1 RNA in hypothalamo-neurohypophyseal axons. *J. Neurosci.* **13**:4214–4219.
  61. Tongiorgi, E., M. Righi, and A. Cattaneo. 1997. Activity-dependent dendritic targeting of BDNF and TrkB mRNAs in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **17**:9492–9505.
  62. Wickham, L., and L. DesGroseillers. 1991. A bradykinin-like neuropeptide precursor gene is expressed in neuron L5 of *Aplysia californica*. *Dev. Cell Biol.* **10**:249–258.
  63. Wilhelm, J. E., and R. D. Vale. 1993. RNA on the move: the mRNA localization pathway. *J. Cell Biol.* **123**:269–274.
  64. Wilsch-Bräuninger, M., H. Schwarz, and C. Nüsslein-Volhard. 1997. A sponge-like structure involved in the association and transport of maternal products during *Drosophila* oogenesis. *J. Cell Biol.* **139**:817–829.
  65. Zauner, W., J. Kratz, J. Staunton, P. Feick, and G. Wiche. 1992. Identification of two distinct microtubule binding domains on recombinant rat MAP1B. *Eur. J. Cell Biol.* **57**:66–74.

**ARTICLE 2 : A NOVEL MURINE STAUFEN ISOFORM MODULATES THE RNA CONTENT  
OF STAUFEN RIBONUCLEOPROTEIN COMPLEXES**

### **Mise en contexte**

Lors d'un criblage pour isoler le transcrit de l'homologue murin de Stau1, un clone isolé comportait une insertion de 18pb dans la séquence codant pour le dsRBD3 de la protéine. Le fait que le dsRBD3 représente le déterminant majeur de liaison à l'ARNdb et que des indices s'accumulaient alors en faveur de la dimérisation des protéines Staufen, a permis de suggérer une fonction pour cette variante de Stau1. Cet article relate la caractérisation des événements menant à la formation de l'isoforme Stau1<sup>i</sup>, des conséquences structurales et fonctionnelles de l'insertion dans le dsRBD3 et explore une fonction possible pour cette isoforme.

**Note**

-Contribution de chacun des auteurs :

T. Duchaine : Clonage de Stau1<sup>i</sup> et séquences, RT-PCR, constructions, purification de protéines, essais de liaison à l'ARN, transfections et microscopie confocale, immunoprécipitations de protéines et d'ARN, compte des cellules.

H.-J. Wang : Immunofluorescences.

M. Luo : Aide avec les fusions GFP.

S. V. Steinberg : Prédiction structurales.

I. R. Nabi : Aide en microscopie.

L. DesGroseillers : Supervision générale.

Article publié dans *Mol Cell Biol* (2000) 20, 5592-5601.



## A Novel Murine Staufen Isoform Modulates the RNA Content of Staufen Complexes

THOMAS DUCHAÎNE,<sup>1</sup> HUI-JUN WANG,<sup>2</sup> MING LUO,<sup>1</sup> SERGEY V. STEINBERG,<sup>1</sup> IVAN R. NABI,<sup>2</sup>  
 AND LUC DESGROSEILLERS<sup>1\*</sup>

*Departments of Biochemistry<sup>1</sup> and Pathology and Cell Biology,<sup>2</sup> University of Montreal,  
 Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7*

Received 21 December 1999/Returned for modification 11 February 2000/Accepted 2 May 2000

Mouse Staufen (mStau) is a double-stranded RNA-binding protein associated with polysomes and the rough endoplasmic reticulum (RER). We describe a novel endogenous isoform of mStau (termed mStau<sup>1</sup>) which has an insertion of six amino acids within dsRBD3, the major double-stranded RNA (dsRNA)-binding domain. With a structural change of the RNA-binding domain, this conserved and widely distributed isoform showed strongly impaired dsRNA-binding ability. In transfected cells, mStau<sup>1</sup> exhibited the same tubulovesicular distribution (RER) as mStau when weakly expressed; however, when overexpressed, mStau<sup>1</sup> was found in large cytoplasmic granules. Markers of the RER colocalized with mStau<sup>1</sup>-containing granules, showing that overexpressed mStau<sup>1</sup> could still be associated with the RER. Cotransfection of mStau<sup>1</sup> with mStau relocated overexpressed mStau<sup>1</sup> to the reticular RER, suggesting that they can form a complex on the RER and that a balance between these isoforms is important to achieve proper localization. Coimmunoprecipitation demonstrated that the two mStau isoforms are components of the same complex *in vivo*. Analysis of the immunoprecipitates showed that mStau is a component of an RNA-protein complex and that the association with mStau<sup>1</sup> drastically reduces the RNA content of the complex. We propose that this new isoform, by forming a multiple-isoform complex, regulates the amount of RNA in mStau complexes in mammalian cells.

RNA transport and localization provide an efficient way to distribute genetic information and to allow different portions of the cell to establish their own biochemical fates (12, 20, 32, 44). Examples of this process have been described in many different organisms and cell types. RNA localization and/or localized translation are linked to different biological processes such as asymmetric cell division (7, 28, 39, 45), long-term potentiation (30), synaptic transmission (40), cell motility (23), and axis formation in oocytes (44). It is now apparent that many determinants of RNA localization are conserved among these systems. The process of mRNA localization is initiated by association of RNA with one or more RNA-binding proteins (RBPs) through a targeting signal most commonly located in the 3' untranslated region (3' UTR) of the transcripts. This association results in the formation of large ribonucleo-protein complexes (RNPs) (1, 13, 24). These complexes then migrate along the cytoskeleton to their final destination, where they are anchored and translated. For the entire localization process, translation of localized mRNAs needs to be tightly regulated. Specific signals are important for repressing translation during mRNA transport and derepressing translation once RNPs are properly localized (15, 21, 22). The crucial role played by the cytoskeleton in many steps of transport, anchoring, and translation (2, 34, 41, 47) is another feature which appears to be conserved in numerous RNA localization systems. The multistep process of RNA localization is dependent on specific *trans*-acting proteins. Thus, it is essential to identify and characterize these proteins and to study their localization and regulation. Recent work has identified several classes of proteins as components of RNP involved in mRNA transport (20). These include members of the double-stranded RBP

(dsRBP) family (25, 43), homologues of the zipcode-binding protein (10, 11, 16, 36), and members of the hnRNP family (3, 17, 33).

Mammalian Staufen, a member of the dsRBP family, contains four copies of the dsRBD consensus motif (29, 46), now designated dsRBD2 to dsRBD5 for consistency with the Staufen domains in *Drosophila* (43). *In vitro*, Staufen was shown to bind dsRNA without sequence specificity (29, 46). Molecular mapping of the functional domains related the RNA-binding activity mainly to dsRBD3, with a weaker activity mapped to dsRBD4 (46). Similarly, the spacer region between dsRBD4 and dsRBD5, which resembles the tubulin-binding domain of MAP1B, was shown to bind tubulin *in vitro* (46). In fibroblasts, Staufen is associated with polysomes and the rough endoplasmic reticulum (RER) (29, 46), whereas in neurons, it is associated with both the RER and microtubules (19). In expression studies in neurons, Staufen was demonstrated to be a component of RNA-containing granules migrating in both anterograde and retrograde manners along the dendrites (25). This was persuasive evidence that Staufen is involved in mRNA transport in mammals. However, challenging questions remain about the precise role of each Staufen isoform; the function of the multiple domains in Staufen protein; and the nature of its interaction with RNAs, protein cofactors, RER, and the cytoskeleton.

Recent studies in *Drosophila* have provided important clues about the function of Staufen. In *Drosophila*, Staufen is necessary for *bicoid* and *oskar* mRNA localization to the anterior and posterior poles of the oocyte, respectively (21, 42), and for *prospero* mRNA localization in neuroblasts (7, 27, 39). Out of the five copies of the dsRBD consensus sequences, dsRBD3 was shown to bind *bicoid* and *prospero* mRNAs *in vitro* (27, 43); dsRBD5 was shown to be involved in protein-protein interactions (39), demonstrating that Staufen is involved in both RNA-protein and protein-protein interactions. Although direct binding to *bicoid* RNA has not yet been shown *in vivo*,

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Biochemistry, University of Montreal, P.O. Box 6128, Station Centre Ville, Montreal, QC, Canada H3C 3J7. Phone: [REDACTED] Fax: (514) 343-2210. E-mail: [REDACTED]

intermolecular *bicoid* RNA-RNA interactions are important for recruiting Staufen in the RNP complexes (14). In contrast, Staufen directly interacts with Oskar protein via its N-terminal domain in oocytes (5) and with Inscuteable and Miranda in neuroblasts through its C-terminal half and fifth dsRBD, respectively (27, 39). Staufen expression is also important for derepression of the localized *oskar* mRNA translation (5).

Recently we reported the molecular cloning and characterization of human (hStau) and mouse (mStau) Staufen (46). We now report that a novel endogenous Staufen isoform (mStau<sup>1</sup>) containing a six-amino-acid insertion within its major dsRBD (dsRBD3) shows a severe reduction in its RNA-binding capacity in vitro. Our results show that this isoform, along with mStau, are components of RNA-protein complexes and that the ratio of the two isoforms is important for the proper subcellular localization of mStau<sup>1</sup>. Finally, analyses of Staufen-containing complexes demonstrate that increasing the incorporation of mStau<sup>1</sup> drastically reduces the amount of RNA in these complexes. These results provide new insights into the mechanism of regulation of mStau function in vivo.

#### MATERIALS AND METHODS

**Molecular cloning and sequencing of the cDNAs.** The cloning of the short isoform of a mouse *stau*en homologue from a fetal total mouse cDNA library was previously described (46). DNAs from the isolated λGT10 clones were subcloned into a Bluescript vector (Stratagene). Double-stranded DNAs were sequenced by the dideoxynucleotide method according to the Sequenase protocols (United States Biochemical Corp.).

**RT-PCR.** Reverse transcription-PCR (RT-PCR) was conducted according to the Perkin-Elmer GeneAmp RNA PCR protocol. This experiment was performed with 1 μg of total RNA isolated from different tissues and cell lines. Reverse transcription was carried out in the presence of oligo(dT)<sub>16</sub> primer, and PCR amplification incorporated the use of the mouse-specific sense and antisense primers 5'-GACCACCCGTGAAACACGATGCCCC-3' (positions 495 to 519; GenBank accession number AF061942) and 5'-TCCCTTCACCTTCCCCACAAACTCCC-3' (positions 755 to 729; GenBank accession number AF061942), respectively. For human and monkey cDNAs, we used the human-specific sense primer 5'-GACAGCGTGCAGAACACGATGCTGC-3' (positions 478 to 502; GenBank accession number AF061940) and the mouse antisense primer. Aliquots of the amplified products were collected after 25, 28, 30, 32, and 35 PCR cycles and were run on agarose gels to test the linearity of the PCR reaction (not shown). Only PCR products obtained by 32 cycles of amplification are shown in Fig. 2.

**Construction of fusion proteins.** Maltose-binding protein (MBP)-dsRBD3 and MBP-dsRBD3<sup>1</sup> were constructed first by amplifying a fragment using the primer pair 5'-CAATGTATAAGCCCGTGGACCC-3' and 5'-AAAAAGCTTGTGCAAGTCTACTAATAGGATTCATCC-3' with Vent DNA polymerase (New England Biolabs). The resulting product was digested with *Hind*III and cloned into the *Eag*I\* and *Hind*III sites of a modified pMal-c vector (pMal-stop). To produce this vector, we introduced stop codons at the *Hind*III site of pMal-c by the ligation of the annealed complementary oligonucleotides 5'-AGCTTAA TTAGCTGAC-3' and 5'-AGCTGTGACGTAATTA-3'. *Eag*I\* was created by filling in the cohesive ends of *Eag*I-digested pMal-c vector using the Klenow fragment of DNA polymerase I. This vector was used to purify the 398-bp *Pst*I and *Hind*III fragment, which then was subcloned in the pMAL-stop vector to generate the mStau-RBD3 construct. These MBP-dsRBD3 fusion plasmids were introduced into *Escherichia coli* strain BL-21. The fusion proteins were obtained after induction with 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) for 2 to 3 h. Cells were lysed in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) loading buffer for immediate use or frozen at -80°C for storage.

His-Stau and His-Stau<sup>1</sup> fusion proteins were amplified using primer pair 5'-TCTGGATCCGAAAGTATAGCTTCTACCATTG-3' and 5'-TACAATCTAGATTATCAGCGGCCCTCCCGCACGCTGAAAC-3', and the resulting fragment was cloned blunt in Bluescript *Eco*RV site. The fragment resulting from digestion with *Not*I and *Bam*HI was subcloned in the pET21a vector, resulting in the proper frame for fusion with the encoded His<sub>6</sub> tag.

**Antibody production and Western blotting.** Polyclonal anti-Staufen antibodies were obtained by injection of purified His-hStau fusion protein into rabbits as previously described (46). For Western blotting, cells were lysed in 0.5% Triton X-100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μg of aprotinin per ml, and 1 μg of pepstatin A per ml in phosphate-buffered saline (PBS). Protein extracts were quantified by the Bradford method (Bio-Rad). Equal amounts of proteins were separated on SDS-12% polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked for 30 min in Tris-buffered saline (TBS) plus 5% dry milk and incubated with primary antibodies in Tris-buffered saline

plus 0.05% Tween for 1 h at room temperature. Detection was performed by incubating the blots with peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) antibodies (Dimension Labs) and with the Supersignal substrate (Pierce).

**RNA binding assay.** Bacterial extracts from IPTG-induced cultures or affinity-purified fusion proteins were separated on SDS-7.5% polyacrylamide gels, and the proteins were transferred to nitrocellulose membranes. Increasing amounts of bacterial extracts and of affinity-purified fusion proteins were separated by SDS-PAGE. Amounts of mStau and mStau<sup>1</sup> were quantitated by Western blotting. Equal amounts were then loaded on the gel for the Northwestern assay. RNA interaction was detected by Northwestern assay using <sup>32</sup>P-labeled 3' UTR of *bicoid* RNA as previously described (46).

**Immunofluorescence.** mStau tagged with hemagglutinin epitope (HA) and mStau tagged with green fluorescent protein (GFP) were constructed by PCR amplification of the full-length cDNA using the primer pair 5'-TCTGGATCCGAAAGTATAGCTTCTACCATTG-3' and 5'-TACAATCTAGATTATCAGCGGCCGACCTCCCGCACGCTGAAAC-3'. The 3' primer was synthesized with a *Not*I site just upstream from the stop codon, allowing ligation of a *Not*I cassette containing either the GFP sequence or three copies of the HA tag. After digestion with *Bam*HI and *Xba*I, the resulting fragment was cloned in Bluescript. The *Bam*HI/*Xba*I fragment was then subcloned in the pCDNA3/RSV vector (18), and a *Not*I cassette was introduced at the *Not*I site. Mammalian cells were transfected transiently with the cDNAs by the calcium phosphate precipitation technique, fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 25 min at room temperature, and permeabilized with 0.3% Triton X-100 in PBS containing 0.1% bovine serum albumin (BSA). Nonspecific sites were then blocked with 1% BSA in PBS-0.3% Triton X-100 and incubated with mouse anti-HA for 1 h at room temperature as indicated. Cells were washed in permeabilization buffer and incubated with Texas red-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pa.) in blocking buffer for 1 h. GFP and GFP fusion proteins were detected by autofluorescence.

For the analysis of cytoskeleton-associated proteins, transfected cells were first extracted in 0.3% Triton X-100-130 mM HEPES (pH 6.8)-10 mM EGTA-20 mM MgSO<sub>4</sub> for 5 min at 4°C as previously described (46). They were then fixed in 4% paraformaldehyde-PBS and processed for immunofluorescence as described above. Cells were visualized by immunofluorescence using the 63× planApochromat objective of a Zeiss Axioskop fluorescence microscope. Confocal microscopy was performed with a Zeiss 410 confocal microscope using a 63× planApochromat objective (Department of Anatomy and Cell Biology, McGill University). Fluorescein isothiocyanate (FITC) and rhodamine channel images were obtained sequentially to prevent overlap of the two signals.

**Immunoprecipitation.** COS-1 cells were transfected with 6 μg of DNA using the FUGENE-6 reagent (Roche Biochemicals), washed in PBS 36 h posttransfection, and then harvested in 1 ml of lysis buffer (0.5% Triton X-100-50 mM Tris-Cl [pH 7.5], 15 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 10 μg of phenylmethylsulfonyl fluoride per ml, standard protease inhibitor cocktail). The lysate was incubated at 4°C for 1 h and centrifuged at 14,000 × g for 15 min. Proteins in the supernatant were quantified, and aliquots were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting to confirm expression of each protein. For immunoprecipitation, 1 mg of total extract was preincubated with anti-HA ascites fluid (1/250) for at least 6 h at 4°C and centrifuged at 14,000 × g for 15 min. The supernatant was incubated for 4 h at 4°C in the presence of 50 μl of a ~60% protein A-Sepharose slurry equilibrated in lysis buffer and then centrifuged at 500 × g for 30 s at 4°C. The pellet was washed four times in lysis buffer, resuspended in reducing sample buffer, and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using polyclonal anti-GFP (1/100; Clontech) or anti-Stau (1/500) antibodies.

To study the RNA content of the immunoprecipitates, COS-1 cells were transfected with 25 μg of DNA (total) by the calcium phosphate method. Cells were lysed in the lysis buffer containing RNase inhibitors, and the proteins (10 mg) were immunoprecipitated as described above. One-tenth of the immunoprecipitate was directly analyzed by SDS-PAGE and Western blotting, while the remaining immunoprecipitate was resuspended in 100 mM Tris-Cl (pH 7.4)-200 mM dithiothreitol-4% SDS at 95°C for 5 min, extracted with Trizol, and precipitated. RNA was dissolved in 10 μl of diethyl pyrocarbonate-treated water, separated on formaldehyde-agarose gel, and analyzed by hybridization using <sup>32</sup>P-labeled 20-mer oligonucleotides of random sequences.

#### RESULTS

**mStau<sup>1</sup> is a novel mStau isoform produced by alternative splicing.** We previously reported the cloning of the short isoform of mStau from a mouse total embryonic cDNA library (46). The encoded mStau protein is 91% identical to its human counterpart, and its genetic organization is identical. We showed that mStau binds dsRNA and tubulin in vitro and that the RNA-binding activity maps mainly to dsRBD3 but also weakly to dsRBD4 (46). Analysis of the mouse *stau*en cDNAs allowed us to identify a novel endogenous transcript containing an 18-bp insertion within the sequence coding for dsRBD3 (Fig. 1). We designated this isoform mStau<sup>1</sup>. Except for the

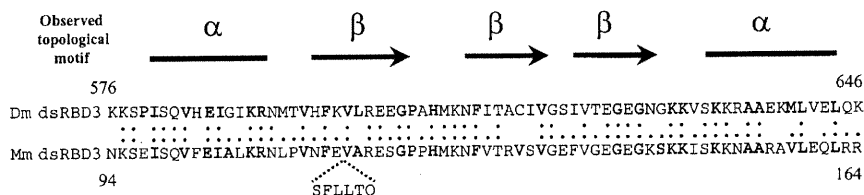


FIG. 1. Sequence comparison of *Drosophila* (Dm; GenBank accession number M69111) and mouse (Mm) Staufen dsRBD3 domains. The position and sequence of the six-amino-acid insert in mStau<sup>i</sup> are indicated. Colons and dots represent identical and conserved amino acids. Amino acids included in the consensus described by Krovat and Jantsch (26) are identified in bold. Topological motifs adopted by the *Drosophila* domain (8) are presented schematically above the sequences.

sequence of the insertion, the cDNAs coding for each isoform are 100% identical. In addition, hybridization of mouse genomic DNA with a 191-bp fragment of *staufer* cDNA (nucleotides 57 to 248) revealed a single band on a Southern blot, independent of the restriction enzyme used (Fig. 2A). The *staufer* gene is therefore present in the mouse genome as a single copy. Characterization of the corresponding genomic sequence further revealed that the transcripts are generated by differential splicing, choosing either of two splicing acceptor sites (Fig. 2B). Similar genomic organization is observed in the human genome, suggesting that this phenomenon is conserved among mammals (6).

To establish the *in vivo* relevance of this transcript, we first confirmed its presence in mouse tissues and determined its level of expression relative to that of mStau. RT-PCR experiments on eight mouse tissues using oligonucleotide primers located on each side of the insert showed that mStau<sup>i</sup> was expressed in every tested tissue (Fig. 2C). In a single tissue, the steady-state level of mStau<sup>i</sup> transcript was slightly lower than that of mStau (Fig. 2C). We then tested whether this phenomenon was conserved among different species. Using primers specific for the human sequence, we amplified fragments cor-

responding to transcripts both in humans (HeLa cells) and in monkeys (COS-1 cells) (Fig. 2C, lanes 11 and 12). The human-specific primers did not amplify mouse transcripts (lane 13), thus demonstrating the specificity of the amplification products. Interestingly, the ratio of mStau<sup>i</sup> to mStau was decreased in these cell lines, suggesting that it may be subject to regulation. Cloning and sequencing the amplified products confirmed that they encode *staufer* sequences (not shown). The alternatively spliced transcript is therefore present in many mammalian species, and its level of expression is just slightly lower than that of mStau.

**mStau<sup>i</sup> shows impaired dsRNA-binding activity.** Comparison of the mStau<sup>i</sup> amino acid sequence with the known nuclear magnetic resonance structure of dsRBD3 of *Drosophila* Staufen and of other dsRBDs (8, 26) showed that the six-amino-acid insert is localized within the first beta strand of the consensus  $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$  motif (Fig. 1) (8). To test whether the six-amino-acid insertion modifies the dsRNA-binding capacity of mStau<sup>i</sup>, fusions of the full-length mStau and mStau<sup>i</sup> proteins (His-mStau and His-mStau<sup>i</sup>) and of their isolated dsRBD3s (MBP-dsRBD3 and MBP-dsRBD3<sup>i</sup>) were expressed in bacteria. Their RNA-binding capacity was analyzed by the North-

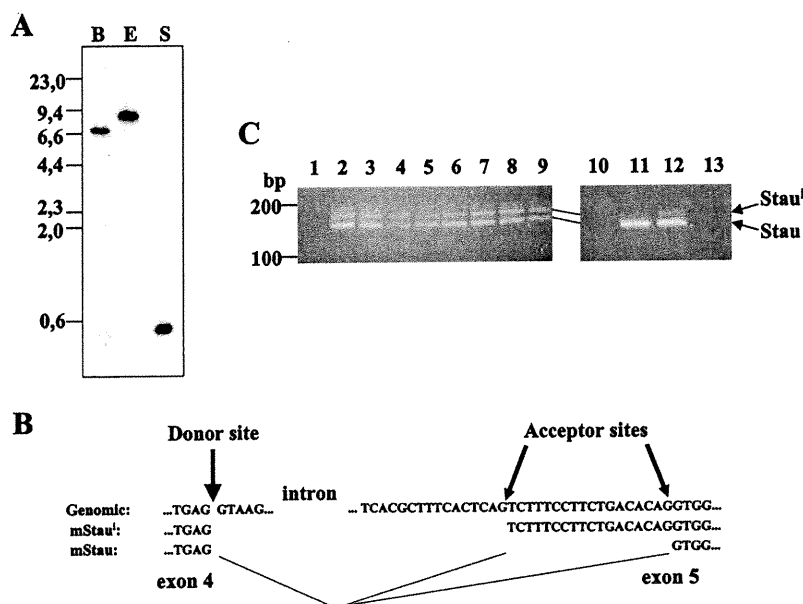


FIG. 2. Characterization of the *mStau* gene and transcripts. (A) Southern blot analysis. Mouse genomic DNA was digested with *Bam*HI (lane B), *Eco*RI (lane E), and *Sac*I (lane S), transferred to a nitrocellulose membrane, and hybridized with a 191-nucleotide cDNA fragment that covers a single exon (nucleotides 57 to 248). DNA molecular weight markers in kilobase pairs are indicated on the left. (B) Genomic characterization of the splicing sites. Genomic and cDNA sequences are aligned, and the positions of splicing consensus sequences are indicated. (C) Differential splicing of the *mStau* gene. RT-PCR amplification of mRNAs isolated from mouse tissues (lanes 2 to 9 and 13), human HeLa cells (lane 11), and monkey COS-1 cells (lane 12). Lane 2, brain; lane 3, heart; lane 4, liver; lane 5, lungs; lane 6, spleen; lane 7, kidney; lane 8, male genitals; lane 9, female genitals, lane 11, HeLa cells; lane 12, COS-1 cells; lane 13, mouse NIH/3T3; lanes 1 and 10, negative controls.

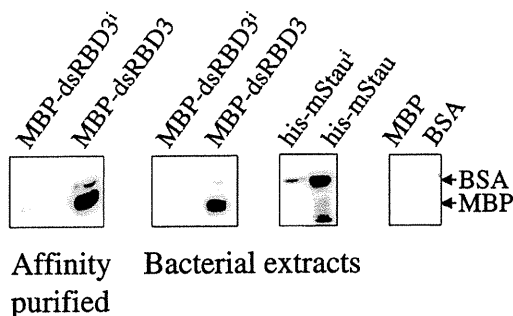


FIG. 3. RNA binding assay. Bacterially expressed dsRBD3 and full-length fusion proteins after affinity purification or in the crude bacterial extracts (as indicated) were electrophoresed on a polyacrylamide gel, transferred to nitrocellulose, and incubated with <sup>32</sup>P-labeled 3' UTR *bicoid* RNA. After extensive washing, bound RNA was detected by autoradiography. Controls included bacterial crude extract overexpressing MBP and 5  $\mu$ g of BSA.

western assay (46). While the MBP-dsRBD3 strongly bound the dsRNA probe, the binding of MBP-dsRBD3<sup>i</sup> was strongly impaired and detected only after an extended exposure time (Fig. 3). This difference in binding was observed both with the affinity-purified fusion proteins and the bacterial extracts. Impaired binding was also visible with the full-length protein, although the difference was less dramatic (Fig. 3). This can be explained by the presence of dsRBD4, a weak dsRBD that contributes to the dsRNA-binding activity of full-length proteins (46). Finally, under these conditions, the dsRNA probe did not bind other proteins in the bacterial extracts, overexpressed MBP, or BSA (Fig. 3). These results demonstrate that

the alternative splicing event produces a protein with impaired RNA-binding activity.

**Overexpressed mStau<sup>1</sup> localizes in discrete RER-containing granules.** We and others have reported that hStau localizes to the RER (29, 46). To determine the subcellular localization of mStau and mStau<sup>1</sup>, we constructed fusion proteins with a GFP or HA tag fused to the C-terminal end and transfected these constructs into COS-1 cells. We first observed by Western blotting that the fusion proteins were not degraded and that they were expressed at about the same levels (not shown). Their subcellular distribution was then observed by fluorescence microscopy. As observed for hStau-GFP, mStau-GFP also exhibited a distribution typical of the RER with an abundant tubulovesicular distribution (Fig. 4A). A different distribution was observed when COS-1 cells were transfected with the cDNA coding for mStau<sup>1</sup>-GFP (Fig. 4C). The protein was found in large clusters throughout the cytoplasm. Treatment of the cells with Triton X-100 prior to fixation did not wash away either the mStau-GFP (Fig. 4B) or mStau<sup>1</sup>-GFP (Fig. 4D) signal, indicating that both proteins are associated with cytoskeletal elements resistant to the detergent extraction. As reported previously (46), GFP alone showed a diffuse cytoplasmic distribution and was completely extractable by prior treatment with Triton X-100 (not shown). Quantifying the percentage of transfected cells exhibiting a granular or reticular distribution revealed that the vast majority of mStau<sup>1</sup>-transfected cells showed a granular distribution, while only a minority of mStau-transfected cells exhibited a granular distribution (Table 1). This indicates that overexpressed mStau and mStau<sup>1</sup> are different in subcellular distribution but that both can exhibit a granular and a reticular ER distribution.

As described earlier for hStau (46), confocal microscopy

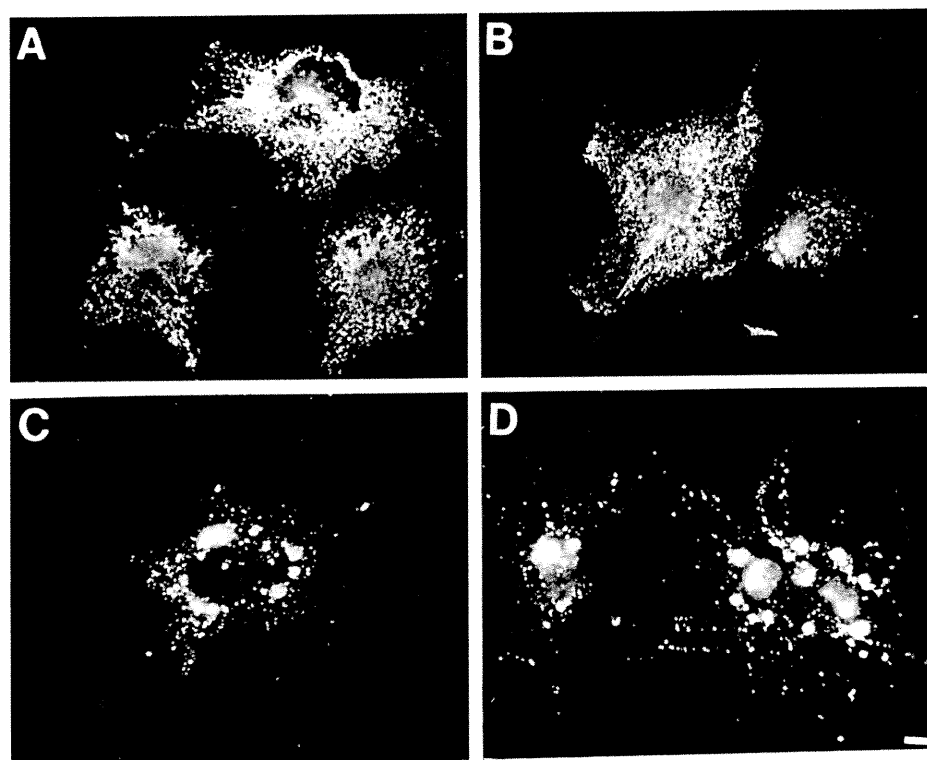


FIG. 4. Subcellular localization of the mStau and mStau<sup>1</sup> proteins. COS-1 cells were transfected with cDNAs coding for either mStau-GFP (A and B) or mStau<sup>1</sup>-GFP (C and D). Untreated cells (A and C) or Triton X-100-treated cells (B and D) were fixed, and GFP autofluorescence was visualized. Bar = 10  $\mu$ m.

TABLE 1. Subcellular localization of mStau and mStau<sup>i</sup> in COS-transfected cells

Determination	RER distribution (% of transfected cells)	Granular structure (% of transfected cells)
mStau <sup>i</sup> overexpression (48 h)		
mStau-transfected cells	86	14
mStau <sup>i</sup> -transfected cells	5	95
mStau <sup>i</sup> in mStau/mStau <sup>i</sup> -transfected cells	87	13
mStau <sup>i</sup> expression with time (h posttransfection)		
10	68	32
16	45	55
24	31	69
36	17	83

showed that mStau-GFP colocalizes with calnexin, an RER marker (Fig. 5A to C). In contrast, the granular labeling by mStau<sup>i</sup>-GFP is distinct from the reticular and tubulovesicular labeling of the ER by calnexin. Interestingly, the mStau<sup>i</sup>-containing granules also colocalized with calnexin (Fig. 5D to F). We conclude that the six-amino-acid insertion in mStau<sup>i</sup> induces a distinct distribution of the overexpressed protein com-

pared to mStau, although it apparently does not completely impair its ability to interact with the ER.

Since the mStau<sup>i</sup> and mStau isoforms are endogenously expressed in COS-1 cells, it is possible that the phenotype of cells overexpressing mStau<sup>i</sup> is due to an imbalance in the ratio of the two isoforms. To address this possibility, we first observed mStau<sup>i</sup>-transfected cells shortly after transfection in order to monitor mStau<sup>i</sup> distribution when minimal amounts of the protein are expressed. In these conditions, mStau<sup>i</sup> exhibited a tubulovesicular distribution typical of the RER in most of the cells; however, as mStau<sup>i</sup> accumulated in the cells with time, the percentage of cells exhibiting the granular distribution increased (Table 1). We also cotransfected COS-1 cells with mStau-HA and mStau<sup>i</sup>-GFP constructs and monitored the subcellular distribution of mStau<sup>i</sup>-GFP (Fig. 6). Determined by its colocalization with calnexin (Fig. 6A to C), coexpression of the two isoforms resulted in the absence of densely labeled granules and in the relocalization of mStau<sup>i</sup>-GFP to the reticular RER (Fig. 6A and Table 1). Interestingly, compared to the distribution of cotransfected mStau, mStau<sup>i</sup> seemed to be mostly distributed in the perinuclear RER and absent from the cell periphery (Fig. 6D to F). These results demonstrate that mStau<sup>i</sup> normally associates with the reticular RER, suggesting that this association requires interaction with mStau.

**mStau<sup>i</sup> is part of a multiple-isoform complex.** To determine whether mStau and mStau<sup>i</sup> are present in the same complexes,

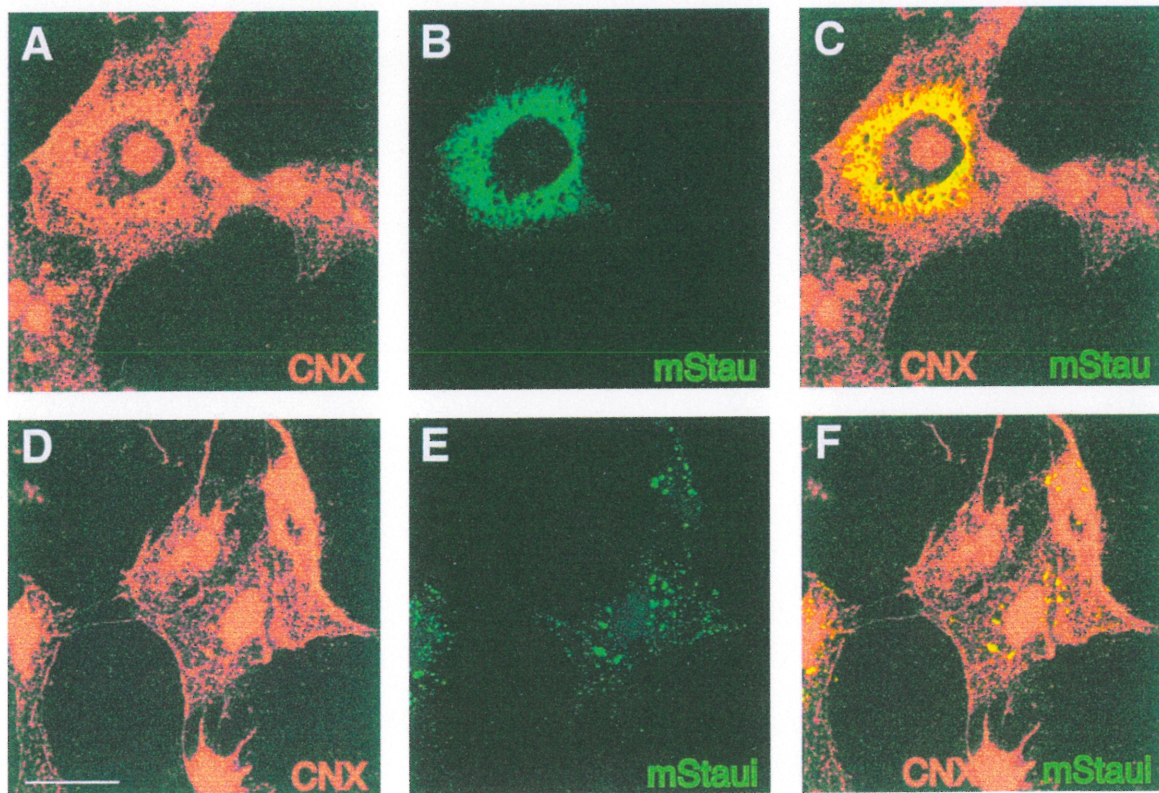


FIG. 5. Colocalization of mStau and mStau<sup>i</sup> with markers of the RER by confocal microscopy. cDNAs coding for mStau-GFP (A to C) and for mStau<sup>i</sup>-GFP (D to F) fusion proteins were transfected into COS-1 cells. Triton X-100-treated cells were fixed and labeled with anticalnexin (A and D). GFP was detected by autofluorescence using the FITC channel (B and E), whereas anticalnexin was detected with Texas red-conjugated anti-rabbit IgG antibodies using the rhodamine channel. C and F are superpositions of A and B and D and E, respectively. mStau colocalizes with calnexin (CNX)-labeled ER, and calnexin is associated with mStau<sup>i</sup>-labeled granules. Cells expressing mStau<sup>i</sup>-GFP, but not labeled with anticalnexin antibodies, and untransfected cells labeled for calnexin did not present a signal in the rhodamine and in the fluorescein channel, respectively, showing that the observed signals are specific. Bar = 10  $\mu$ m.

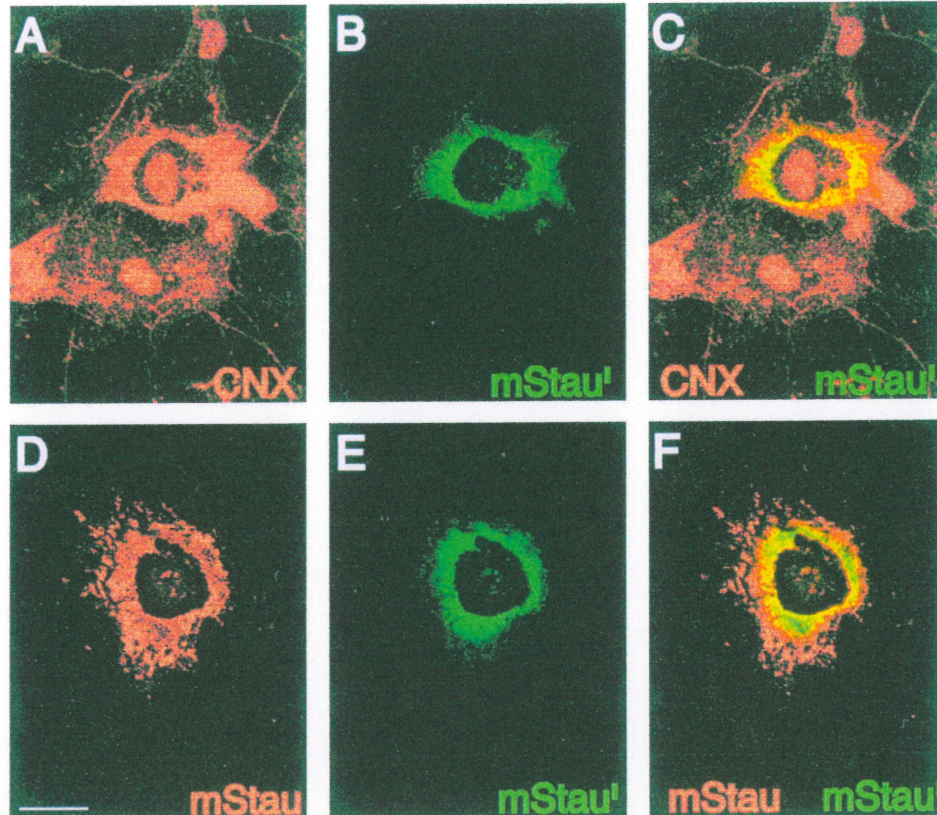


FIG. 6. Rescue of mStau<sup>1</sup> phenotype by coexpression of mStau. COS-1 cells were cotransfected with cDNAs coding for mStau<sup>1</sup>-GFP and mStau-HA fusion proteins. Triton X-100-treated cells were fixed and labeled with anti-calnexin (A) or anti-HA (D) antibodies. mStau<sup>1</sup>-GFP was detected by autofluorescence using the FITC channel (B and E), whereas anticalnexin and anti-HA were detected with Texas red-conjugated anti-rabbit IgG antibodies using the rhodamine channel. C and F are superpositions of A and B and D and E, respectively. Controls (as described in the legend to Fig. 5) demonstrated that the observed signals are specific. Bar = 10  $\mu$ m.

we performed coimmunoprecipitation assays from cells cotransfected with mStau and mStau<sup>1</sup>. COS-1 cells were cotransfected with mStau-HA and mStau<sup>1</sup>-GFP, and protein extracts were immunoprecipitated with anti-HA antibodies. The immunoprecipitated proteins were visualized by Western blotting using anti-hStau (Fig. 7A) and anti-GFP (Fig. 7B) antibodies. mStau<sup>1</sup>-GFP was present in the immunoprecipitated mStau-HA pellets, demonstrating that the two proteins are components of a common complex (lane 5). Symmetrical results were obtained when the tags on the proteins were interchanged: mStau-GFP was also detected in immunoprecipitates of mStau<sup>1</sup>-HA (lane 6). The controls that included the transfection of COS-1 cells with either mStau-GFP alone (lanes 1 and 2) or cotransfection of mStau-HA with GFP (lanes 3 and 4) were uniformly negative. The equal level of expression of each protein in the loading extracts was confirmed with anti-Staufen and anti-GFP antibodies on Western blots (not shown). Interestingly, a 55-kDa protein band corresponding to the size of the endogenous Staufen protein also coprecipitated with mStau-HA and mStau<sup>1</sup>-HA. That the mStau fusion proteins are localized with the endogenous protein is particularly significant. These results demonstrate that the two isoforms are components of the same complexes in vivo.

**mStau<sup>1</sup> modulates the amount of RNA in mStau-containing complexes.** The reduced capacity of mStau<sup>1</sup> to bind RNAs and its ability to associate with mStau in vivo suggest that mStau<sup>1</sup> could modulate the RNA-binding activity of the complexes and

thus regulate the amount of RNA associated with it. To test this hypothesis, we transfected COS-1 cells with different amounts of the two isoforms, immunoprecipitated HA-tagged complexes, and analyzed the RNA content of the resulting precipitates (Fig. 8A). Multiple RNA bands were easily visible when immunoprecipitation was done from mStau-HA/mStau-GFP-transfected cells (Fig. 8A, lane 3). In contrast, a significant reduction in the amount of RNAs was attained when immunoprecipitated RNAs from the mStau<sup>1</sup>-HA/mStau-GFP-transfected cells were analyzed (lane 4). This reduction was even more striking in the mStau<sup>1</sup>-HA/mStau<sup>1</sup>-GFP immunoprecipitates (lane 2). Western analysis of the amount of the immunoprecipitated proteins showed that the difference in the quantity of RNA cannot be due to less efficient immunoprecipitation of mStau<sup>1</sup>-containing complexes (Fig. 8B). This experiment was repeated three more times with the same results. We conclude that mStau is a component of complexes containing RNAs and that mStau<sup>1</sup> incorporation in these complexes modulates the amounts of associated RNA.

## DISCUSSION

Despite an increasing number of reports describing mRNA transport, only recently have the first *trans*-acting proteins in mammals been identified. Their functions, molecular characteristics, interacting partners, and regulation remain largely unknown. Staufen is known to bind dsRNA, to associate with

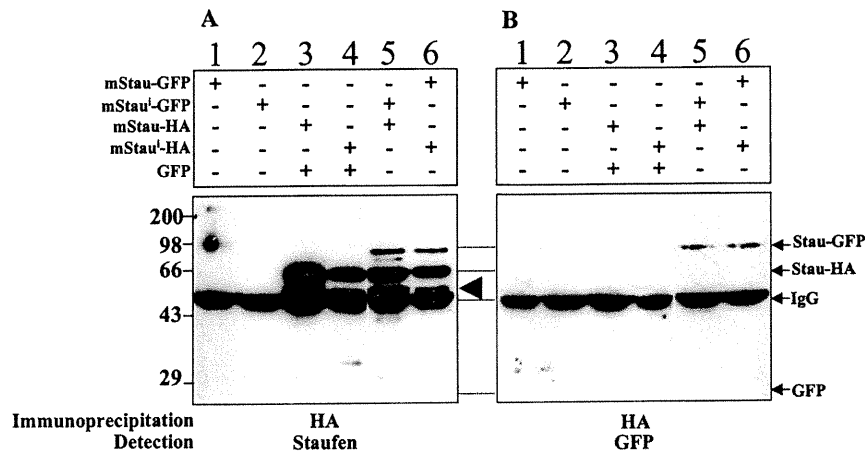


FIG. 7. mStau isoforms are present in the same complexes. Coimmunoprecipitation assay. Different combinations of tagged-Staufen isoforms were expressed in COS-1 cells as indicated above the gels. Cell extracts were immunoprecipitated with anti-HA antibodies, and the proteins were revealed by Western blotting using anti-hStau (A) and anti-GFP (B) antibodies. The positions of mStau/mStau<sup>1</sup>-GFP (Stau-GFP), mStau/mStau<sup>1</sup>-HA (Stau-HA), IgG, and GFP are indicated on the right. Numbers on the left are protein molecular weight markers in kilodaltons. The large arrowhead represents the position of the endogenous 55-kDa Staufen isoform.

polysomes, the RER, and elements of the cytoskeleton, and to be expressed as multiple isoforms in mammalian cells. However, it was unclear how these molecular and cellular characteristics are integrated to fulfill and regulate all Staufen functions. In this paper, we report the following: (i) the characterization of a novel Staufen isoform with impaired RNA-binding properties; (ii) that dsRBD3 is involved not only in RNA binding but also in the proper localization on the RER; (iii) that Staufen isoforms are components of a common RNA-protein complex in vivo; and (iv) that the ratio of mStau

and mStau<sup>1</sup> modulates the amount of RNA present in the complex.

**mStau<sup>1</sup> modulates the RNA content of the Staufen complexes.** This study provides the first biochemical evidence that Staufen is a component of RNA-protein complexes. The immunoprecipitation experiment demonstrates that mStau complexes contain a limited number of RNAs. This corroborates previous in vivo results that showed that Staufen-containing particles colocalized with RNA-containing granules (19, 25). This is also consistent with a putative role for mammalian Staufen in mRNA transport and localization and suggests that if Staufen plays additional roles in mammals, this role is likely to be related at least to some aspect of RNA processing. In *Drosophila*, genetic evidence suggests that Staufen may also be involved in the regulation of translation of localized RNAs (5).

The biochemical properties of mStau<sup>1</sup> are different from those of the other mouse Staufen isoforms at least at the level of the RNA-binding activity. Analysis of the amino acid sequence of dsRBD3<sup>1</sup> with the PHD software (37) shows that the insertion of the fragment SFLLTQ in the first beta strand results in major conformational changes within the whole region (Fig. 9). First, the insertion disturbs the alternate order of the hydrophobic and hydrophilic residues, which is crucial for the proper accommodation of the beta strand in the rest of the domain. Moreover, the three inserted hydrophobic residues (FLL) become part of a long  $\alpha$ -helical cluster, which will force the whole region to accept the helical conformation. Accordingly, the secondary structure of dsRBD3<sup>1</sup> is predicted to yield an  $\alpha$  helix characterized by a very high index of reliability. Thus, the insertion of six amino acids will probably result in a switch to an essentially different folding of the domain. We show here that it weakens the capacity of dsRBD3 to bind RNA in vitro. Further careful tests should show whether the insertion also changes the RNA recognition of mStau<sup>1</sup>, leading to a different dsRNA-binding specificity. Identification of the isolated RNAs should resolve this issue.

At least two scenarios are possible to explain how overexpression of mStau<sup>1</sup> contributes to reducing the RNA content of Staufen RNA-protein complexes. It is conceivable that mStau and mStau<sup>1</sup> form heterodimers that are less functional than mStau homodimers for binding RNA. Members of the dsRBD family have been shown to form homo- and heterodimers (4, 9,

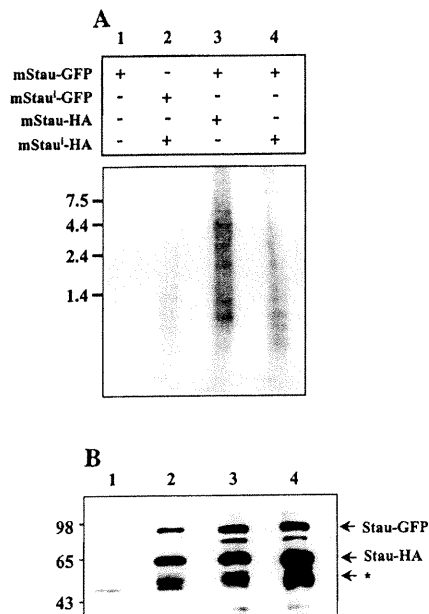
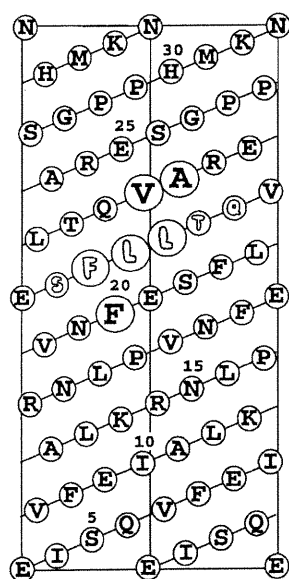


FIG. 8. Expression of mStau<sup>1</sup> modulates the amount of RNAs in Staufen-containing particles. COS-1 cells were transfected with different combinations of the two Staufen isoforms as indicated above the gel, and the proteins were immunoprecipitated with anti-HA antibodies. RNAs were purified and separated on formaldehyde-agarose gels and analyzed by hybridization using <sup>32</sup>P-labeled random oligonucleotides (A). (B) Proteins from the same immunoprecipitates were analyzed by SDS-PAGE and detected by Western blotting using anti-Staufen antibodies.



	10	20	30	40	50	60	...
AA	KSEISQVFEALKRNLPVNF-----VARESGPPHMKNFVTRVSVGGEFVGE GEGKSKKISKKNAAARAVLEQL						
PHD_sec	HHHHHHH EEE-----EEE EEEEE EEEE HHHHHHHHHHHH						
Rel_sec	999545887554169826899-----84169995455358888621377367988962248999999999949						
SUB_sec	LLLL.HHHHHH.LLL.EEEE-----E.LLLLL.LL.EEEEE...EE.LLLLLL...HHHHHHHHH.L						
AA	KSEISQVFEALKRNLPVNFESFLLTQVARESGPPHMKNFVTRVSVGGEFVGE GEGKSKKISKKNAAARAVLEQL						
PHD_sec	HHHHE E EE HHHHHHHH EEEEEEEEEEE HHHHHHHHHHHH						
Rel_sec	99954034211145762113432255789864981122417886752145227988851227999999999959						
SUB_sec	LLLL.....LLL.....HHHHHHH.LL.....EEEEEE...E.LLLLLL...HHHHHHHHHHH.L						

FIG. 9. Effect of the SFLLTQ insertion on the structure of mStau<sup>1</sup>. (Top) The  $\alpha$ -helical surface of the mStau<sup>1</sup> region that includes the insertion. The six inserted residues are shown in fancy letters. Enclosed in large circles, the three inserted residues FLL plus residues F20, V22, and A23 form a wide hydrophobic cluster that can effect the secondary structure of the whole region. (Bottom) Prediction of the secondary structure for mStau (upper part) and mStau<sup>1</sup> (lower part) with use of the PHD software package. AA, amino acid sequence. PHD\_sec (predicted secondary structure): H, helix; E, extended (sheet); blank, other (loop). Rel\_sec, reliability index for the PHD\_sec prediction (0 = low to 9 = high); Sub\_sec, subset of the PHD\_sec predictions, for all residues with an expected average accuracy >82%. The insertion of the six amino acids between residues 21 and 22 changes the secondary structure of the whole region from  $\beta$  structure to  $\alpha$  helix.

38). RNA-dependent kinase activity is indeed dependent on dimer formation. Its activity can be regulated by the formation of inactive heterodimers, due to mutation in one of the monomers (35). Rescue of the mStau<sup>1</sup> phenotype by mStau and coimmunoprecipitation experiments showing that the two isoforms are present in the same complex are consistent with the hypothesis that they form heterodimers. Furthermore, preliminary pull-down assays suggest that Staufens interacts with itself in vitro (our unpublished data). Another possibility is that mStau<sup>1</sup> competes with mStau for a limited number of binding sites within RNA-protein complexes. Since mStau<sup>1</sup> binds RNA less efficiently than mStau, its incorporation in mStau complexes would also reduce the amount of RNA associated with the complex.

**mStau<sup>1</sup> and the RER.** The localization of mStau<sup>1</sup> to cytoplasmic granules is likely a consequence of the overexpression of mStau<sup>1</sup>: these structures are not observed endogenously and are visible in a low percentage of mStau-transfected cells. However, the rescue experiment shows that the formation of granules is due not to the overexpression of mStau<sup>1</sup> per se but rather to an imbalance in the ratio of the two isoforms and that under normal conditions, mStau<sup>1</sup> is associated with the reticular RER. One plausible explanation is that mStau<sup>1</sup> cannot be properly localized independent of mStau, with which it associates in vivo. Can its normal distribution to reticular RER occur only in this form? This would suggest that mStau<sup>1</sup> is likely a regulator of mStau function, as shown here for RNA incorporation in the mStau complexes. Interestingly, tendon cell differentiation in *Drosophila* was shown to be modulated by the

balance between two isoforms of the RBP How (31). It is likely that the granular mStau<sup>1</sup> phenotype is due to the structural modification of dsRBD3 or to its reduced RNA-binding activity. The formation of similar granules following overexpression of a mutant with a point mutation that completely abolishes the dsRBD3 RNA-binding activity, but not the structure of the domain, is consistent with the second hypothesis (M. Luo and L. DesGroseillers, unpublished data).

The observation that in contrast to mStau, mStau<sup>1</sup> is restricted to the perinuclear region and absent from the cell periphery suggests that the differential capability of Staufens isoforms to interact with RNA ligands is somehow involved in recognizing or regulating RER compartmentalization. Alternatively, since transport of RNP complexes was shown to be RNA dependent in *Drosophila*, complexes containing mStau<sup>1</sup> may be unable to integrate the signal required for transport of the RNPs and association with RER tubulovesicles. One consequence of this hypothesis is that RER dynamics might be somehow coupled to RNA transport. The formation of static ER subdomains appearing as large clusters or granule-like structures when mStau<sup>1</sup> is overexpressed supports this view. Therefore, under normal conditions, one of the functions of mStau<sup>1</sup> could be to regulate the transport of Staufens-containing granules.

In summary, our results show that mStau<sup>1</sup> is present in complexes that also contain mStau and that the presence of mStau<sup>1</sup> drastically reduces the ability of the complex to associate with RNA, suggesting that it has a role as a regulator of mStau function. Demonstration of this putative regulatory role is not



an easy task because mStau is poorly soluble in vitro and no specific RNA-binding activity or endogenous RNA ligands have so far been described. However, our report, which describes the identification of the isolated RNAs and the use of the RNA immunoprecipitation assay to detect RNA candidates, will facilitate further study of endogenous RNA targets. We believe that this is the key to understanding the function of mStau isoforms in vivo. Our results present an important step in the study of regulation of mRNA transport and localization in mammals.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Michael Kiebler and Gopal Subramaniam for critical reading of the manuscript, Judith Kashul for editing the manuscript, Frédéric Brizard for sharing unpublished data, Louise Cournoyer for help with tissue culture, and Danny Baranes for help with confocal microscopy. We also thank Michael Kiebler and Kavish Hemraj for help and support.

This work was supported by a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) grant to L.D. and a Medical Research Council of Canada grant to I.R.N. S.V.S. is a fellow of le Fonds de la Recherche en Santé du Québec. T.D. was supported by an NSERC studentship.

#### REFERENCES

- Ainger, K., D. Avossa, F. Morgan, S. J. Hill, C. Barry, E. Barbarese, and J. H. Carson. 1993. Transport and localisation of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes. *J. Cell Biol.* 123:431-441.
- Bassell, G. J., and R. H. Singer. 1997. mRNA and cytoskeletal filaments. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:109-115.
- Bassell, G. J., H. Zhang, A. L. Byrd, A. M. Femino, R. H. Singer, K. L. Taneja, L. M. Lifshitz, I. M. Herman, and K. S. Kosik. 1998. Sorting of beta-actin mRNA and protein to neurites and growth cones in culture. *J. Neurosci.* 18:251-265.
- Benkirane, M., C. Neuvant, R. F. Chun, S. M. Smith, C. E. Samuel, A. Gatignol, and K.-T. Jeang. 1997. Oncogenic potential of TAR RNA binding protein TRBP and its regulatory interaction with RNA-dependent protein kinase PKR. *EMBO J.* 16:611-624.
- Breitwieser, W., F.-H. Markussen, H. Horstmann, and A. Ephrussi. 1996. Oskar protein interaction with Vasa represents an essential step in polar granule assembly. *Genes Dev.* 10:2179-2188.
- Brizard, F., M. Luo, and L. DesGroseillers. Genomic organization of the human and mouse *stau* genes. *DNA Cell Biol.*, in press.
- Broadus, J., S. Fuerstenberg, and C. Q. Doe. 1998. Staufen-dependent localisation of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature* 391:792-795.
- Bycroft, M., S. Grunert, A. G. Murzin, M. Proctor, and D. St. Johnston. 1995. NMR solution structure of a dsRNA binding domain from *Drosophila* stau protein reveals homology to the N-terminal domain of ribosomal protein S5. *EMBO J.* 14:3563-3571.
- Cosentino, G. P., S. Venkatesan, F. C. Serluca, S. Green, M. B. Mathews, and N. Sonenberg. 1995. Double-stranded-RNA-dependent protein kinase and TAR RNA-binding protein form homo- and heterodimers *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:9445-9449.
- Deshler, J. O., M. I. Highett, and B. J. Schnapp. 1997. Localisation of *Xenopus* Vg1 mRNA by Vera protein and the endoplasmic reticulum. *Science* 276:1128-1131.
- Deshler, J. O., M. I. Highett, T. Abramson, and B. J. Schnapp. 1998. A highly conserved RNA-binding protein for cytoplasmic localisation in vertebrates. *Curr. Biol.* 8:489-496.
- Etkin, L. D., and H. D. Lipshitz. 1999. RNA localisation. *FASEB J.* 13:419-20.
- Ferrandon, D., L. Elphick, C. Nüsslein-Volhard, and D. St. Johnston. 1994. Stau protein associates with the 3' UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* 79:1221-1232.
- Ferrandon, D., I. Koch, E. Westhof, and C. Nüsslein-Volhard. 1997. RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3' UTR-staufen ribonucleoprotein particles. *EMBO J.* 16:1751-1758.
- Gunkel, N., T. Yano, F. H. Markussen, L. C. Olsen, and A. Ephrussi. 1998. Localisation-dependent translation requires a functional interaction between the 5' and 3' ends of oskar mRNA. *Genes Dev.* 12:1652-1664.
- Havin, L., A. Git, Z. Elisha, F. Oberman, K. Yaniv, S. P. Schwartz, N. Standart, and J. K. Yisraeli. 1998. RNA-binding protein conserved in both microtubule- and microfilament-based RNA localisation. *Genes Dev.* 12:1593-1598.
- Hoek, K. S., G. J. Kidd, J. H. Carson, and R. Smith. 1998. hnRNP A2 selectively binds the cytoplasmic transport sequence of myelin basic protein mRNA. *Biochemistry* 37:7021-7029.
- Jockers, R., A. Da Silva, A. D. Strosberg, M. Bouvier, and S. Marullo. 1996. New molecular and structural determinants involved in  $\beta$ 2-adrenergic receptor desensitization and sequestration. *J. Biol. Chem.* 271:9355-9362.
- Kiebler, M. A., I. Hemraj, P. Verkade, M. Kohrmann, P. Fortes, R. M. Marion, J. Ortin, and C. G. Dotti. 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.
- Kiebler, M. A., and L. DesGroseillers. 2000. Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron* 25:19-28.
- Kim-Ha, J., J. L. Smith, and P. M. Macdonald. 1991. Oskar mRNA is localised to the posterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Cell* 66:23-35.
- Kim-Ha, J., K. Kerr, and P. M. Macdonald. 1995. Translational regulation of oskar mRNA by Bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential. *Cell* 81:403-412.
- Kislauskis, E. H., X. Zhu, and R. H. Singer. 1997.  $\beta$ -actin messenger RNA localisation and protein synthesis augment cell motility. *J. Cell Biol.* 136:1263-1270.
- Knowles, R. B., J. H. Sabry, M. E. Martone, T. J. Deerinck, M. H. Ellisman, G. J. Bassell, and K. S. Kosik. 1996. Translocation of RNA granules in living neurons. *J. Neurosci.* 16:7812-7820.
- Köhrmann, M., M. Luo, C. Kaether, L. DesGroseillers, C. G. Dotti, and M. A. Kiebler. 1999. Microtubule-dependent recruitment of Stau-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol. Biol. Cell* 10:2945-2953.
- Krovat, B. C., and M. F. Jantsch. 1996. Comparative mutational analysis of the double-stranded RNA binding domains of *Xenopus laevis* RNA-binding protein A. *J. Biol. Chem.* 271:28112-28119.
- Li, P., X. Yang, M. Wasser, Y. Cai, and W. Chia. 1997. Inscutable and stau protein mediate asymmetric localisation and segregation of prospero RNA during *Drosophila* neuroblast cell divisions. *Cell* 90:437-447.
- Long, R. M., R. H. Singer, X. Meng, I. Gonzalez, K. Nasmyth, and R.-P. Jansen. 1997. Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localisation of ASH1 mRNA. *Science* 277:383-387.
- Marión, R. M., P. Fortes, A. Beloso, C. Dotti, and J. Ortin. 1999. A human sequence homologue of Stau 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., A. Casadio, H. Zhu, E. Yaping, J. C. Rose, M. Chen, C. H. Bailey, and E. R. Kandel. 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.
- Nabel-Rosen, H., N. Dorevitch, A. Reuveny, and T. Volk. 1999. The balance between two isoforms of the *Drosophila* RNA-binding protein how controls tendon cell differentiation. *Mol. Cell* 4:573-584.
- Nakiely, S., U. Fischer, W. M. Michael, and G. Dreyfuss. 1997. RNA transport. *Annu. Rev. Neurosci.* 20:269-301.
- Norvell, A., R. L. Kelley, K. Wehr, and T. Schupbach. 1999. Specific isoforms of squid, a *Drosophila* hnRNP, perform distinct roles in Gurken localisation during oogenesis. *Genes Dev.* 13:864-876.
- Pokrywka, N. J., and E. C. Stephenson. 1995. Microtubules are a general component of mRNA localisation systems in *Drosophila* oocytes. *Dev. Biol.* 167:363-370.
- Romano, P. T., S. R. Green, G. N. Barber, M. B. Mathews, and A. G. Hinnebusch. 1995. Structural requirements for the double-stranded RNA binding, dimerization, and activation of the human eIF-2 $\alpha$  kinase DAI in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 15:365-378.
- Ross, A. F., Y. Oleynikov, E. H. Kislauskis, K. L. Taneja, and R. H. Singer. 1997. Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol. Cell Biol.* 17:2158-2165.
- Rost, B., and C. Sander. 1993. Prediction of protein structure at better than 70% accuracy. *J. Mol. Biol.* 232:584-599.
- Schmidt, C., S. R. Green, L. Manche, D. R. Taylor, Y. Ma, and M. B. Mathews. 1995. Functional characterization of the RNA-binding domain and motif of the double-stranded RNA-dependent protein kinase DAI (PKR). *J. Mol. Biol.* 249:29-44.
- Schuldt, A. J., J. H. Adams, C. M. Davidson, D. R. Micklem, J. Haseloff, D. St. Johnston, and A. H. Brand. 1998. Miranda mediates asymmetric protein and RNA localisation in the developing nervous system. *Genes Dev.* 12:1847-1857.
- Steward, O. 1997. mRNA localisation in neurons: a multipurpose mechanism? *Neuron* 18:9-12.
- St. Johnston, D., W. Driever, T. Berleth, S. Riehl, and C. Nüsslein-Volhard. 1989. Multiple steps in the localisation of bicoid RNA to the anterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Dev. Suppl.* 107:13-19.
- St. Johnston, D., D. Beuchle, and C. Nüsslein-Volhard. 1991. Stau protein, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* 66:51-63.

43. **St. Johnston, D., N. H. Brown, J. G. Gall, and M. Jantsch.** 1992. A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:10979-10983.
44. **St. Johnston, D.** 1995. The intracellular localisation of messenger RNAs. *Cell* **81**:161-170.
45. **Takizawa, P. A., A. Sil, J. R. Swedlow, I. Herskowitz, and R. D. Vale.** 1997. Actin-dependent localisation of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast. *Nature* **389**:90-93.
46. **Wickham, L., T. Duchaine, M. Luo, I. R. Nabi, and L. DesGroseillers.** 1999. Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 2220-2230.
47. **Wilhelm, J. E., and R. D. Vale.** 1993. RNA on the move: the mRNA localisation pathway. *J. Cell Biol.* **123**:269-274.

**Article 3 : ISOFORMS OF STAU2 LOCALIZE ON DENDRITIC MICROTUBULES AND  
ASSOCIATE WITH RIBOSOMES IN NEURONS.**

### **Mise en contexte**

Après le clonage de Stau1, les travaux réalisés en collaboration avec l'équipe de M. Kiebler ont suggéré une implication de cette protéine dans le transport d'ARN dans les dendrites. Cependant, la distribution très large de cette protéine supportait plutôt une fonction plus générale dans les différents types cellulaires. Il ne fut donc pas surprenant d'identifier un deuxième homologue principalement dans le cerveau. Cet article présente une caractérisation, par des techniques de biologie cellulaire et de biochimie, des isoformes de Stau2 en exploitant la culture primaire de neurones.

## Note

-Contribution de chacun des auteurs :

T. Duchaine : Participation au clonage et au séquençage des homologues murin et humain de Stau2, Northern, cultures primaires de neurones corticaux, caractérisation des anticorps, immunobuvardages, sédimentations, gradients de sucrose, immunoprécipitations.

I. Hemraj: Immunofluorescences, microscopie.

L. Furic : Préparation des anticorps polyclonaux, RT-PCR, constructions et cartographie des domaines fonctionnels.

M. Kiebler : Culture primaire de neurones d'hippocampe.

L. DesGroseillers : Supervision générale.

Article en préparation, soumission à l'automne 2001.

**Isoforms of Stau2 localize on dendritic microtubules and associate with  
ribosomes in neurons**

Thomas Duchaine<sup>1</sup>, Kavish Hemraj<sup>2</sup>, Luc Furic<sup>1</sup>, Michael A. Kiebler<sup>2</sup> and Luc  
DesGroseillers<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, <sup>3</sup>Centre de Recherches en Sciences Neurologiques,  
University of Montreal, Montreal, Canada; <sup>2</sup>Max-Planck-Institute for Developmental  
Biology, Tuebingen, Germany.

\*: To whom correspondence should be addressed.

Luc DesGroseillers

Department of Biochemistry

University of Montreal,

P.O. Box 6128, Station Centre Ville,

Montreal, Quebec, Canada

H3C 3J7

Phone: [REDACTED]

Fax: (514)-343-2210

email: [REDACTED]

## ABSTRACT

Staufen, a double-stranded RNA-binding protein is involved in both the cytoplasmic transport of mRNAs in subcellular domains of *Drosophila* oocytes and in the regulation of local translation. To understand the mechanism of the mRNA localization in mammals, we identified and characterized Staufen homologues. In this paper, we report the molecular and cellular characterization of Stau2, a second member of the Staufen family in mammals. Stau2 is 41% identical to Stau1 and as expected it binds dsRNA mainly through its double-stranded RNA-binding domain 3 (dsRBD3). Alternative splicing generates at least three isoforms of the protein, two of which lack the N-terminal half of dsRBD1. Stau2 is mainly expressed in the brain in contrast to Stau1 which is widely expressed in tissues. In neurons, Stau2 is observed in the somato-dendritic compartment where it colocalizes with calnexin, a marker of the rough endoplasmic reticulum. In dendrites, Stau2 is aligned on microtubules. We used multiple biochemical techniques to demonstrate that Stau2<sup>59</sup> and Stau2<sup>52</sup> interact with ribosomes. This interaction is stable and resistant to RNase treatment. Fractionation through sucrose gradients in the presence of EDTA further demonstrates that these isoforms are associated with both the 40S and 60S ribosomal subunits. Interestingly, Stau2/ribosome interaction is not affected by the presence of drugs that inhibit translation showing that this association is independent of translational activity. With the previous demonstration that Stau1 also associates with ribosomes, our results suggest that Stau/ribosome interaction is a key feature for Staufen's function in mammals. It also suggests that, in addition to its putative role in

the RNA transport in neurons, Stau2 is also implicated in the translational control of localized mRNAs.



## INTRODUCTION

Cytoplasmic mRNA transport and anchoring to defined subcellular domains allows efficient spatial and temporal restriction of genetic expression (1, 2, 9, 14, 25, 28, 31). This phenomenon is observed in a large variety of cell types and organisms. RNA transport is thought to be initiated by the recognition of cis-acting RNA motifs by RNA-binding protein(s) and their assembly into ribonucleoprotein (RNP) complexes. RNPs are then recruited and transported on the cytoskeleton and anchored to their final destination. To restrict the expression of mRNA to the appropriate time and place, its translation must be tightly coupled to the transport.

In *Drosophila*, Staufen (29), a double-stranded RNA-binding protein is involved in at least three distinct mRNA localization events (28). During oogenesis, Staufen is necessary to anchor *bicoid* (*bcd*) transcripts to the anterior pole of the oocytes and to localize *oskar* (*osk*) mRNA to the posterior pole. In the latter pathway, Staufen is further involved in the regulation of the *oskar* translation (16). Later, during neurogenesis, Staufen asymmetrically localizes *prospero* (*pros*) mRNA to the apical crescent of dividing neuroblasts (6, 20). Molecular characterization of Staufen's functions demonstrated that both Staufen/RNA and Staufen/protein interactions occur during the processes of localization (12, 20, 22, 24). Dissection of the protein indicated that dsRBD3 is the major RNA-binding domain (22, 30). In contrast, dsRBD2 and dsRBD5 do not bind RNA. Nevertheless, while dsRBD2 is required for localization of *oskar* mRNA at the posterior pole, dsRBD5 allows the derepression of its translation once localized (22). Similarly, dsRBD5 is involved in

*bicoid* and *prospero* mRNA localization in oocytes and neuroblasts, respectively (22). Most likely, dsRBD5 establishes a protein-protein interaction since it was shown to bind Miranda in neuroblasts (24). The role(s) of dsRBD1 and dsRBD4 which only weakly bind RNA *in vitro* is still unknown. Conservation of the overall structure and of the primary sequence of corresponding dsRBDs among Staufen homologues in different species suggests that these domains have kept their unique functional features throughout evolution.

We (32) and others (21) have cloned and characterized Stau1, a first mammalian Staufen homologue. This protein has a dsRNA-binding activity, cosediments with polyribosomes, and is localized to the rough endoplasmic reticulum (RER) *in vivo*. In mammalian neurons, Stau1 was detected as particles in the soma and dendrites but not in axons (15, 23). Using a Stau1/GFP fusion protein, we observed Stau1 movement in dendrites of living neurons (18). Stau1/GFP showed a rapid (average 6,4  $\mu\text{m}/\text{min}$ ) movement along the cytoskeleton axis. Moreover, many of these moving particles co-localized with the RNA-labeling dye CYTO-14, showing that Stau1 is a component of ribonucleoprotein complexes. These observations along with the evolutionary conservation of the protein structure strongly support the involvement of Stau1 in RNA transport in mammalian cells.

Recently, a second Staufen homologue (Stau2) located on chromosome 8 has been reported based on genomic and EST analyses (7). Here, we demonstrate the existence of two additional Stau2 isoforms generated by differential splicing and we report their cellular and molecular characterization. Because Stau2 is mainly expressed in brain, our studies concentrate on its characterization in neurons. We

show that Stau2 has many features in common with Stau1, which suggests that they have evolved from a common ancestor. However, they have also diverged in other aspects that may allow them to play different although complementary role(s) in neurons.

## MATERIALS AND METHODS

### Molecular cloning of Stau2

Human brain cDNA (Clontech) and fetal mouse cDNA (a generous gift of Dr A. Royal) libraries ( $10^5$  PFU each) were screened with a [ $^{32}$ P]labeled partial mouse Stau2 cDNA fragment as described previously (32). 5'RACE were performed on RNA isolated from human (Clontech) and mouse brains using the Mo-MuLV reverse transcriptase and the RT-primer 5'-GACAGGCATATTTCTCTTCAGCG-3' as described before (32). An oligo(A) tail was added at the 3' end of the resulting cDNA with terminal transferase. This fragment was PCR-amplified for 10 cycles (94°C for 2 min, 52°C for 2 min and 72°C for 2 min) using the Vent DNA polymerase (New England BioLabs), the sense oligonucleotide 5'-TGAGGTGGTTGCCACAGGAGG(T)<sub>20</sub>-3' and the RT-primer. Nested PCR was performed for 30 cycles (94°C for 2 min, 52°C for 2 min and 72°C for 2 min) with the primer pair 5'-TGAGGTGGTTGCCACAGGAGG-3' and 5'-CAGCATTGTGTCTGGCAGCTTG-3'. Positive clones were sequenced by the dideoxynucleotide method according to Sequenase protocols (United States Biochemical Corp.) or with an automatic sequencer (373A Stretch XL; Université Laval, Québec) and overlapping PCR fragments and cDNAs were ligated to generate full-length cDNAs.

### RNA analysis

For Northern blotting, mouse tissues were dissected and the total RNA immediately prepared using Trizol (Gibco BRL). Poly(A)<sup>+</sup> RNA was isolated with the Oligo(dT)–cellulose matrix. Poly(A)<sup>+</sup> RNAs (4 µg) were loaded on a denaturing formaldehyde agarose gel and transferred to a nylon Hybond N+ membrane. Hybridization was carried out with the ExpressHyb solution (Clontech) as proposed by the supplier. Three [<sup>32</sup>P]labeled probes were used: a fragment coding for the C-terminus of Stau2 (BamHI site to the Stop codon), a fragment coding for the C-terminus of Stau1 (EcoRI to the Stop codon) and a fragment coding for the entire open reading frame of mouse actin.

RT-PCR assays were performed with total RNA isolated from different tissues using the RNA PCR kit (Applied Biosystems). To determine the relative abundance of the Stau2<sup>62</sup> and Stau2<sup>59</sup> transcripts in a tissue, we RT-PCR amplified in a single reaction tube isolated RNA with the sense 5'-CGCAGTTTTGTGGAGCTGTGAGGG-3' and antisense 5'-CCATGTCTGCTCGCCAAGACTCAG-3' oligonucleotides. These primers flank the alternatively spliced exon and therefore amplified both transcripts. Different amounts of the starting RNA (250 to 1000 ng) and the number of PCR cycles (94°C for 2 min, 52°C for 2 min and 72°C for 2 min) were compared to assure that the amplification is below the level of PCR saturation and that the ratio of the two bands does not vary with the number of cycles used.

### Northwestern assay

To construct the maltose-binding protein (MBP)/Stau2<sup>59</sup> (MBP-FL) fusion protein, the full-length  $\lambda$ GT10 cDNA insert was first cloned in bluescript SK and then digested with *SalI* and *SacI* for cloning in the corresponding sites of the pMalC vector (New England Biolabs). To construct GST-1 to GST-5, the DNA fragments coding for different Stau2 domains were PCR-amplified with the Vent DNA polymerase (NEB), cloned in Bluescript SK at the *EcoRV* site and subcloned in pGEX-T using the *SalI* and *NotI* restriction sites. To construct the GST-1 fusion protein, we used the sense 5'-TTCTCTCCAAGATAAAAATGGCAAACCC-3' and antisense 5'-AGACTTTTCTGGAATTGGCTCAATCTG-3' primers. Similarly, GST-2, GST-3, GST-4 and GST-5 fusion proteins were constructed with 5'-GAGGGATACGGAAGTTTGATC-3' and 5'-AGACTTTTCTGGAATTGGCTCAATCTG-3'; 5'-ACAGATTGAGCCAATTCCAGAAAAGTCT-3' and 5'-GTTTTGGCTTCTCTACCACAGG-3'; 5'-TCCTGTGGTAGAGAAGCCAAAAC-3' and 5'-GAGCGGATCCTGAAGACTGGTG-3', and with 5'-CACCAGTCTTCAGGATCCGCTC-3' and 5'-ATTCGTTTCCTAGAACACAGACACC-3' oligonucleotides, respectively. Northwestern assays were performed as described previously (Wickham et al. 1999) using [<sup>32</sup>P]labeled bicoid 3'UTR RNA as probe.

### **Production of Stau2-specific antibodies**

Construct GST-5 encoding the C-terminus portion of Stau2 was expressed in BL21 pLysS DE3 (Invitrogen) and affinity purified on a Glutathion Sepharose matrix (Amersham Pharmacia). The Stau2 C-terminus peptide was eluted from the column by cleavage with thrombin. Mice were immunized by multiple injection of 10  $\mu$ g of antigen per injection, as described previously (10). Spleens from Stau2 positive mice were isolated and monoclonal antibodies (1C6) were prepared. Polyclonal antibodies were prepared by injecting rabbits with 40  $\mu$ g of antigen per injection, as described previously (32). For Western blotting, the 1C6 monoclonal antibody was used at a dilution of 1:500. No Stau2-specific signal was obtained either with the pre-immune serum isolated from the corresponding mouse or with the monoclonal antibodies that recognized hemagglutinin (not shown). Furthermore, pre-incubation of the monoclonal antibody with the GST-5 antigen coupled to Sepharose abolished the Stau2-specific signal (not shown). Finally, the monoclonal antibody did not recognize Stau1 (not shown). Rabbit polyclonal antibodies (dilution 1:500) were also tested for their specificity. Pre-immune serum and adsorption of the immune serum with the Stau2 antigen gave no specific signal (not shown).

### **Western blot assay**

Western blotting was carried out as previously described (Wickham et al. 1999). Human autoimmune P serum (a generous gift of Dr M. Reichlin) and rabbit anti-L7a antiserum (a generous gift of Dr A. Ziemięcki) were used to detect

ribosomes. Monoclonal anti-calnexin (Stressgene, BC, Canada), anti- $\alpha$ -tubulin (ICN, CA, USA) and AE-4 (Santa Cruz Biotechnology) antibodies were used to detect endoplasmic reticulum,  $\alpha$ -tubulin and histone H1 respectively.

### **Primary cultures of neurons**

Hippocampal neurons were isolated and cultured as described before (15). Cortical neurons were isolated and cultured as described before (3, 26), with the following modifications. Briefly, cerebral cortex was dissected from embryonic day 17-18 Sprague Daley rats and digested with 0.25% trypsin. Neurons were plated at high density on poly-L-lysine-coated (10  $\mu$ g/ml, overnight) and laminin-coated (2 ng/ml for 4 hr) 150 mm tissue culture dishes. After neurons had attached to the substrate (4 hr) in MEM + 10% horse serum, cultures were allowed to differentiate in glutamate-free MEM with N2 supplements including transferrin (100  $\mu$ g/ml), insulin (5  $\mu$ g/ml), progesterone (20 nM), putrescine (100  $\mu$ M), and selenium dioxide (30 nM). In addition, extra glucose (600 mg/l), sodium pyruvate (1 mM), ovalbumin (0.1%), and 5% FBS were added to the media. For the biochemistry experiments, cells were allowed to achieve polarity for 5 days prior extraction. For the confocal microscopy, cortical cells were cultured at low density (2,000,000 cells per 60 mm dish) for 10 days.

### **Immunofluorescence**

For confocal microscopy, immunofluorescence was carried out as in (32). To detect ribosomes, we used the human anti-P antiserum while as a secondary antibody, was used the Alexa fluor 568-conjugated goat anti-human antibody (Molecular



Probes). Stau2 was detected with the rabbit polyclonal antiserum and an Alexa fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG. Images were taken on a Leica DM IRBE microscope (True Confocal Scan- Spectral Photomultiplier) and processed with the Leica PowerScan TCS-NT software package.

### **Cytoplasmic extract preparation and crude cell fractionation**

Cytoplasmic extracts were prepared from high density cultures of cortical neurons. Neurons were washed in cold PBS (pH 7.5), then in isotonic buffer (110 mM KOAc, 2 mM MgOAc, 1 mM DTT, 10 mM HEPES, pH 7.5) and recovered with a rubber policeman in hypotonic buffer (10 mM KOAc, 2 mM MgOAc, 1 mM DTT, 5 mM HEPES pH 7.5) supplemented with 1 U/ml RNase inhibitors and EDTA-free COMPLETE protease inhibitor cocktail (Roche). Cells were broken by two sets of 20 strokes in a 23-gauge syringe followed by centrifugation at 1,500 x g for 10 min. Supernatants were adjusted to 100 mM KCl and allowed to stand on ice for 30min. The 1,500 x g pellet was resuspended in isotonic buffer, adjusted to 0,5% Nonidet P40 and incubated on ice for 30 min. The nuclear fraction (pellet) was recovered by centrifugation at 1,500 x g for 10 min. The S100-P100 fractionation was performed by centrifugation at 100,000 x g for 1 h in the Sorvall SW50.1Ti rotor as described (27). Treatments of the cytoplasmic extracts before generating the S100/P100 fractions include 25 mM EDTA; 300 U/ml Micrococcal nuclease for 15 min prior to addition of 5 mM EGTA; 0.5% Nonidet P40; 0.5 M KCl. Incubations were carried out on ice for at least 30 min.

### **Sucrose gradient analysis**

For a broad fractionation of the cytoplasmic extracts, we used a 10 step discontinuous gradient ranging from 20% to 60% sucrose and containing 100 mM KCl, 10 mM KOAc, 2 mM MgOAc, 1 mM DTT and 5 mM HEPES, pH 7.5 as described previously (Luo et al., submitted). Gradients were centrifuged at 32,000 RPM in a SW41Ti rotor for 3 h.. To resolve ribosomes more specifically, cytoplasmic extracts were adjusted to 0.5% Nonidet P40, left on ice for 30 min and loaded on a continuous 10 to 40% sucrose gradient containing 100 mM KCl, 10 mM KOAc, 25 mM EDTA, 1 mM DTT and 5 mM HEPES pH 7.5. Gradients were centrifuged for 4 hours at 38,000 rpm in a SW41 rotor as described before (27). Fractions of 0.8 ml were recovered and the RNA sedimentation profile was monitored with a spectrophotometer settled at 254 nm. Proteins were recovered by acetone precipitation and analyzed by Western blotting. Images were obtained on a Biorad Phosphorimager.

### **Co-immunoprecipitation**

Transfected cells were washed in isotonic buffer and cytoplasmic extracts were prepared as described above for the ribosome gradient. Immunoprecipitation was carried out with either the anti-ribosomal P protein human antiserum or the rabbit polyclonal anti-Stau2 antibodies as previously described (27). Immunoprecipitated proteins were resolved by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and revealed by Western blotting. Immunoprecipitated

RNAs were purified, separated on a formaldehyde agarose gel, transferred to nylon membranes and hybridized with a [<sup>32</sup>P]labeled 18S ribosomal RNA.

### **Ribosome pull down on 1.5 M sucrose cushion**

Cortical neurons were collected and cultured for 4 d at high density (nb per 60 mm plate). Neuron cultures were either serum starved for 4 h or starved for 4 h and refed with 5% FBS for 2h before lysis. Untreated cells were refed with fresh 5% FBS two hours prior cytoplasmic extraction. Other cultures were treated with either cycloheximide (100 µg/ml) or puromycin (100 µg/ml) for 30 min, or with pactamycin (2 µg/ml) or rapamycin (20 ng/ml ) for 1 h prior cytoplasmic extraction. Neurons were then recovered and cytoplasmic extracts were prepared in 0,5 ml. KCl and Nonidet P40 were adjusted to 0,11 M and 0,5%, respectively. Extracts were left on ice for 30 min and then placed on a 1 ml sucrose cushion (1,5 M) containing 110mM KOAc; 2,0 mM MgOAc; 1 mM DTT; 0,05% nonidet P40 and 10 mM HEPES-K pH 7,4. Tubes were centrifuged at 300,000 x g for 3 hours in a Beckman TLA 100.3 microfuge. After centrifugation, the pellets (ribosome enriched fraction) were resuspended in 1 vol sample loading buffer. Supernatant/cushions were recovered, the proteins TCA-precipitated and recovered in 1 vol sample loading buffer. Proteins were resolved on a 8,5% SDS-acrylamide gel and analysed by western blotting. All experiments were performed in duplicata.

## RESULTS

### Molecular cloning of *Stau2*

To characterize a full-length *Stau2* cDNA, we screened human brain cDNA and fetal mouse cDNA libraries, using a partial mouse *Stau2* cDNA as a probe. Positive clones were sequenced and the overlapping cDNAs ligated to generate near full-length cDNAs. 5'RACE were performed on RNA isolated from human and mouse brains to characterize the most 5'end of the cDNAs. In both human and mouse, fragments of two different lengths were generated. Cloning and sequencing of these fragments revealed that the *Stau2* gene expresses two transcripts that diverge in their 5'end sequence. They code for two isoforms of 570 and 538 amino acids, which differ only in their N-terminal extremities (mouse sequences shown in Fig. 1A). Human and mouse proteins share 92% amino acid sequence identity. The rest of the paper will deal only with the mouse sequences.

The structure of both *Stau2* isoforms is similar to that of the *Drosophila* Staufen. They contain a domain that is similar to dsRBD1 in *Drosophila* Staufen. However, while the long isoform of 570aa (named *Stau2*<sup>62</sup>) has a full-length domain; the short isoform of 538aa (named *Stau2*<sup>59</sup>) only contains the C-terminal half of the domain (Fig. 1A). Otherwise, the two isoforms are perfectly identical. They have domains that correspond to the *Drosophila* split domain (dsRBD2) and the major (dsRBD3) and minor (dsRBD4) RNA-binding domains. A region of low sequence identity with the microtubule-binding domain of MAP1B is also present downstream of dsRBD4, as observed before in mammalian *Stau1* (32). There is no clear dsRBD5;

still, sequences that match the C-terminal half of the consensus can be found, although rearranged (Fig. 1B).

To determine whether the two transcripts are generated by differential splicing or by the use of different promoters, we performed RT-PCR amplifications on the RNA isolated from mouse brain with different combinations of primers designed in the T1- or T2-specific sequences and in the downstream common sequence. With one such combination, we amplified two products differing by 131 nt (see Fig.2B). Cloning and sequencing of these fragments allowed us to determine that the T1 transcript encoding Stau2<sup>62</sup> is generated by the insertion of an exon of 131 nt as compared to the T2 transcript (Fig. 1C), demonstrating that they are indeed produced by differential splicing. This additional exon contains an ATG codon that initiates the synthesis of the 38 N-terminal Stau2<sup>62</sup>-specific amino acids. Stop codons are present upstream from this ATG codon. In contrast, Stau2<sup>59</sup> is initiated from an ATG codon located in the upstream exon which drives the synthesis of the 6 N-terminal Stau2<sup>59</sup>-specific amino acids.

### **Stau2 is mainly expressed in brain**

To determine how the *Stau2* transcripts are distributed, we performed a Northern blot analysis with RNAs isolated from mouse tissues. As seen in Figure 2A, Stau2 is expressed mainly in brain and at a lower level in heart. Longer exposure of the blot allowed us to detect transcripts in the kidney, testis and ovary (left panel). As comparison, a Stau1-specific probe hybridized to RNA in most tissues as observed

before in humans and rats (21, 23, 32). Therefore, there are clear tissue-specific differences in the expression of the two genes. An actin probe was used as control.

To determine whether the two transcripts are expressed in the brain and to assess their relative abundance, we RT-PCR amplified the brain RNA using the primers located on each side of the spliced exon, in the regions shared by both transcripts (see Fig.1C). To assure that PCR amplification was kept in non-saturable conditions, we varied both the concentrations of the brain RNA and the numbers of the cycles. As seen in Figure 2B, two fragments were amplified whose length corresponded to the expected size of the fragments amplified from the transcripts coding for the long and short isoforms. In this experiment, transcript T2 encoding Stau2<sup>59</sup> appears to be more abundant than T1.

### **Mapping of functional domains *in vitro***

To identify the functional RNA-binding domain(s) in Stau2, we used a Northwestern assay as we did before (32). A full length Stau2<sup>59</sup>-MBP fusion protein was first produced in bacteria and tested in the dsRNA-binding assay. This protein bound <sup>32</sup>P-labelled *bicoid* 3'UTR mRNA (Fig. 3). None of the overexpressed MBP, BSA or any bacterial proteins in the extracts bound the probe, thus demonstrating the specificity of the RNA-binding assay. We then fused individual domains to GST, expressed them in bacteria and tested their capacity to bind the probe (Fig. 3). Under these conditions, dsRBD3-GST strongly bound the probe, whereas for dsRBD4-GST the binding was very weak. In contrast, dsRBD1<sup>L</sup>/2-GST, dsRBD1<sup>S</sup>/2-GST and TBD/C-terminus did not bind the probe at all. The equivalent amounts of the fused

proteins were loaded as seen in the middle panel of Fig. 3. These results demonstrate that dsRBD3 is the major dsRNA-binding determinant.

### **Stau2 localizes in the somato-dendritic domain of neurons, but not in axons**

Next, we determined the subcellular distribution of Stau2 in hippocampal neurons in culture using the polyclonal antisera specifically raised against the bacterially overexpressed C-terminal half of mouse Stau2. In an arbitrary chosen mature primary hippocampal neuron in culture (16 DIV), rat Stau2 immunoreactivity was present in the cell body as well as in dendrites (Fig. 4A). MAP2 immunoreactivity of the same cell (not shown) served as a marker to identify dendrites (8). Pre-incubation of the serum with Stau2 antigen successfully depleted the Stau2 labeling, showing that the antiserum is specific for the Stau2 proteins (Fig. 4B). To test whether Stau2 is also present in axons of the mature hippocampal neurons, double labeling with Stau2 and tau-1, an established marker of axons (4), was performed. This demonstrated that there was no significant expression of the rat Stau2 in axons (data not shown).

In particular, in the cell body we frequently observed a typical endoplasmic reticulum-like (ER-like) pattern of labeling, while in the dendrites of the fully mature neurons the labeling seemed concentrated in small particles. Double labeling with Stau2 and calnexin, a marker of the RER, demonstrated that the two proteins indeed colocalize in the cells (Fig. 5). We then went on to analyze further the expression pattern of Stau2 in dendrites because many of the observed particles appeared to be aligned on individual tracks (Fig. 4C). To determine whether these aligned Stau2

particles in dendrites were associated with the cytoskeleton, we compared the distribution of Stau2 and of alpha-tubulin by immunofluorescence. Figure 4D shows that in dendrites, Stau2 particles essentially co-localize with the microtubular (MT) tracks, strongly suggesting that Stau2 is associated with the polarized MTs.

### **Stau2 isoforms are found in the P100 fraction of cytoplasmic extracts**

For further study of the subcellular distribution of the Stau2 isoforms, we first used a crude cytoplasmic and nuclear fractionation approach from high-density primary cultures of neurons of rat cortex. Western analysis of the fractions with the monoclonal antibody 1C6 indicated that Stau2<sup>62</sup> and Stau2<sup>59</sup> were both present in the cytoplasmic fraction (Fig. 6A). As suggested by the RT-PCR profiles of the transcripts (Fig. 2C), Stau2<sup>59</sup> is highly expressed in neurons whereas Stau2<sup>62</sup> is barely detectable by western blotting. We saw also a third band of about 50 kDa, named Stau2<sup>52</sup>. Its size was consistent with the size of the previously reported (7) short isoform having an additional deletion of the C-terminal region. The three bands were cleared when the antibody was first incubated in the presence of the C-terminal antigene before western blotting (not shown). These results show that multiple Stau2 isoforms are expressed in neurons and that they are mainly found in the cytoplasm.

We then fractionated the cytoplasmic extracts into S100/P100 fractions using high speed centrifugation. Under these conditions, soluble proteins were found in the supernatant (S100) whereas membrane-bound, heavy complex-associated proteins and organelles sedimented in the pellet (P100). As shown in Figure 6C, all Stau2 isoforms were consistently found in the P100 fraction, as did calnexin (CNX), a



marker of the rough endoplasmic reticulum (RER), as well as L7a, a ribosomal protein. This showed that Stau2 isoforms are associated with the dense particles/organelles. In contrast, tubulin (Tub  $\alpha$ ) was mainly found in the S100 fraction. Pre-treatment of the cytoplasmic extracts before centrifugation with a non-ionic detergent (Nonidet P40) did not abrogate the sedimentation of the Stau2 proteins in the P100, showing that the solubilization of the membranes did not affect Stau2 association with the dense particles/organelles. As a control, calnexin was shifted to S100. Similarly, pre-treatment with EDTA did not displace Stau2 from the dense particles. In contrast, treatment with 0.5 M KCl released roughly 50% of Stau2 in the S100 fraction. Altogether, these observations demonstrate that all Stau2 isoforms are non-covalently associated with stable, EDTA- and detergent-resistant high density particles/organelles and that this association is not only due to microtubules or membranes. Finally, treatment with a high concentration of RNase released only very low amounts of Stau2 isoforms in S100, showing that their association with the high density particles is mainly independent of the RNA binding.

#### **Stau2<sup>59</sup> and Stau2<sup>52</sup> are associated with ribosomes**

To further characterization of the Stau2-containing particles, we separated cytoplasmic extracts on a 20-60% sucrose gradient. Fractions were recovered and analyzed by western blotting with anti-Stau2, anti-calnexin and anti-L7 monoclonal antibodies. Interestingly, more than 70% of both Stau2<sup>59</sup> and Stau2<sup>52</sup> co-fractionated with ribosomes (Fig. 7A). Significant amounts (about 30%) of the two proteins were also found in fractions of higher density. Following longer exposure times, these

fractions were shown to contain ribosomes (not shown). These proteins were not associated with membranes because a detergent treatment of the cytoplasmic extract prior to sedimentation did not abolish the signal (not shown). In contrast, Stau2<sup>62</sup> was only found in the lightest fractions of the gradient. These results demonstrate that Stau2<sup>59</sup> and Stau2<sup>52</sup> have the same distribution, although they are components of heterogeneous complexes, and also that Stau2<sup>62</sup> has a distinct distribution. Because the Stau2<sup>62</sup> expression in neurons is very weak, the rest of the paper will only focus on Stau2<sup>59</sup> and Stau2<sup>52</sup>.

To determine whether Stau2<sup>59</sup> and Stau2<sup>52</sup> were associated with the ribosomes or only coincidentally cofractionated with them, we examined the distribution of the Stau2 proteins in a sharper gradient (10-40%), in the presence of 25mM EDTA to allow the dissociation of the polysomes and 80S ribosomes in their free 40S and 60S subunits. Under these conditions, Stau2<sup>59</sup> and Stau2<sup>52</sup> cosedimented with both the 60S and 40S ribosomal subunits (Fig. 7B). This result strongly supports an association between Stau2<sup>59</sup>/Stau2<sup>52</sup> and the ribosomal subunits.

### **Co-immunoprecipitation of ribosomes and Stau2<sup>59</sup>**

To confirm the interaction between Stau2<sup>59</sup>/Stau2<sup>52</sup> and the ribosomes, we first immunoprecipitated ribosomes with a human anti-ribosomal protein antiserum and detected Stau2 by Western blotting with the anti-Stau2 antibody. A band corresponding to Stau2<sup>59</sup> was visible on the blot (Fig. 8A). Unfortunately, Stau2<sup>52</sup> comigrated with remaining antibodies and therefore could not be detected on the blot. Stau2<sup>59</sup>-specific band was not visible when a normal human serum was used for immunoprecipitation. Similarly, when Stau2 was immunoprecipitated, the P<sub>0</sub>

ribosomal protein (Fig. 8B) and the 18S rRNA (Fig. 8C) could be detected in the immunoprecipitate. No signal was found when immunoprecipitation was done with the pre-immune serum. Taken together, these results confirm that at least a substantial fraction of Stau2<sup>59</sup>, and most likely of Stau2<sup>52</sup> interacts with ribosomes.

### **Stau2<sup>59</sup>/Stau2<sup>52</sup> association with ribosomes is independent of translation**

To determine whether translation modulates Staufen association with the ribosomes, we used a ribosome pull down assay. Cells were treated with either pactamycine, an inhibitor of translation initiation, rapamycin, an inhibitor of the FRAP/TOR signaling pathway, puromycine or cycloheximide, two inhibitors of the translation elongation. In other experiments, cells were starved by serum depletion, or starved and refed with serum. Cytoplasmic extracts were fractionated through a 1.5 M sucrose cushion in the presence of detergent. Supernatants and ribosome-enriched pellets were analyzed for the presence of Stau2. In both the control and the treated cells, Stau2<sup>59</sup> and Stau2<sup>52</sup> were consistently associated with the pellets (not shown). These results strongly suggest that translation does not influence Stau2<sup>59</sup>/Stau2<sup>52</sup>-ribosome association.

## DISCUSSION

### **Staufen paralogs share conserved features**

In this paper, we report the cellular and biochemical characterization of Stau2, a second member of the Staufen family in mammals. Its structure and general organization are very close to that of Staufen1 with whom it shares 46% of the amino acid identity. Interestingly, the genomic organization of the *Stau2* gene is similar to that of the *Stau1* gene (5). The positions of the exon-intron boundaries of the eight middle exons that code for dsRBD2, dsRBD3, dsRBD4 and TBD are conserved. From these exons, the amino acid sequence of Stau2 is 61% identical to that of Stau1. This suggests that both genes diverged from a common ancestor gene and that the conserved exons probably coded for the domains of the protein required for the Staufen's major functions.

In contrast, the N- and C-termini have diverged. However, both genes have conserved such a common feature as the ability for an alternative splicing near their 5'-extremities ((32); this paper). This mechanism generates multiple isoforms that probably contribute to the diversity and/or a fine tuning of Staufen's functions in mammals. One of the putative roles of the alternatively spliced N-terminals may be targeting of each isoform to different subcellular localization. While Stau2<sup>59</sup> associates with ribosomes, Stau2<sup>62</sup> does not and therefore has a distinct distribution. The fact that outside of their N-termini the two isoforms are identical suggests that both carry the determinants involved in the ribosome association, although the additional thirty eight amino acid region at the N-terminal of Stau2<sup>62</sup> interferes with these determinants and preclude the association. Similarly, the C-terminus of Stau2 is

a subject of a differential splicing. An unspliced intron introduces a premature stop codon into the open reading frame. This stop codon truncates the C-terminus of Stau2<sup>59</sup> and deletes dsRBD5 (7). In *Drosophila*, dsRBD5 was shown to be involved in the translational derepression of the *oskar* transcript (22). The co-sedimentation of this truncated protein with Stau2<sup>59</sup> and the ribosomes suggests that these isoforms are involved in different aspects of translation regulation.

The *Stau2* gene is mainly expressed in the brain. This is in contrast with the expression of the *Stau1* gene which is more evenly distributed among tissues (21, 23, 32). The overlapping but distinct expression patterns of Stau2 and Stau1 in tissues suggest that the duplication of the ancestral *Stau* gene allowed a specialization of the proteins to adapt to different cellular and biochemical niches. The enriched expression of Stau2 in brain points toward a function that is more specific to the nervous system. Within the brain, Stau2<sup>59</sup> is clearly expressed in neurons. It is not clear whether Stau2<sup>62</sup> is also expressed, although at a very low level in neurons or it is expressed in a subpopulation of glial-like cells that co-cultured with neurons. By immunofluorescence, Stau2 is found in the somato-dendritic compartment of neurons and colocalize with microtubules and ribosomes. This is similar to Stau1, which was also found on microtubules (15, 23). Drugs that disrupted microtubule organization also affected the Stau1 distribution in dendrites (15). In addition, the movement of Stau1 in dendrites as observed by the time-lapse video-microscopy is also inhibited by these drugs (18). However, our preliminary results indicate that Stau1 and Stau2 might be components of distinct particles suggesting that they might play different and/or complementary roles(s) in neurons.

### **Stau2<sup>59</sup> and Stau2<sup>52</sup> mainly interact with ribosomes**

We used multiple strategies to demonstrate that Stau2<sup>59</sup> and Stau2<sup>52</sup> mainly interact with ribosomes. The data obtained with use of the confocal microscopy, sucrose gradients performed in the absence of EDTA or at the concentration ensuring the separation of the ribosomal subunits, co-immunoprecipitation and the ribosome pull-down, all are consistent with the interaction of the Stau2 isoforms with ribosomes. The consistency of the data collected with use of such a wide range of techniques eliminates the possibility that Stau2<sup>59</sup>/Stau2<sup>52</sup>-ribosome association is only coincidental and strongly argues for a role of these proteins in translation. Stau1<sup>55</sup> as well as other members of the dsRNA-binding protein family, such as the double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR), the *Xenopus laevis* RNA-binding protein A (Xlrpba), the TAR-RNA binding protein (TRBP) and NF90 were also shown to bind ribosomes (11, 19, 21, 33, 34). This feature may be common to the members of this family. At least one of the member of the family, PKR, was shown to modulate translation. Upon activation by dsRNA, PKR is known to inhibit translation through phosphorylation of the translation initiation factor eIF2a (13). Recently, we mapped the minimal domains involved in the interaction between Stau1<sup>55</sup> and the ribosomes in the COS cells and showed that the dsRBD3's RNA-binding activity is mediating this interaction, in which the region encompassing dsRBD4 and TBD is also directly involved (Luo et al., submitted). The corresponding domains are all present in the ribosome-associated Stau2 isoforms, suggesting that they may associate with ribosomes using the same mechanisms. If so,

Stau2 and Stau1 might compete for the same ribosomal binding site(s) thus leading to the formation of two different complexes.

However, not all Stau2<sup>59</sup> and Stau2<sup>52</sup> cofractionate with the bulk of ribosomes in the gradients. We do not exclude the possibility that Stau2-containing particles of higher density nevertheless represent aggregates of ribosomes since these fractions also contain low amounts of ribosomes. Aggregates of ribosomes have been described in dendrites of neurons in culture and were suggested to be involved in RNA transport and to be a reservoir of translationally silent transcripts. Upon cell signaling, transcripts may leave the particles and become locally translated (17). Alternatively, Stau2<sup>59</sup> and Stau2<sup>52</sup> may not be associated with ribosomes in complexes of high density. This would be consistent with the confocal immunofluorescence analysis which revealed that in some Stau2-positive regions ribosomes were not detected. These regions were mostly distal dendrites. This signal may also come from Stau2<sup>62</sup>, which is not associated with ribosomes. Altogether, this suggests that Stau2 is a component of a dynamic pathway in which the nature and composition of the particles changes over times.

### **Properties of Stau2/ribosome interaction**

The biochemical characterization of the association of Stau2<sup>59</sup> and Stau2<sup>52</sup> with ribosomes provides important clues concerning its nature and properties. First, this association is remarkably stable. It is resistant to an EDTA concentration that separates ribosomal subunits and to a relatively high concentration of KCl. Interaction between other members of the dsRBD family and the ribosomes is also

resistant to KCl, suggesting that the mechanism of association is well conserved among the members of the family. Second, Stau2<sup>59</sup> and Stau2<sup>52</sup> are not anchored to ribosomes via the ribosome-associated mRNAs. Treatment of the cytoplasmic extracts with high concentration of RNase affects the Stau2<sup>59</sup>/Stau2<sup>52</sup>-ribosome association only weakly. Under the same condition, the poly(A)-binding protein (PABP) was completely released from ribosomes (not shown). Third, Stau2<sup>59</sup> and Stau2<sup>52</sup> association with ribosomes appears to be independent of translation. Thus, drugs inhibiting translation or serum starvation did not affect Stau2<sup>59</sup>/Stau2<sup>52</sup>-ribosome association. Fourth, Stau2<sup>59</sup> and Stau2<sup>52</sup> are associated with both ribosomal subunits. Interestingly, PKR was shown to be associated with the 60S subunit in mammals (33) and with the 40S subunit when expressed in yeast (34). It is not known whether Stau2<sup>59</sup> and Stau2<sup>52</sup> bind ribosomal determinants on both ribosomal subunits, or, alternatively, they bind determinant(s) at the interface of the two ribosomal subunits and therefore share contacts with both of them. Taken together, our results support the possibility that Stau2<sup>59</sup> and Stau2<sup>52</sup> are directly anchored on the ribosomes.

### **Biological significance of the interaction of Stau2<sup>59</sup> and Stau2<sup>52</sup> with ribosomes**

The demonstration that mammalian Stau2 isoforms interact with ribosomes strongly suggests that they are involved in a ribosome-associated function, likely a regulation of translation. The same conclusion was made for the mammalian Stau1<sup>55</sup> (21). In *Drosophila*, Staufen is known to be involved in the translational control of *oskar* mRNA (16, 22). Indeed, Staufen is critical for the derepression of the



translation of the *oskar* transcript when it is localized to the posterior pole of the developing oocyte. Therefore, the *Drosophila* Staufen is involved in both RNA transport and local translation and is a key mediator of the switch between the silent and derepressed translation. Altogether, these studies support the notion that modulation of translation is an important and conserved function of Staufen in different species.

At this point, it is not known whether Stau2<sup>59</sup> and Stau2<sup>52</sup> are involved in the general mechanism of translation of all mRNAs within the cells or are linked to the local translation of the localized dendritic mRNA, or both. The observation that Stau2 is mainly expressed in the brain, is present in dendrites and is distributed along the microtubules clearly argues for a role of Stau2 in mRNA transport. In addition, the heterogeneity of the Stau2<sup>59</sup>- and Stau2<sup>52</sup>-containing particles/organelles suggests that they play a part in a dynamic and multi-step process that modulates the composition of RNA/protein complexes along the pathway. This is essential for the proper localization and for the regulation of translation of the localized mRNAs. It is believed that mRNAs are transported within translationally silent RNA granules and then, following the cell activation, they are transferred to the active polysomes (14). By physical bridging of the transported RNA and the translation apparatus, Stau2<sup>59</sup> and Stau2<sup>52</sup> may constitute a functional link between processes of transport and local translation. Our results are consistent with a model in which Stau2 defines and/or recruits ribosomes in the soma and allows their transport and localization in dendrites. It may further modulate ribosome functions through interaction with ribosomal proteins, ribosomal RNA, ribosome-associated proteins or translation

factors, to either repress translation in RNA granules during transport or derepress it once the RNAs are localized.

The most diverging domain between Stau1<sup>55</sup> and Stau2<sup>59</sup> is dsRBD5. In addition, Stau2<sup>52</sup> completely lacks this domain. In *Drosophila*, dsRBD5 was shown to be essential for the proper *bicoid* and *prospero* mRNA localization in oocytes and neuroblasts, respectively (22). Although not essential for the *oskar* mRNA localization in oocytes, it is required for the derepression of translation of the *oskar* mRNA once localized at the posterior pole. The mechanism by which dsRBD5 plays its role(s) in *Drosophila* is still unknown and may involve protein-protein interaction. In neuroblasts, dsRBD5 associates with Miranda (24). The fact that sequences of the dsRBD5 in Staufen isoforms are structurally divergent suggests that each isoform may serve different function(s) in both localization and translation. The sequence of Stau1<sup>55</sup> dsRBD5 is highly conserved as compared with that of *Drosophila* dsRBD5, suggesting that Stau1<sup>55</sup> plays a role similar to that of the *Drosophila* Staufen in neurons. In contrast, the sequence of dsRBD5 in Stau2<sup>59</sup> has highly diverged, suggesting that it plays another role or binds different proteins. Stau2<sup>52</sup> may be a competitor of Stau2<sup>59</sup>, being able to compete with Stau2<sup>59</sup> for the ribosome binding but being unable to induce the physiological function executed by Stau2<sup>59</sup> dsRBD5 on the translation or localization.

### ACKNOWLEDGMENT

We thank Eric Chevet for useful comments and suggestions, Sherif Abou-Allela, Nicole Leclerc,

Dr A. Ziemiecki (University of Berne, Switzerland) and Dr M. Reichlin (Oklahoma Medical Research Foundation, USA) for the anti-ribosomal L7a and P antibodies, respectively. This work was supported by a Canadian Institute for Health Research (CIHR) grant to L.DG. T.D. was supported by NSERC and by FCAR studentships.

## REFERENCES

1. **Bashirullah, A., R. L. Cooperstock, and H. D. Lipshitz.** 1998. RNA localization in development. *Annu.Rev.Biochem.* **67**:335-394.
2. **Bassell, G. J., Y. Oleynikov, and R. H. Singer.** 1999. The travels of mRNAs through all cells large and small. *FASEB J.* **13**:447-454.
3. **Bassell, G. J., H. L. Zhang, A. L. Byrd, A. M. Femino, R. H. Singer, K. L. Taneja, L. M. Lifshitz, I. M. Herman, and K. S. Kosik.** 1998. Sorting of  $\beta$ -actin mRNA and protein to neurites and growth cones in culture. *J.Neurosci.* **18**:251-265.
4. **Binder, L. I., A. Frankfurter, and L. I. Rebhun.** 1985. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* **101**:1371-8.
5. **Brizard, F., M. Luo, and L. DesGroseillers.** 2000. Genomic organization of the human and mouse stau genes. *DNA Cell Biol.* **19**:331-339.
6. **Broadus, J., S. Fuerstenberg, and C. Q. Doe.** 1998. Staufen-dependent localization of *prospero* mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature* **391**:792-795.
7. **Buchner, G., M. T. Bassi, G. Andolfi, A. Ballabio, and B. Franco.** 1999. Identification of a novel homolog of the drosophila staufen protein in the chromosome 8q13-q21.1 region . *Genomics* **62**:113-118.
8. **Caceres, A., L. I. Binder, M. R. Payne, P. Bender, L. Rebhun, and O. Steward.** 1984. Differential subcellular localization of tubulin and the microtubule-associated protein MAP2 in brain tissue as revealed by

- immunocytochemistry with monoclonal hybridoma antibodies. *J Neurosci* **4**:394-410.
9. **Carson, J. H., H. Cui, W. Krueger, B. Schlepchenko, C. Brumwell, and E. Barbarese.** 2001. RNA trafficking in oligodendrocytes. *Results Probl. Cell Differ.* **34**:69-81.
  10. **Crine, P., C. LeGrimellec, E. Lemieux, L. Labonte, S. Fortin, A. Blachier, and M. Aubry.** 1985. The production and characterization of a monoclonal antibody specific for the 94,000 dalton enkephalin-degrading peptidase from rabbit kidney brush border. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **131**:255-261.
  11. **Eckmann, C. R., and M. F. Jantsch.** 1997. Xlrbpa, a double-stranded RNA-binding protein associated with ribosomes and heterogeneous nuclear RNPs. *J. Cell Biol.* **138**:239-253.
  12. **Ferrandon, D., L. Elphick, C. Nüsslein-Volhard, and D. St Johnston.** 1994. Stauf protein associates with the 3'UTR of *bicoid* mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* **79**:1221-1232.
  13. **Hershey, J. W.** 1991. Translational control in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* **60**:717-55.
  14. **Kiebler, M. A., and L. DesGroseillers.** 2000. Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron* **25**:19-28.
  15. **Kiebler, M. A., I. A. Hemraj, P. Verkade, M. Köhrmann, P. Fortes, R. M. Marión, J. Ortín, and C. G. Dotti.** 1999. The mammalian Stauf protein

- localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: Implications for its involvement in mRNA transport. *J. Neurosci.* **19**:288-297.
16. **Kim-Ha, J., K. Kerr, and P. M. Macdonald.** 1995. Translational regulation of *oskar* mRNA by bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential. *Cell* **81**:403-412.
  17. **Knowles, R. B., J. H. Sabry, M. E. Martone, T. J. Deerinck, M. H. Ellisman, G. J. Bassell, and K. S. Kosik.** 1996. Translocation of RNA granules in living neurons. *J Neurosci* **16**:7812-20.
  18. **Kohrmann, M., M. Luo, C. Kaether, L. DesGroseillers, C. G. Dotti, and M. A. Kiebler.** 1999. Microtubule-dependent recruitment of staufer-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol.Biol.Cell* **10**:2945-2953.
  19. **Langland, J. O., P. N. Kao, and B. L. Jacobs.** 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. *Biochemistry* **38**:6361-6368.
  20. **Li, P., X. Yang, M. Wasser, Y. Cai, and W. Chia.** 1997. Inscuteable and Staufen mediate asymmetric localization and segregation of prospero RNA during *Drosophila* neuroblast cell divisions. *Cell* **90**:437-447.
  21. **Marion, R. M., P. Fortes, A. Beloso, C. Dotti, and J. Ortin.** 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.
22. **Micklem, D. R., J. Adams, S. Grunert, and D. St Johnston.** 2000. Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. *EMBO J.* **19**:1366-1377.
  23. **Monshausen, M., U. Putz, M. Rehbein, M. Schweizer, L. DesGroseillers, D. Kuhl, D. Richter, and S. Kindler.** 2001. Two rat brain Staufen isoforms differentially bind RNA. *J. Neurochem.* **76**:155-165.
  24. **Schuldt, A. J., J. H. J. Adams, C. M. Davidson, D. R. Micklem, J. Haseloff, D. St Johnston, and A. H. Brand.** 1998. Miranda mediates asymmetric protein and RNA localization in the developing nervous system. *Genes Dev.* **12**:1847-1857.
  25. **Schuman, E. M.** 1999. mRNA trafficking and local protein synthesis at the synapse. *Neuron* **23**:645-8.
  26. **Shaw, G., G. A. Banker, and K. Weber.** 1985. An immunofluorescence study of neurofilament protein expression by developing hippocampal neurons in tissue culture. *Eur J Cell Biol* **39**:205-16.
  27. **Siomi, M. C., Y. Zhang, H. Siomi, and G. Dreyfuss.** 1996. Specific sequences in the fragile X syndrome protein FMR1 and the FXR proteins mediate their binding to 60S ribosomal subunits and the interactions among them. *Mol Cell Biol* **16**:3825-32.
  28. **St Johnston, D.** 1995. The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell* **81**:161-170.

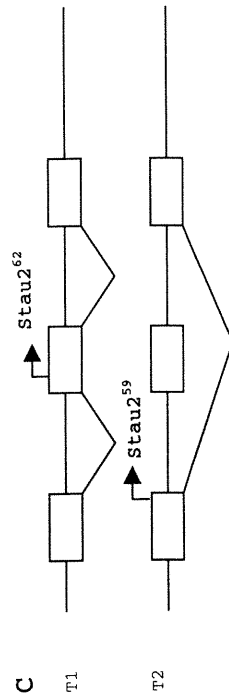
29. **St Johnston, D., D. Beuchle, and C. Nüsslein-Volhard.** 1991. *staufer*, a Gene required to localize maternal RNAs in the Drosophila egg. *Cell* **66**:51-63.
30. **St Johnston, D., N. H. Brown, J. G. Gall, and M. Jantsch.** 1992. A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **89**:10979-10983.
31. **Steward, O., and E. M. Schuman.** 2001. Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annu.Rev.Neurosci.* **24**:299-325.
32. **Wickham, L., T. Duchaine, M. Luo, I. R. Nabi, and L. DesGroseillers.** 1999. Mammalian *staufer* is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol.Cell Biol.* **19**:2220-2230.
33. **Wu, S., K. U. Kumar, and R. J. Kaufman.** 1998. Identification and requirement of three ribosome binding domains in dsRNA-dependent protein kinase (PKR). *Biochemistry* **37**:13816-13826.
34. **Zhu, S., P. R. Romano, and R. C. Wek.** 1997. Ribosome targeting of PKR is mediated by two double-stranded RNA- binding domains and facilitates in vivo phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2. *J.Biol.Chem.* **272**:14434-14441.



**Figure 1. Molecular analysis of Stau2 isoforms.**

(A) Deduced amino acid sequences of Stau2<sup>62</sup> (T1) and Stau2<sup>59</sup> (T2). dsRBDs (dsRBD1 to dsRBD4) are bold and flanked by arrows. The large arrow head indicates the position of the stop codon in Stau2<sup>52</sup>. (B) Amino acid sequence alignment of Stau2 dsRBDs and the consensus dsRBD sequence. (C) Alternative splicing near the 5'-end of the *Stau2* gene. Alternative splicing generates two transcripts, T1 and T2 which differ by the insertion of an exon of 131nt in T1 as compared to T2. Arrows indicate the first in frame ATG initiation codon. Note that the two ATG are not in frame in the T1 transcript and therefore translation initiation of Stau2<sup>62</sup> starts at the second ATG.

**A** M A N P K 5  
 T1 →dsrBD1 ATGCCAAACCCAAA 15  
 E K T P C V L V N E L A R F H S I Q P Q Y K L L N E R G P A H S K M F S V Q L S L G E 48  
 T1 GAGAAACTCCAGTCTCTGTTGTAATGAGTTAGCCCGTTTCCATPAGCATCCAAACCCAGTTCGAATGAAAGGGCCCTGCTCATTCGAAATATGTTTTCGGTGGCAGCTGAGTCTTTGGCGAG 148  
 M L Q O I N O M F S V Q L S L G E  
 T2 ATGCTTCAGATAAATCAATGATGTTTTCGGTGGCAGCTGAGTCTTTGGCGAG 48  
 dsrBD1←  
 Q T W E S E G S I K K A Q A V A A N K A L T E S T L P K P V Q K P P K S N V N N N P G 92  
 CAGACATGGGAATCCCGAAGTACAGTATATAAAGAGCCCAACAGCTGTTGCTTAACAAAGCTTTGACTGAATCTACGACTTCCCAACACCTTCAGAAACCCACCTTAAAGTAATGCAATAATAAACCCAGGT 280  
 S I T P T V E L N G L A M K R G E P A I Y R P L D P K P F P N Y R A N Y N S R R G M Y N Q 136  
 AGTATACTCCAACTGTGAACTGAAATGGGCTCGCTATGAAAGGGGAGGAGCCCTGACCTACAGGCCACTAGTCCAAAGCCATTCGCCAAATTTAGAGCTAACCTCCCGGGGCATGTACAATCAG 412  
 →dsrBD2  
 R Y H C P M P K I F Y V Q L T V G N N E F F G E G K T R Q A A R H N A A M K A L Q A L Q 180  
 AGTATCATTTGCCCAATGCCCAATCTTTTATGTTTACGTTAAGTGTAGAAATAATGAAATCTTCTGGTGAAGGGAAGACTCCAGACGCTGCCAGCAAACTCTCCGATGAAAGGCTTCAAGCCCTACAG 544  
 →dsrBD3  
 N E P I P E K S P Q N G E S G K E M D D K D A N K S E I S L V F E I A L K R N M P V S F 224  
 AATGACCAATTCAGAAAAGTCTCCCAAGAAATGGTGAATCAGAAAGAAATGGCGATPAAAGTCCAAATTAATCTGAAATTAAGCTTAGTGTGAGATTCGCTGAGAGAAATATGCCCTGTCAATTTT 676  
 E V I K E S G P P H M K S F V T R V S V G E F S A E G E N S K K L S K K R A A T V L 268  
 GAGGTTTATAAAGAAAGTGGACCAACATATGAAAGTTTTTGTAACTCGGCTGTCAGTGGGAGAAATTTCTGCAGAAAGGAGGAGGAAATAGCAAAAACCTTCCAAAGACCTGTCGCCCAACCCACTGTCTTA 808  
 dsrBD3←  
 Q E L K N L P L P V E K P K L F F K R R P K T I V K A G P D Y G O G M N P I S R P A 312  
 CAGGACTTAAAAACCTCCACCTTCTCTGTTGTTAGAGAGCCAAACTATTTTTTAAAAACCCCTPAAACAACTAGTAAAGCTTAGTGTGAGATTCGCTGAGAGAAATATGCCCTGTCAATTTT 940  
 →dsrBD4  
 Q I Q A R K E K E P D Y I L L S E R G G I R P G R E F V I E V K V G N E V A T G T G P N 356  
 CAGATCCAGCAAGCAAGAAAGGAGGCTGATTTACATCTCTACTCTCAGAACGAGAAATCCCTCCCGTCCAGAGTTCGTAATTCGAGGTCAGGTCAGGTAAGCAATGAAAGTTCGCAACGAGCCCAAT 1072  
 K K I A K K N A R E A M L Q L G Y K A S T S L Q D P L D K T G E N K G W S G P K P G F 400  
 AAAAAATAGCCAAAAMAATGCTCCTGTAAGCAATGCTTTACAGCTTGGCTTAAAGCCCTCCACCCAGCTTCCAGCAAGAGTGAAGAAACAAAGAGTGGAGTGTCCCAAGCCCTGGGTTT 1204  
 P E P T N N T P K G I L H L S P D V Y Q E M E A S R H R V T S G T T L S Y L S P K D M N 444  
 CCTGAACCAACAATAACACACCTCCAAAGGAATTTCTCATCTTTCTCTGATGTTTATCAAGATGGAAGCTAGCCGACAGAGTGACCTGGCCCAACTCTAAGCTTACTATCACCACCAAGATATGAC 1336  
 Q P S S F S V S P S T S A T V A R E L L M N G T S P T A E A I G L K G S S P T S 488  
 CAACCTTCAGCTTTTCTCAGTGTCTCCCTCAATCAACTAGTTCAGCCACAGTTCGCCAGGAACTCTTATGAAATGGAACCTCTCTACTGCTGAAGCCATAGGTTTAAAAAGAAATTTCTCCTACTTCC 1468  
 P C S V Q P S K Q L E Y L A R I Q G F Q A A L S A L K Q F S E Q G L E S I D G A V N V 532  
 CCTTGTCTTCAAGTACAGCCCTTCAAAACAACCTGGAATATTTAGCAAGGATTCAGGCTTTTCAAGGCTTTAAGTCCCTTGAACACAGTTTTCTGACCAAGGACTGGAATCAATTCATGGGGCAGTGAATGTT 1600  
 E K G S L E K Q A K H L R E K A D N N Q R P P A S I S Q D C K K S N S A I \* 569  
 GAAAAGGGTCTCTTGAANAACAAGCAAGCATCTGGGGGAGAAAGCAGACAATAACCCAGCCCGCGCTCCATCTCTCAGGACTCGAAGAAATCAAAAGTCGGCCATCTAG 1714



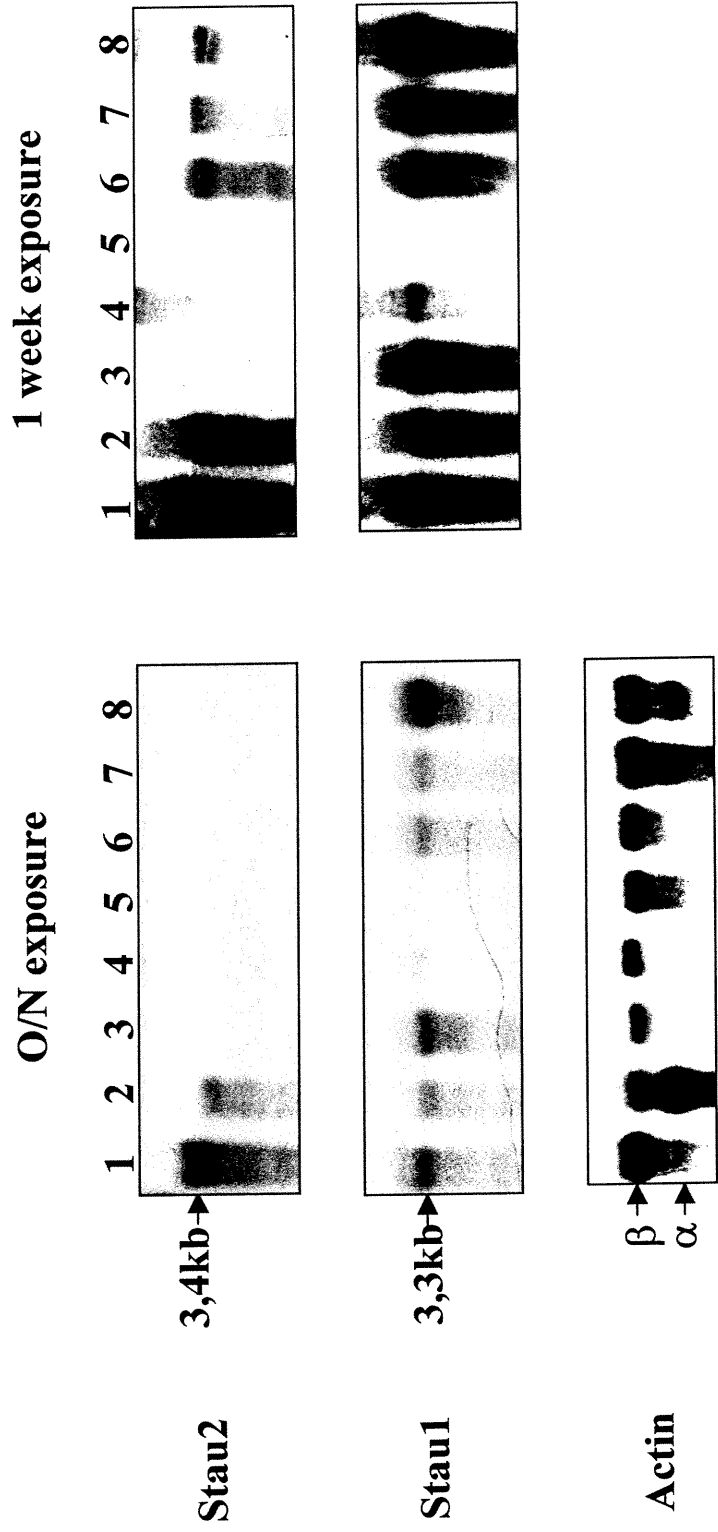
GxGxSKKxKxKxKxLxLxL

Consensus FT

**Figure 2. Tissue distribution of the *Stau2* transcripts.**

(A) Northern blot analysis of *Stau2* expression in mouse tissues. mRNAs isolated from multiple tissues were transferred to a nylon membrane and hybridized with either a mouse *Stau2* cDNA probe (top panels), a mouse *Stau1* cDNA probe (middle panels) or an actin cDNA probe (lower panel). Lane 1, brain; lane 2, heart; lane 3, liver; lane 4, lung; lane 5, spleen; lane 6, kidney; lane 7, testis; lane 8, ovary. Blots were exposed either 16 h (left panels) or 7 days (right panels). (B) RT-PCR analysis of the *Stau2* transcripts in brain. Total RNA was isolated from mouse brain and RT-PCR amplified with primers flanking the alternatively spliced exon. PCR amplification was done with different amounts of starting RNA and cycle numbers.

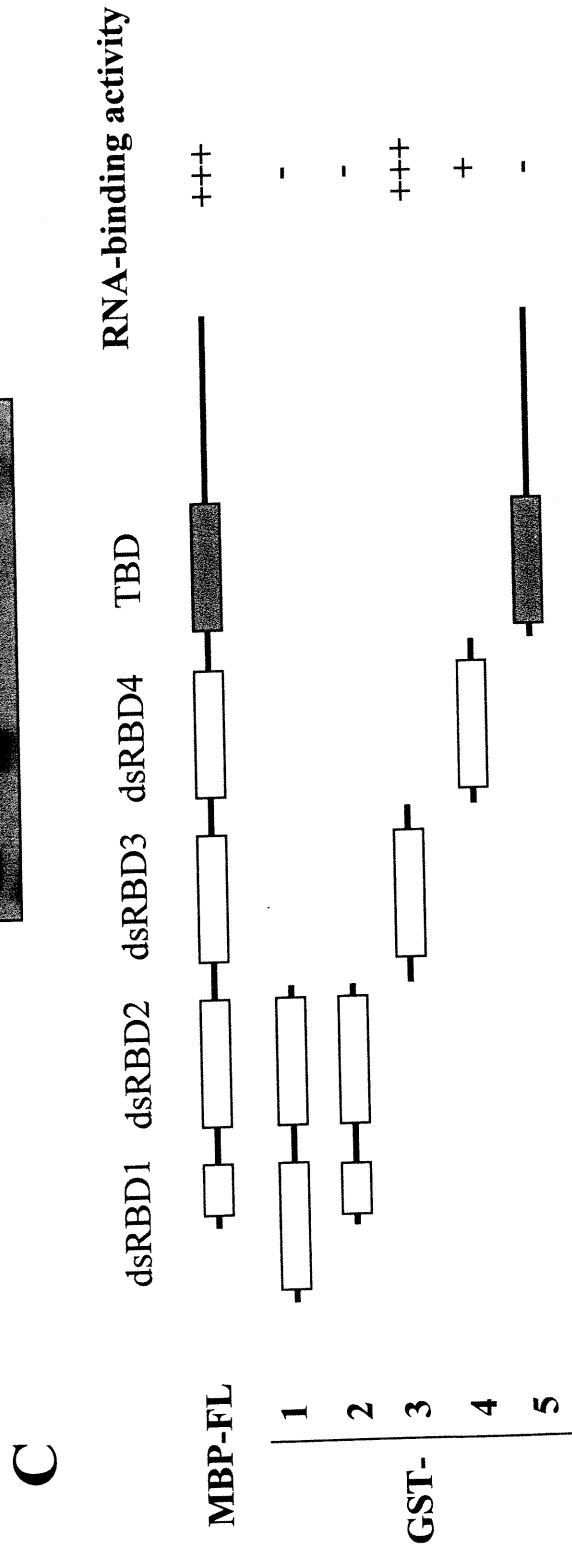
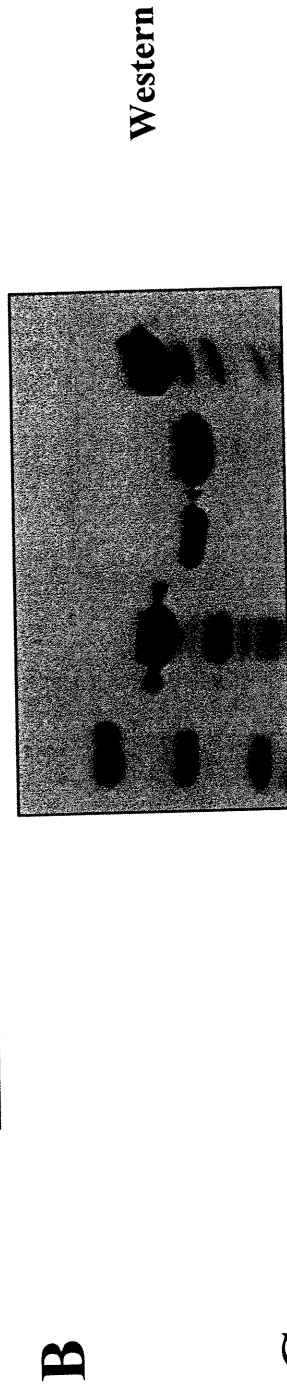
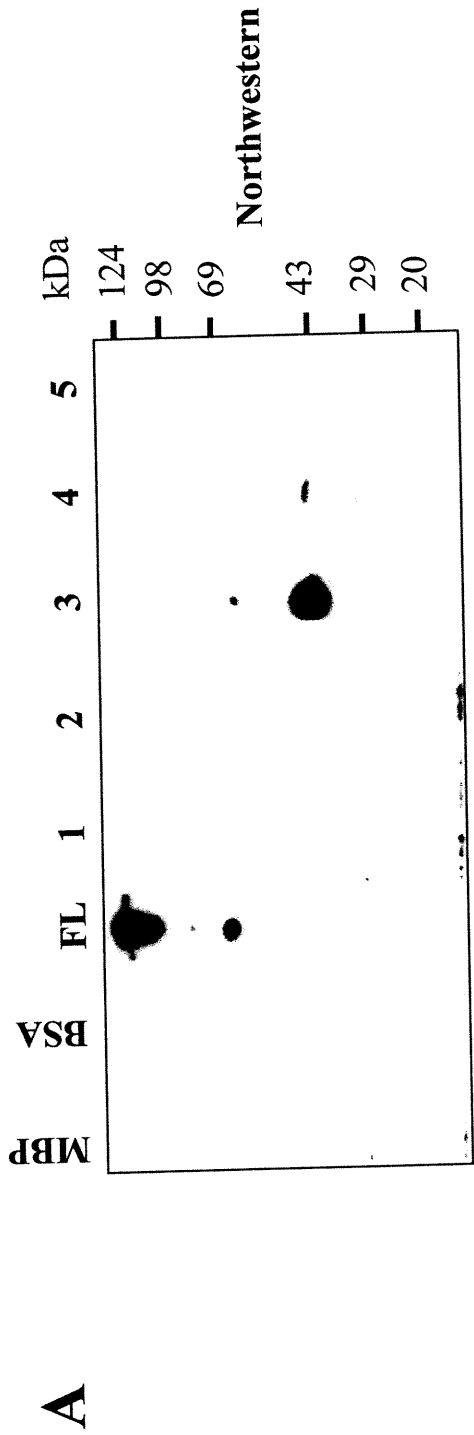
**A**





**Figure 3. RNA-binding activity of Stau2 dsRBDs.**

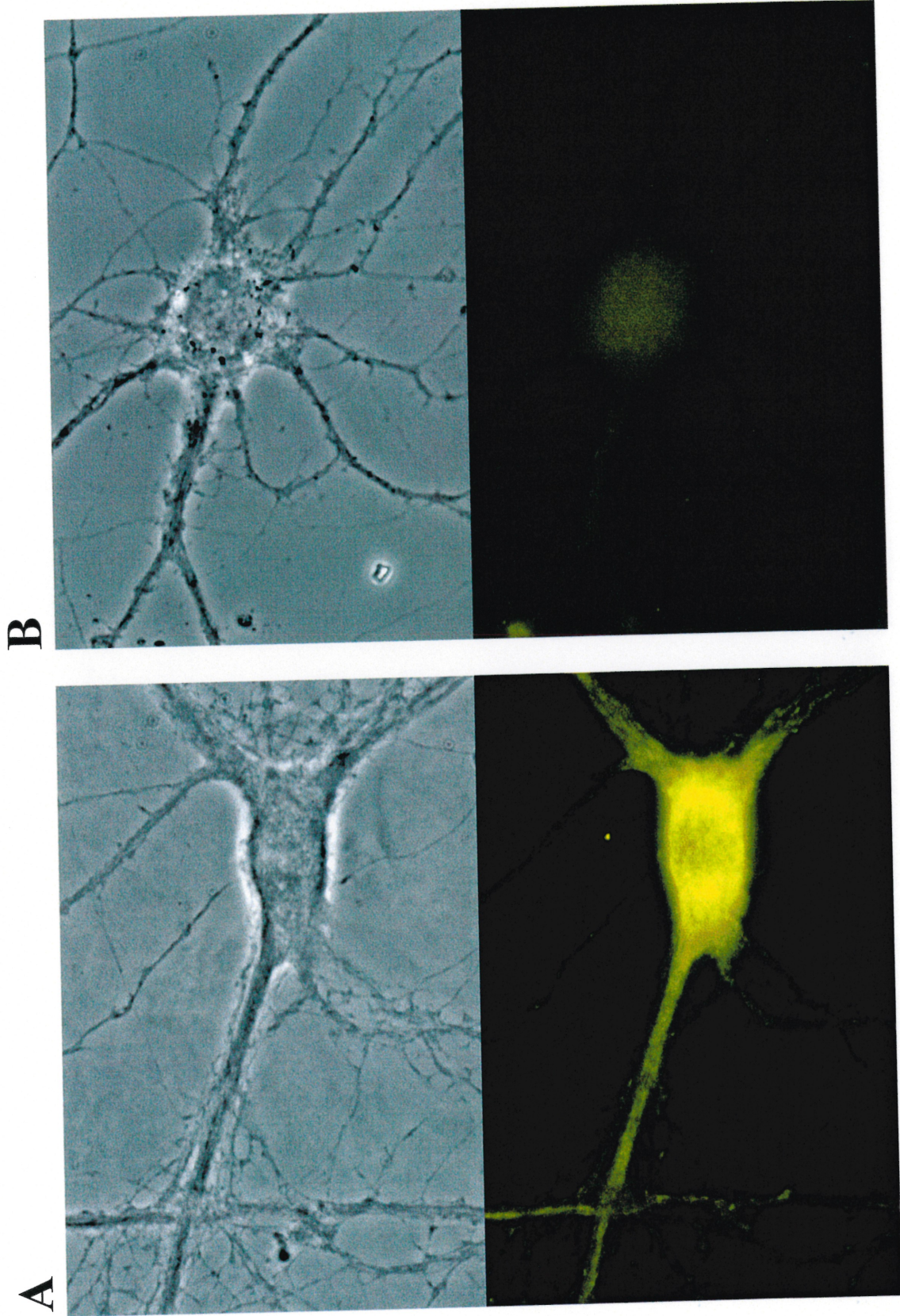
Full-length mouse Stau2 fused to MBP (FL) and dsRBDs fused to GST (1 to 5) were expressed in bacteria. Crude protein extracts were resolved by SDS PAGE and transferred on nitrocellulose membranes. Filters were incubated with either  $^{32}\text{P}$ -labeled bicoid 3'UTR RNA (A) or anti-Stau2 antibodies (B). MBP, overexpressed MBP protein; BSA, 5ug BSA. (C) Schematic representation of the fusion proteins with a summary of their RNA-binding capacity. White and gray boxes represent dsRBDs and TBD, respectively.



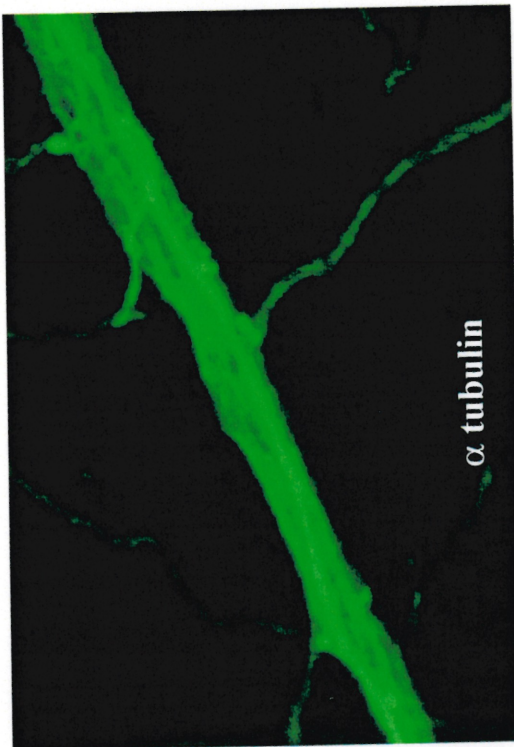
**Figure 4. Stau2 is found in the somato-dendritic compartment of neurons and co-localizes with microtubules.**

(A, B) Immunofluorescence analysis of rat hippocampal neurons in culture. Neurons were probed with Stau2-specific antiserum (A) or the Stau2-specific antiserum previously depleted by incubation with the GST-Stau2 antigen (B). Phase contrast figures are presented in the upper panels. Images were obtained with the same dilutions of antisera and exposure times. (C, D) These figures represent a higher magnification of a dendritic process of a neuron double-labeled with anti-Stau2 (C) and anti- $\alpha$ -tubulin (D) antibodies. Bars = 10  $\mu$ m.





**D**

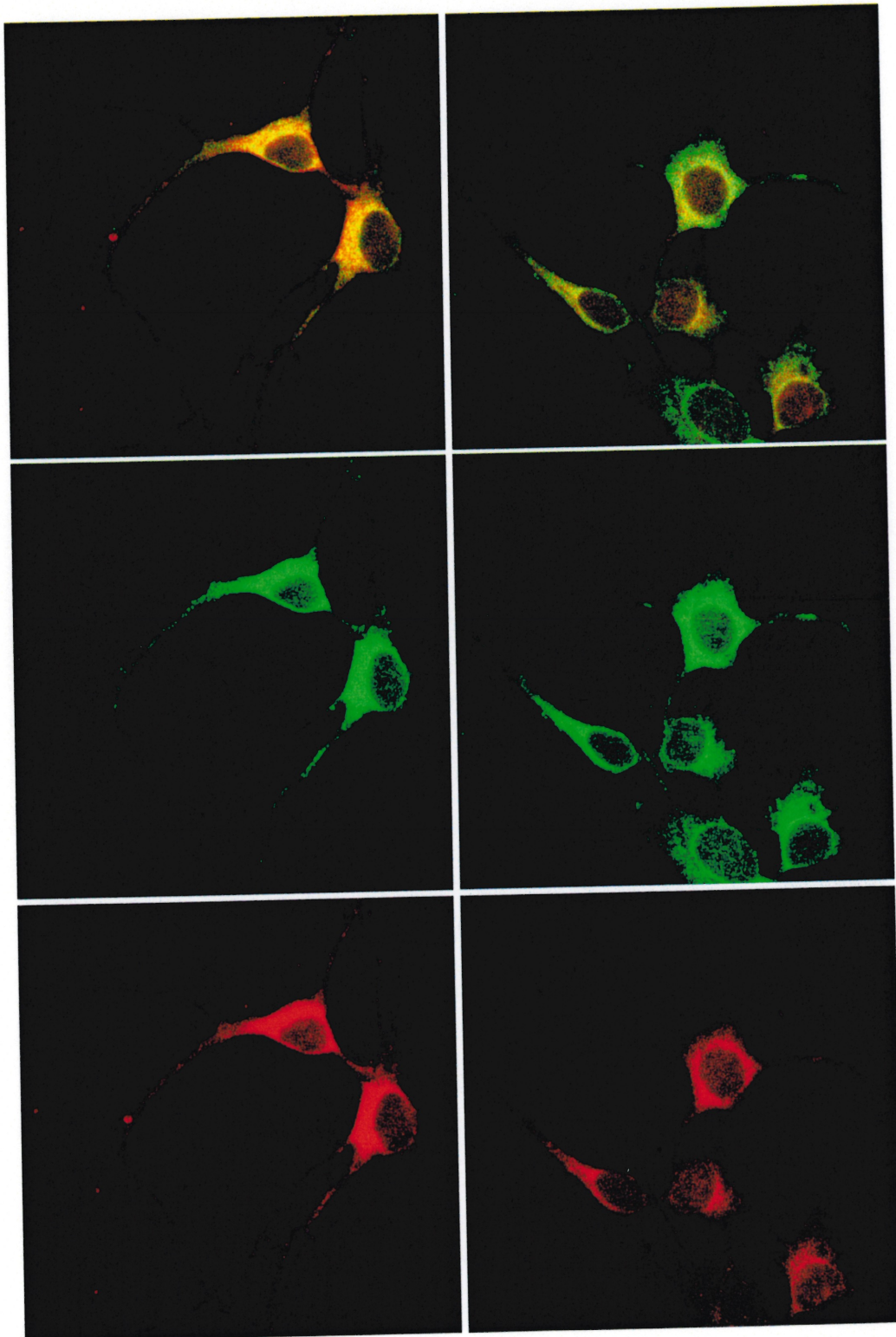


**C**



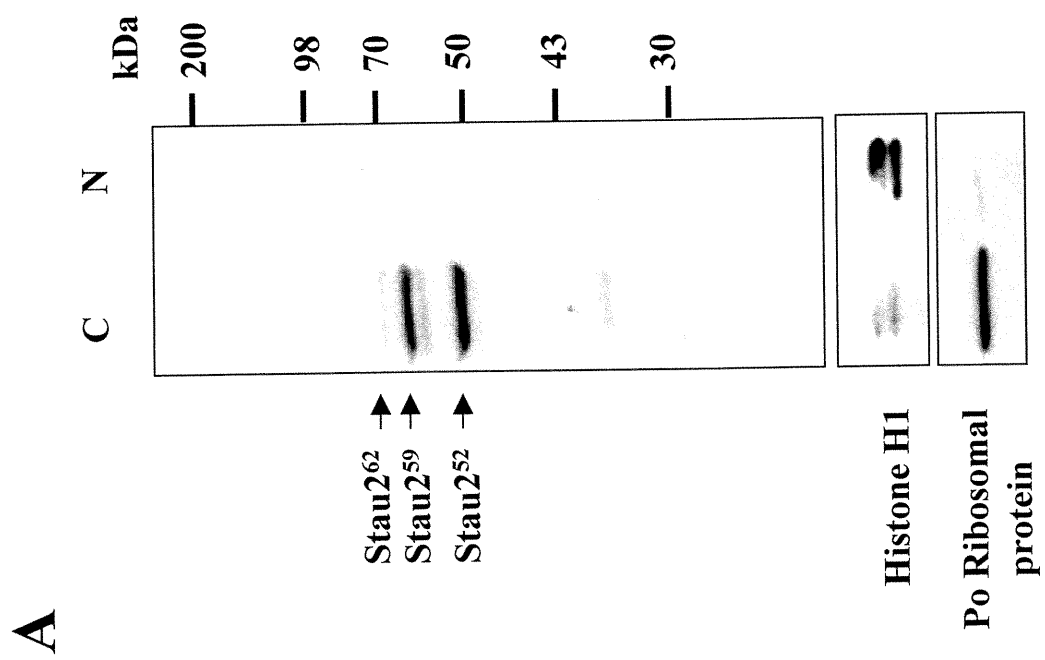
**Figure 5. Stau2 colocalizes with calnexin, a marker of the rough endoplasmic reticulum.**

Hippocampal neurons in culture were fixed and labeled with anti-Stau2 (red) or anti-calnexin (green) antibodies. Right panels are the superposition (yellow) of red and green. Bar = 10  $\mu\text{m}$ .

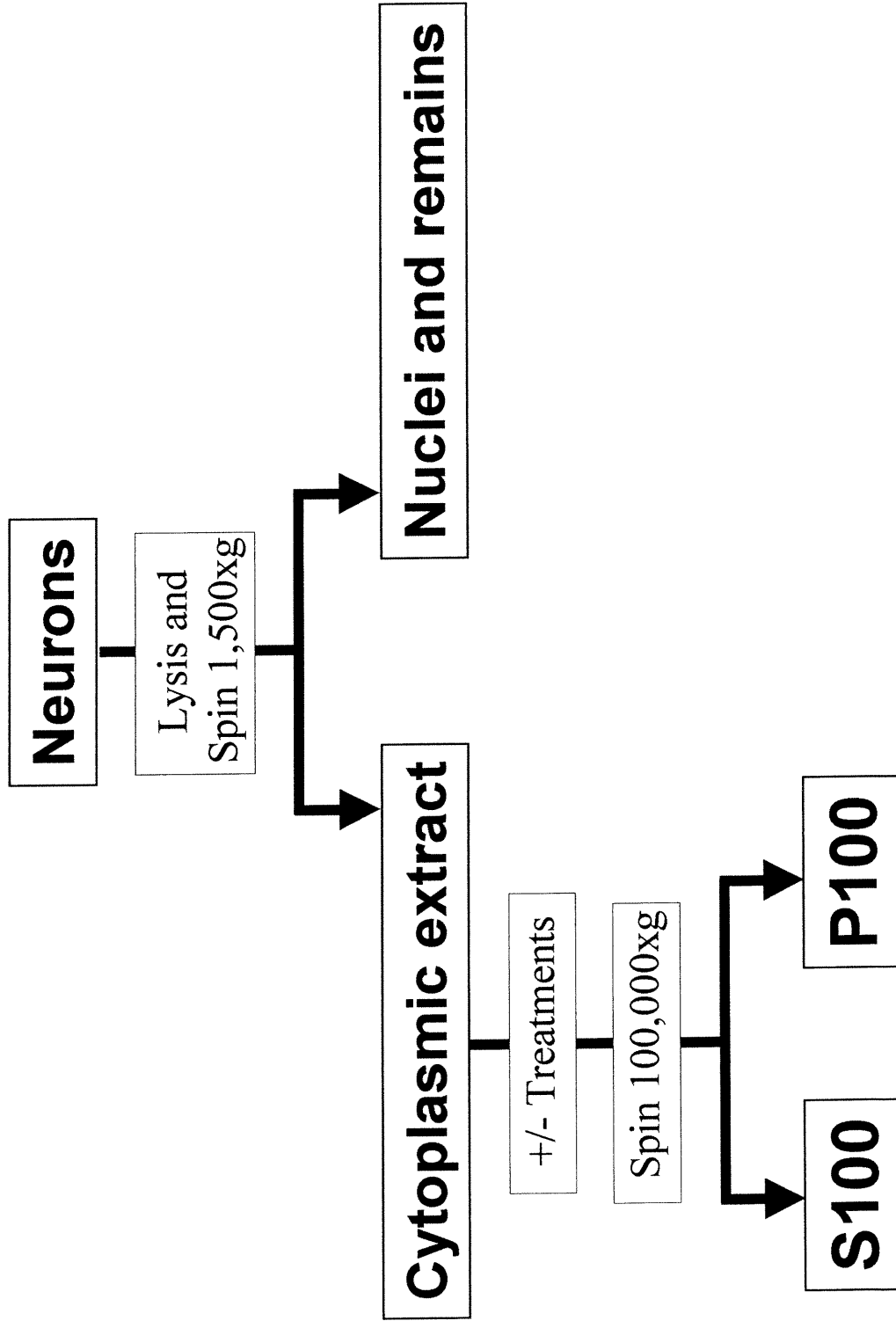


**Figure 6. Stau2 isoforms are present in the cytoplasm and sediment as stable, high-density particles.**

Neurons isolated from cortex were cultured for 6 days. Cytoplasmic/nuclear extracts were prepared by hypotonic lysis and homogenization through a syringe. After low speed centrifugation, the supernatant (cytosolic fraction, C) was removed and the pellet was treated with a non-ionic detergent and centrifuged. The supernatant (cytosolic + detergent, C+d) and pellet (nuclear fraction, N) were recovered and analyzed by Western blotting with anti-Stau2 antibodies (A). Purity of each fraction was tested with antibodies directed against a nuclear protein (histone H1) and a cytosolic (ribosomal protein P<sub>0</sub>). (B) Schematic representation of the strategy for the preparation of the S100-P100 fractions. S100 fractions contain soluble proteins whereas P100 fractions contain high-density protein complexes and organelles. (C) Western blot analysis of the S100 and P100 fractions following different treatments. Cytoplasmic extracts were either left untreated (-) or were treated for 30 min prior to centrifugation with 0,5 M KCl (KCl), 0,5% Nonidet P40 (NP40), 25 mM EDTA (EDTA), 300 U/ml micrococcal nuclease (Rnase) and 0,5% Nonidet P40 and 25 mM EDTA (EDTA+NP40). S100/P100 fractions were analyzed with anti-Stau2 (Stau2), anti-ribosomal protein L7a (L7a), anti- $\alpha$ -tubulin (Tub) , and anti-calnexin (CNX) antibodies. The same results were obtained from two independent experiments.



B

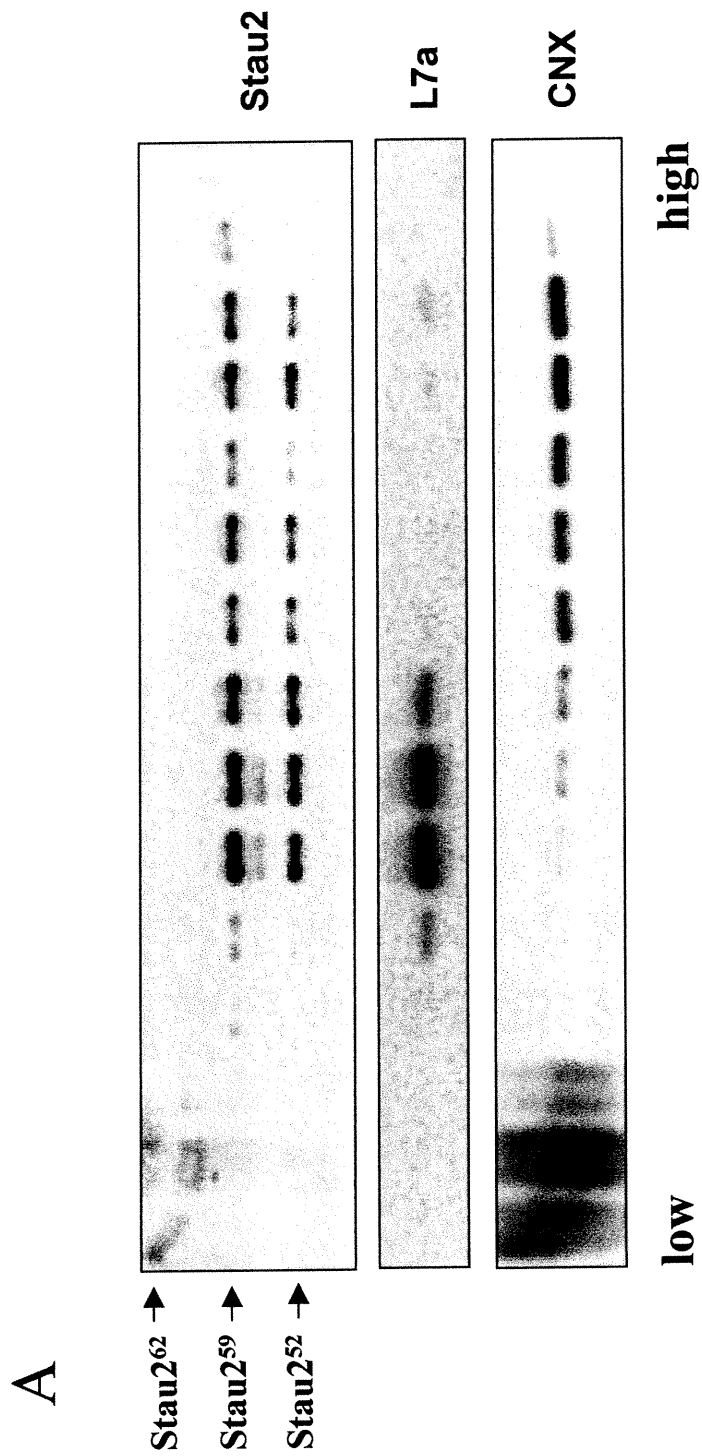


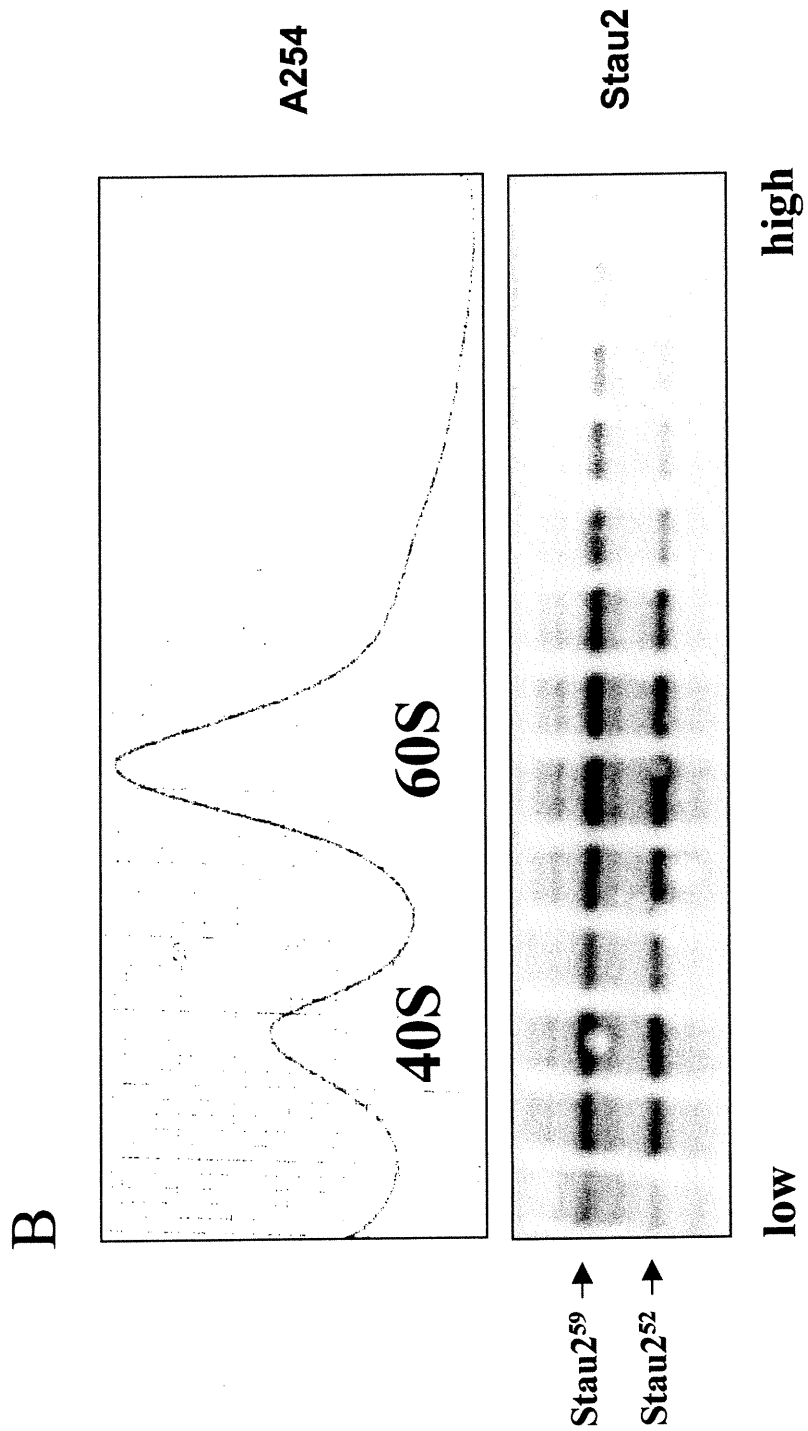




**Figure 7. Stau2<sup>59</sup> and Stau2<sup>52</sup> co-fractionate with ribosomes in sucrose gradients.**

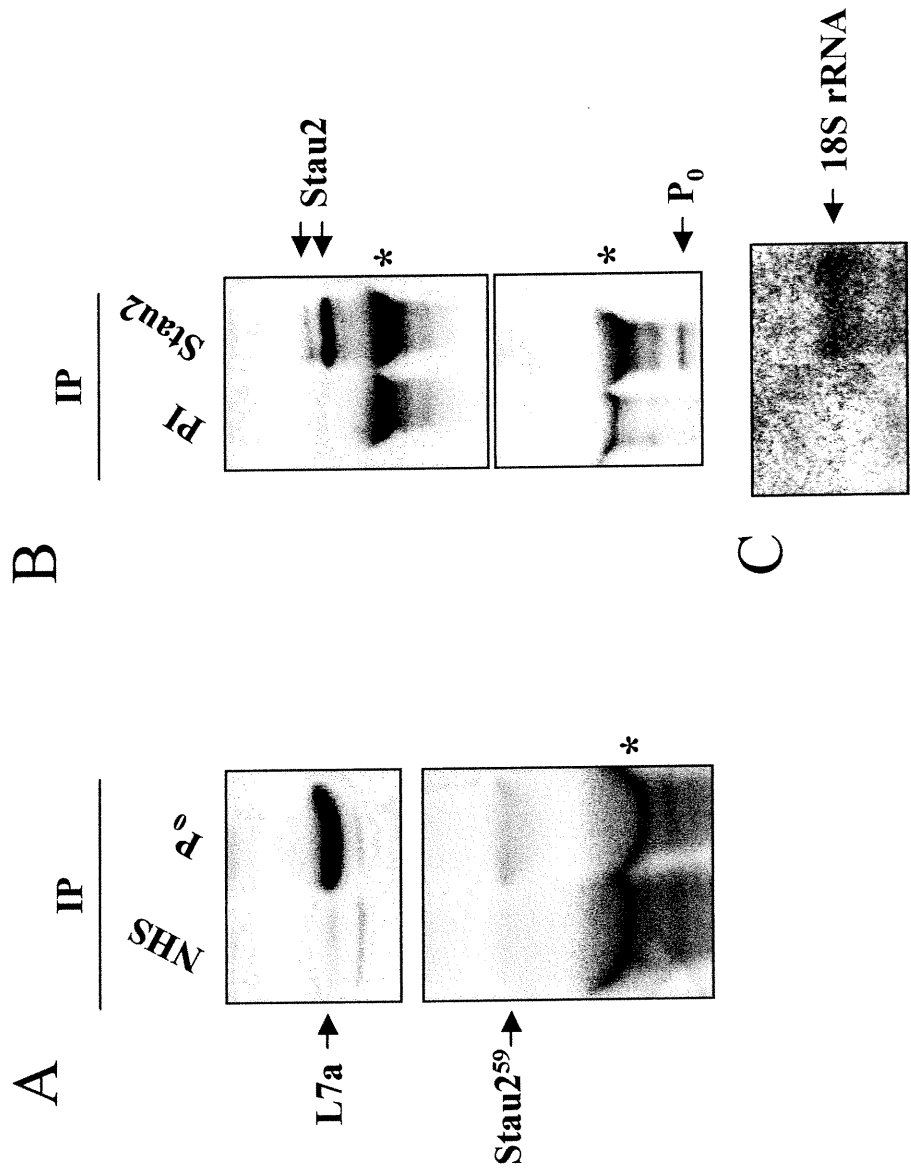
(A) Cytoplasmic extracts from cortex neurons in culture were prepared, placed on a 20-65% discontinuous sucrose gradient and centrifuged at 100,000xg for 3h. Fractions were recovered and analyzed by Western blotting with anti-Stau2 (Stau2), anti-L7a (L7a) and anti-calnexin (CNX) antibodies. The same results was obtained from three independent experiments. (B) Cytoplasmic extracts from cortex neurons in culture were prepared, treated with 25 mM EDTA, placed on a 10-40% continuous sucrose gradient and centrifuged at 38,000 RPM for 4 hours. Fractions were recovered and analyzed by Western blotting with anti-Stau2 (Stau2) antibodies. The position of ribosomal subunits was detected by spectrophotometry at OD<sub>254</sub>. The same result was obtained from three independent experiments.





**Figure 8. Co-immunoprecipitation of Stau2<sup>59</sup> with ribosomes.**

Cytoplasmic extracts from cortex neurons in culture were prepared and immunoprecipitated with (A) normal human serum (NHS) and anti-ribosomal protein P<sub>0</sub> (P<sub>0</sub>) or (B) pre-immune serum (PI) and anti-Stau2 (Stau2) antibodies. Immunoprecipitates were analyzed by Western blotting with anti-L7a, anti-Stau2 and anti-P<sub>0</sub> as indicated. Same results as in (A) were obtained when the immunoprecipitation was carried out with the anti-L7a antibodies (not shown). \*, remaining antibodies. (C) The Stau2 immunoprecipitates (as in B) were also analyzed by Northern blotting for the presence of 18S rRNA (small ribosomal subunit). These experiments were done three times with reproductive results.



**ARTICLE 4 : MOLECULAR MAPPING OF THE HUMAN RNA-BINDING PROTEIN  
STAUEN DETERMINANTS INVOLVED IN RIBOSOME ASSOCIATION.**

### **Mise en contexte**

La colocalisation de Stau1 avec le RER a motivé une étude plus approfondie de la nature de cette association. Étant donné que de nombreuses protéines qui contiennent des dsRBD sont associées aux ribosomes et que ceux-ci sont abondamment ancrés sur le RER, nous avons envisagé la possibilité d'une interaction directe entre Stau1 et les ribosomes. Cet article présente donc une étude de l'association de Stau1 avec les ribosomes de même qu'une cartographie des déterminants impliqués.

**Note**

-Contribution de chacun des auteurs :

M. Luo : Constructions et caractérisation des mutants par sédimentation sur gradients de sucrose, microscopie, mutagenèse et essais de liaison à l'ARN.

T. Duchaine : Étude de sédimentation avec EDTA, co-immunoprécipitations.

L. DesGroseillers : Supervision générale.

Article en révision, resoumission à l'automne 2001.



**Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen/ribosome  
association**

Ming Luo, Thomas Duchaine and Luc DesGroseillers\*

Department of Biochemistry, University of Montreal, Montreal, Canada, H3C 3J7

\* To whom correspondence should be addressed:

Dr. Luc DesGroseillers

Department of Biochemistry

University of Montreal

P.O. Box 6128, Station Centre Ville

Montreal QC Canada

H3C 3J7

Phone:

██████████

Fax:

(514) 343-2210

Email:

████████████████████

**Running title:** Mapping of hStau/ribosome association domains

**Keywords:** RNA-binding protein/ mRNA localization/ mRNA transport/  
cytoskeleton/ RNA-binding activity/ ribosomes

## ABSTRACT

The human double-stranded (ds) RNA-binding protein Staufen (hStau) is thought to be involved in RNA transport and localization. Using sedimentation through sucrose gradients, we showed that the 55 kDa isoform (Stau<sup>55</sup>) co-fractionated with ribosomes and associated with both the 40S and 60S ribosomal subunits. These results suggest that hStau<sup>55</sup> plays some role in translation. To map the determinant(s) involved in this association, we generated a series of deletion mutants and analysed their subcellular distribution by cell fractionation and fluorescent immunomicroscopy. Our results demonstrated that multiple determinants promote hStau<sup>55</sup>/ribosome association via both RNA-binding dependent and RNA-binding independent mechanisms. The RNA-binding dependent mechanism required the RNA-binding activity of the dsRNA-binding domain 3 (dsRBD3). The weak RNA-binding activity of dsRBD4 observed *in vitro* is not required for this function. The RNA-binding dependent mechanism is sufficient since Stau<sup>55</sup>/Δ4-HA<sub>3</sub> strongly bound ribosomes even if the protein-protein component of Stau<sup>55</sup>/ribosome association was abrogated by deletion of dsRBD4. However, dsRBD3 alone is not sufficient for stable association with ribosomes and needs at least the tubulin-binding domain (TBD) as cofactor. The RNA-binding independent mechanism involved protein-protein interaction mediated by both dsRBD4 and TBD. When expressed together, dsRBD4 and TBD constitute the minimal RNA-independent ribosome association domain. RNA-binding activity of dsRBD4 is not required for this association.

## INTRODUCTION

Mammalian Staufen, an RNA-binding protein recognizes and binds dsRNAs and RNAs with extensive secondary structures (Marión *et al.*, 1999; Wickham *et al.*, 1999). Staufen contains four copies of a double-stranded RNA binding domain (dsRBD) consensus sequence. Molecular dissection of the protein *in vitro* revealed that only one of them, dsRBD3, efficiently binds dsRNA, although dsRBD4 carries a weak RNA-binding activity (Wickham *et al.*, 1999). Mammalian Staufen was also shown *in vitro* to bind tubulin via a tubulin-binding domain (TBD) similar to the microtubule-binding domain of MAP-1B (Wickham *et al.*, 1999). Electron microscopy and pharmacological studies in rat hippocampal neurons were consistent with the idea that Stau associates with microtubules, although direct interaction *in vivo* has not been documented (Kiebler *et al.*, 1999; Köhrmann *et al.*, 1999; Monshausen *et al.*, 2001). In both neurons and fibroblasts, Staufen colocalizes mainly with markers of the rough endoplasmic reticulum (RER)(Kiebler *et al.*, 1999; Marión *et al.*, 1999; Wickham *et al.*, 1999). Cell fractionation and sedimentation analyses before and after dissociation of polyribosomes by puromycin or EDTA treatment further suggested that Stau cofractionates with ribosomes and polysomes (Marión *et al.*, 1999). Interestingly, endogenous and transfected Staufen were shown to colocalize with SYTO 14-labeled granules in dendrites of hippocampal neurons in culture (Kiebler *et al.*, 1999; Köhrmann *et al.*, 1999). SYTO 14-labeled granules were shown to correspond to clusters of ribosomes and to colocalize with poly(A<sup>+</sup>) RNAs, the 60S ribosomal subunit and the translation elongation factor 1 $\alpha$  (Knowles

*et al.*, 1996). Therefore, we hypothesize that Staufen/ribosome association observed *in vitro* by biochemical analyses is relevant for Staufen function *in vivo*.

Staufen isoforms with apparent molecular masses of 55 (Stau<sup>55</sup>) and 63/65 (Stau<sup>63</sup>) kDa have been observed by Western blotting in human, mouse and rat. cDNAs coding for Stau<sup>55</sup> have been isolated in these species (Kiebler *et al.*, 1999; Marión *et al.*, 1999; Wickham *et al.*, 1999; Monshausen *et al.*, 2001). We previously reported a differentially spliced transcript in human cells that codes for a protein of 63 kDa and comigrates with the 63 kDa protein observed on Western blots (Wickham *et al.*, 1999). However, since similar differentially spliced transcripts have not been found in mouse and rat (Brizard *et al.*, 2000; Monshausen *et al.*, 2001), it is possible that the cloned transcript is specifically expressed in humans and that the 63/65 kDa isoform represents a third isoform for which a cDNA has not been isolated so far in any species.

In *Drosophila*, Staufen was shown to be involved in the transport and localization of specific mRNAs in oocytes and neuroblasts (St Johnston, 1995) and to be essential for the derepression of oskar mRNA once localized at the posterior pole (Kim-Ha *et al.*, 1995). The role of Staufen in mammals is still unclear. hStau was shown to be a component of RNA-containing granules that migrate in dendrites of hippocampal neurons (Köhrmann *et al.*, 1999) and to be encapsidated along with HIV-1 RNA into virus particles (Mouland *et al.*, 2000), strongly suggesting involvement in mRNA transport. In addition, its putative association with ribosomes in moving granules supports the hypothesis that it can be involved in translation regulation.

In this paper, we used multiple biochemical and cellular techniques to show that one Staufen isoform, hStau<sup>55</sup>, is associated with ribosomes. To understand the mechanism, by which it associates with ribosomes, we also studied the subcellular distribution of a series of hStau<sup>55</sup> mutants expressed in *trans*. These experiments allowed us to identify the molecular requirements for Stau<sup>55</sup>-ribosome association.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture and microscopy

Mammalian cells grown in Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and penicillin/streptomycin were transiently transfected with cDNAs using the calcium/phosphate precipitation technique. Cells were fixed less than 16 h post-transfection to prevent overexpression of the proteins and stained with antibodies as previously described (Wickham *et al.*, 1999). For the analysis of cytoskeleton-associated proteins, transfected cells were first extracted in 0.3% Triton X-100 prior to fixation. Cells were visualized by immunofluorescence (IF) using the 63X Plan-Apochromat objective of a Zeiss Axioskop fluorescence microscope.

### Construction and molecular cloning of the fusion proteins

All mutants were constructed by PCR amplification of the cDNAs coding for hStau<sup>55</sup> using the Vent DNA polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA). The resulting fragments were digested with appropriate restriction enzymes and cloned in pCDNA3/RSV (Jockers *et al.*, 1996). When necessary, a hemagglutinin (HA<sub>3</sub>) tag or the green fluorescent protein (GFP) was added to the C-terminal of the mutants as described previously (Wickham *et al.*, 1999). RBD4/TBD was constructed with the sense primers 5'-ATATAAAGCTTAAGCCACCATGGTCAAGCCACAGACAAGC-3' (underlined: *Hind*III restriction site and Kozak's consensus sequence) and antisense primer 5' TACAATCTAGATTAGCGGCCGCGCTCAGAGGGTCTAGTGCGAG-3'

(underlined: *Xba*I and *Not*I restriction sites). TBD/5 was amplified with the sense primer 5' TACATAAAGCTTAAGCCACCATGGTCAAAGTCCCGCAGCGGC-3' (underlined: *Hind*III restriction site and Kozak's consensus sequence) and the antisense primer 5' TACAATCTAGATTATCAGCGGCCGCACCTCCCACACACAGACAT-3' (underlined: *Xba*I and *Not*I restriction sites). hStau<sup>55</sup>Δ5 was amplified with the sense primer 5'-AATTGGTACCTGCACTGTGCATGAACTTGGA-3' (underlined: *Kpn*I restriction site) and the antisense primer 5'-TATATCTAGATTAGCGGCCGCACAACTCTCGGGCTATCATGGC-3' (underlined: *Xba*I and *Not*I restriction sites). To construct hStau<sup>55</sup>ΔTBD, the sense primer 5'-ATGATAGCCCGAGAGTTGTTGTATGGG-3' was paired to the antisense primer 5'-GACTTTGAAACCAAGGATCTCCAGCAT-3'. The PCR reaction was treated with *Dpn*I (Roche Molecular Biochemicals), T4 PNK Kinase (Pharmacia), self-ligated, cloned and sequenced. The same strategy was used to construct hStau<sup>55</sup>Δ4 (sense primer 5'-ACCAAACCCGCACTCAAGTCAGAGGAG-3' and antisense primer 5'-TGGGCTTGTCTGTGGCTTACTATGGG-3') and hStau<sup>55</sup>Δ3 (sense primer 5'-GCAGTTGAACGAGTAAAGCCTAGAATC-3' and antisense primer 5'-GAGATTTTCTTCTTCGGATTCTCTTCC-3').

Phenylalanyl residues at positions 135 in dsRBD3 and 238 in dsRBD4 were mutated into alanyl residues using two sense primers carrying mutations, 5'-TTTCCCGGGAGAGTGGCCACCCACATGAAGAACGCTGTGACCAAG-3' (underlined: endogenous *Sma*I restriction site, italic: mutated nucleotides), and 5'-TTTAGGCCTCCCGCGCCGCAGGGAGGCTGTGATGCAG-3' (underlined:

endogenous *StuI* restriction site, italic: mutated nucleotides) and the antisense primer 5'-CTACAGCCTGGGCGACCTCGG-3', located downstream from the endogenous *EcoRI* restriction site. The resulting fragments were digested with *SmaI/EcoRI* and *StuI/EcoRI*, respectively, substituted for the corresponding wild type fragment in hStau<sup>55</sup> cDNA, and sequenced.

All the fusion and mutated proteins were first expressed in COS7 cells and analyzed by SDS-PAGE to test their level of expression and stability. We fixed or harvested the cells 16 h post-transfection to prevent overexpression of the proteins in subsequent studies. At this time point, the amounts of transfected proteins are usually less than that of the endogenous Stau<sup>55</sup> protein (not shown). The half-life of wild type and of several mutants has been reported elsewhere (Mouland *et al.*, 2000).

### **Protein purification, Western blotting and RNA-binding assay**

To determine the RNA-binding capacity of hStau<sup>55/3\*</sup> and hStau<sup>55/3\*/4\*</sup>, we substituted the HA<sub>3</sub> tag with a His<sub>6</sub> tag at the C-terminal end of the mutants using the annealed oligonucleotides 5'-GGCCACCATCACCATCACCATTA-3' and 5'-GGCCTAATGGTGATGGTGATGGT-3'. After transfection into HEK293 cells, cells were harvested and lysed. hStau<sup>55</sup>-his<sub>6</sub> fusion proteins were isolated on Ni-NTA columns as described before (Wickham *et al.*, 1999). Expression of the mutants was determined by Western blotting. Their RNA-binding capacity was determined by Northwestern blotting as previously described (Wickham *et al.*, 1999).



### Cell fractionation on sucrose gradients

Cell fractionation was done by sedimentation through sucrose gradients (Antebi and Fink, 1992). COS7 cells were rinsed with cold PBS (pH 7.5) and harvested. Approximately  $4 \times 10^7$  cells were resuspended in 3 ml of lysis buffer (10 mM HEPES, pH 7.5, 12.5% sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml pepstatin, 1  $\mu$ g/ml aprotinin) and subjected to at least 10 strokes in a Dounce homogenizer. Two centrifugations at 700 x g and 1000 x g were performed and the resulting supernatant was layered onto a step gradient of 9 fractions of 22 to 60% (w/v) sucrose in 10 mM HEPES, pH 7.5, 1 mM  $MgCl_2$ . The gradients were centrifuged at 37,000 rpm (SW41 rotor, Beckman Instruments) for 2.5 h at 4°C. Fifteen fractions (0.77 ml) were taken sequentially from the top of the tube and aliquots of each fraction were analyzed by SDS-PAGE. Proteins were transferred to nitrocellulose and probed with anti-HA, anti-hStau<sup>2</sup>, anti-calnexin (Stressgene, BC, Canada), anti-ribosomal L7a or anti- $\alpha$ -tubulin (ICN, CA, USA). Quantification of the protein amounts that cofractionated with ribosomes, the RER or soluble proteins was done with a HP ScanJet (6100C) using the NIH Image processing and analysis program.

For ribosome analysis, COS7 cells were washed in cold PBS pH 7.5 and in isotonic buffer (110 mM KOAc, 2 mM  $MgCl_2$ , 1 mM DTT, 10 mM HEPES, pH 7.5) and recovered with a rubber homogenizer in hypotonic buffer (10 mM KOAc, 2 mM  $MgCl_2$ , 1 mM DTT, 5 mM HEPES pH 7.5, supplemented with 1 U/ml Rnase inhibitors (Applied Biosystems) and EDTA-free COMPLETE protease inhibitor cocktail (Roche). Cells were broken by two sets of 20 strokes in a 23-gauge syringe followed by centrifugation at 1,500 x g for 10 min. Supernatants were pooled,

adjusted to 100 mM KCl and 0,5% Nonidet P40. Extracts were left on ice for 30 min and centrifuged on a continuous 10 to 40% sucrose gradient containing 100 mM KCl, 10 mM KOAc, 2 mM MgOAc, 1 mM DTT and 5 mM HEPES pH 7.5 for 4 hours at 38,000 rpm in a SW41 rotor. For the EDTA treatment experiment, MgCl<sub>2</sub> was omitted and replaced by 25 mM EDTA. Fractions of 0.8 ml were recovered and the RNA sedimentation profile was monitored with a spectrophotometer set at 254 nm. Total RNA was prepared from the fractions by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation and RNA was placed on a denaturing formaldehyde agarose gel. Proteins were recovered by acetone precipitation and analyzed by Western blotting. Images were obtained on a Biorad Phosphorimager.

### **Co-immunoprecipitation**

Transfected cells were washed in isotonic buffer and the extracts were prepared as described above for the ribosomal gradient. Immunoprecipitations were carried out with the anti-ribosomal P protein human antiserum as previously described (Siomi *et al.*, 1996).

## RESULTS

### **Stau<sup>55</sup>-HA<sub>3</sub> is associated with ribosomes**

To determine the subcellular localization of Stau<sup>55</sup> in COS cells and to determine whether transfected hStau<sup>55</sup>-HA<sub>3</sub> has the same distribution and therefore can be used to map the determinant(s) involved in Staufen distribution, we compared their sedimentation profile in a 22 to 60% sucrose gradient. Transfected cells were harvested about 16 h post-transfection to prevent overexpression of the protein. Each fraction of the gradient was analyzed by Western blotting with anti-hStau, anti-HA, anti-calnexin, anti-L7a and anti- $\alpha$ -tubulin antibodies to detect endogenous Stau<sup>55</sup>, transfected hStau<sup>55</sup>-HA<sub>3</sub>, RER, ribosomes and soluble proteins, respectively. As seen in Fig. 1A, endogenous Stau<sup>55</sup> in untransfected cells was found predominantly in ribosome-containing fractions like L7a. The cloned hStau<sup>55</sup>-HA<sub>3</sub> presented a similar profile and also cofractionated with ribosomes (Fig. 1B).

To confirm that endogenous Stau<sup>55</sup> and hStau<sup>55</sup>-HA<sub>3</sub> are associated with ribosomes and to separate ribosome subunits, we separated COS cell extracts in a sharper sucrose gradient (10 to 40%) and a longer centrifugation time in the presence of EDTA. In these conditions, the comigration of endogenous Stau<sup>55</sup> and hStau<sup>55</sup>-HA<sub>3</sub> with both the 40S and 60S ribosomal subunits (Fig. 2) demonstrated their association with ribosomes. Altogether, these results indicated that Stau<sup>55</sup> is associated with ribosomes, that transiently expressed hStau<sup>55</sup>-HA<sub>3</sub> has the same subcellular distribution as the endogenous protein, and that it can be used to identify the molecular determinant(s) involved in Stau<sup>55</sup>/ribosome association.

### **Staufen RNA-binding activity is one of the determinants for ribosome association**

Since hStau<sup>55</sup> contains a strong (dsRBD3) and a weak (dsRBD4) dsRNA-binding domain, is RNA-binding activity involved in hStau<sup>55</sup>/ribosome association? To address this point, we introduced point mutations in dsRBD3 alone (F135A) or in both dsRBD3 (F135A) and dsRBD4 (F238A) to generate hStau<sup>55</sup>/3\*-his<sub>6</sub> and hStau<sup>55</sup>/3\*/4\*-his<sub>6</sub> (Fig. 3). We first tested whether the point mutations introduced in the dsRBDs abolished the dsRNA-binding capacity of the protein. hStau<sup>55</sup>-his<sub>6</sub>, hStau<sup>55</sup>/3\*-his<sub>6</sub> and hStau<sup>55</sup>/3\*/4\*-his<sub>6</sub> were expressed in mammalian cells and purified on Ni-NTA columns. Levels of expression were determined by Western blotting (Fig. 4A) and RNA-binding activity by Northwestern assay (Fig. 4B). This experiment showed that the mutations are sufficient to abolish the dsRNA-binding capacity of the mutants and that dsRBD3 is critical for this activity.

Analysis of transiently transfected COS7 cells by IF showed that hStau<sup>55</sup>/3\*-HA<sub>3</sub> and hStau<sup>55</sup>/3\*/4\*-HA<sub>3</sub> were randomly distributed in the cells, demonstrating that RNA-binding activity contributes to their stable association with cell structures. However, when the cells were treated with Triton X-100 before fixation to remove soluble proteins, significant amounts were retained in Triton-resistant structures (not shown). Consistently, when analyzed by sucrose density centrifugation, more than 35% of the proteins were found with the soluble proteins, as compared to 3% for hStau<sup>55</sup>-HA<sub>3</sub>. Roughly 65% of both hStau<sup>55</sup>/3\*-HA<sub>3</sub> (not shown) and hStau<sup>55</sup>/3\*/4\*-HA<sub>3</sub> (Fig. 4C) proteins still cofractionated with the ribosome marker. A similar point mutation that abolished the weak RNA-binding activity of dsRBD4 alone

(hStau<sup>55</sup>/4\*-HA<sub>3</sub>) had no effect on its distribution which is similar to that of hStau<sup>55</sup>-HA<sub>3</sub> (not shown). These results indicate that dsRBD3 RNA-binding activity plays a role(s) in the subcellular localization of hStau<sup>55</sup>, especially on the amount and strength of hStau<sup>55</sup>/ribosome association. However, because it did not completely abolish cofractionation of the protein with ribosomes, the suggestion is that protein-protein interaction also occurs.

#### **dsRBD4 and TBD are critical for the RNA-independent Stau<sup>55</sup>/ ribosome association**

To identify the molecular determinant(s) involved in protein-protein interaction, we first deleted each domain of the protein to generate hStau<sup>55</sup>Δ3-HA<sub>3</sub>, hStau<sup>55</sup>Δ4-HA<sub>3</sub>, hStau<sup>55</sup>ΔTBD-HA<sub>3</sub> and hStau<sup>55</sup>Δ5-HA<sub>3</sub> (Fig. 3). Each mutant was transfected in COS7 cells and their subcellular localization was determined by immunofluorescence microscopy and velocity sedimentation.

Expression of a mutant with deletion of dsRBD3 gave the same phenotype as hStau<sup>55</sup>/3\*/4\*-HA<sub>3</sub> (compare Figs. 5A and Fig. 4C); significant amounts of the protein were found with soluble proteins but roughly 65% of hStau<sup>55</sup>Δ3-HA<sub>3</sub> was still associated with ribosomes. Deletion of dsRBD5 (hStau<sup>55</sup>Δ5-HA<sub>3</sub>) had no major effect on hStau<sup>55</sup> distribution, which still cofractionated with ribosomes (Fig. 5B). Therefore, dsRBD5 is not involved in Stau<sup>55</sup>/ribosome protein-protein interaction. In contrast, hStau<sup>55</sup>ΔTBD-HA<sub>3</sub> did not cofractionate with the bulk of ribosomes but rather was found in fractions of higher density (Fig. 5C). We do not know whether the hStau<sup>55</sup>ΔTBD-HA<sub>3</sub>-containing complexes also contained ribosomes since small

amounts of ribosomes were observed in these fractions following longer exposure times of the Western blots. Strangely, its association to dense particles seems to be at least in large part independent of dsRBD3's RNA-binding activity (not shown). This result demonstrates that TBD is critical for hStau<sup>55</sup>/ribosome interaction or at least for proper formation of relevant complexes. Deletion of dsRBD4 from hStau<sup>55</sup> (hStau<sup>55</sup>Δ4-HA<sub>3</sub>) seemed to have no major effect on the strong ribosome association of the protein (Fig. 6A). However, when deletion of dsRBD4 was paired to a point mutation in dsRBD3 that abolished Stau<sup>55</sup> RNA-binding activity, hStau<sup>55</sup>/3\*/Δ4-HA<sub>3</sub> showed random cytoplasmic/nuclear distribution by IF (not shown) and cofractionated with soluble proteins in the gradient (Fig. 6B). Therefore, hStau<sup>55</sup>Δ4-HA<sub>3</sub> associates with ribosomes only via an RNA-binding dependent molecular mechanism in contrast to hStau<sup>55</sup>-HA<sub>3</sub>, which relies on both RNA-binding activity and protein-protein interaction. Altogether, our results demonstrate that both TBD and dsRBD4, but not its weak RNA-binding activity (compare hStau<sup>55</sup>/3\*/4\*-HA<sub>3</sub> with hStau<sup>55</sup>/3\*/Δ4-HA<sub>3</sub>), play a significant role in hStau<sup>55</sup>/ribosome protein-protein interaction.

#### **dsRBD4/TBD is necessary and sufficient for interacting with ribosomes**

We then mapped the minimal domain that is required for hStau<sup>55</sup>/ribosome protein-protein interaction. When expressed alone, neither dsRBD4-HA<sub>3</sub> nor TBD-HA<sub>3</sub> cofractionated with ribosomes (not shown). As seen by IF, dsRBD4-GFP (Fig. 7A-B) and TBD-GFP (Wickham *et al.*, 1999) were both randomly distributed in the cell and extracted by Triton X-100. However, when fused together, large amounts of

RBD4/TBD-GFP were retained with Triton X-100 insoluble materials (Fig. 7C-D). Accordingly, RBD4/TBD-HA<sub>3</sub> cofractionated with ribosomes in the sucrose gradient (Fig. 8A). About 35% of RBD4/TBD-HA<sub>3</sub> was also found in fractions with soluble proteins, as described above for hStau<sup>55</sup>/3\*/4\*-HA<sub>3</sub>. These results demonstrate that the region encompassing dsRBD4/TBD is necessary and sufficient for the localization of Staufen to ribosomes through protein-protein interaction and constitutes the minimal RNA-independent ribosome-binding domain.

We then tested whether RNA-binding activity is important in the context of the minimal domain. F238A point mutation was introduced in dsRBD4 to generate RBD4\*/TBD-HA<sub>3</sub>. Both IF analyses in the presence or absence of Triton X-100 (not shown) and cell fractionation (Fig. 8B) indicated that the mutation that abolished the RNA-binding activity of dsRBD4 had no effect on RBD4\*/TBD-HA<sub>3</sub> distribution when compared to that of RBD4/TBD-HA<sub>3</sub>. This indicated that basal ribosome binding via dsRBD4 and TBD is completely independent of RNA binding activity and confirms that this association occurs through protein-protein interaction.

#### **hStau<sup>55</sup>-HA<sub>3</sub> and dsRBD4/TBD co-immunoprecipitate with ribosomes**

To gain further evidence that hStau<sup>55</sup> and RBD4/TBD are bound to ribosomes, we immunoprecipitated ribosomes and tested for their presence in the immunoprecipitates. Therefore, hStau<sup>55</sup>-HA<sub>3</sub>, RBD4/TBD-HA<sub>3</sub> and TBD/5-HA<sub>3</sub>, used as control, were expressed in COS7 cells. TBD/5-HA<sub>3</sub>, shown to be randomly distributed and completely removed by Triton treatment in transfected cells, was found in fractions containing soluble proteins in the sucrose gradient (not shown). Transfected cell extracts were immunoprecipitated with anti-human ribosome

antibody. Immunoprecipitates were analyzed by Western blotting with anti-L7a (Fig. 9A) and anti-HA (Fig. 9B) antibody to monitor ribosome precipitation and test putative co-immunoprecipitation of HA-tagged proteins, respectively. As expected from Figs. 2 and 8, both hStau<sup>55</sup>-HA<sub>3</sub> (Fig. 9B, lane 8) and RBD4/TBD-HA<sub>3</sub> (Fig. 9B, lane 7) were detected in the immunoprecipitates, whereas TBD/5-HA<sub>3</sub> was not (Fig. 9B, lane 6). This further confirms Staufen's presence in a complex that also contains ribosomes and that RBD4/TBD is sufficient for the RNA-independent interaction.



## DISCUSSION

### **Stau<sup>55</sup> is associated with ribosomes**

It was previously suggested that Staufen is involved in mRNA transport in neurons (Köhrmann *et al.*, 1999; Kiebler and DesGroseillers, 2000; Monshausen *et al.*, 2001). This suggestion was based on the fact that Staufen-GFP labeled granules move from the cell body into dendrites in a microtubule-dependent manner. This present paper now demonstrates that Stau<sup>55</sup> may play additional and complementary role(s) in the cell. Our results on endogenous and transfected Staufen demonstrate that Stau<sup>55</sup> is mainly associated with ribosomes. Its distribution in the same fractions as ribosomes in the sucrose gradients and its relocalization with ribosomal subunits in the presence of EDTA are strong evidence for a physical interaction between Stau<sup>55</sup> and ribosomes. These results confirm the unlikelihood that the cofractionation of Stau<sup>55</sup> with ribosomes is only a coincidental consequence of an association with a complex of the same density as ribosomes. Several members of the dsRNA-binding protein family, such as the double-stranded RNA dependent protein kinase (PKR), the *Xenopus laevis* RNA-binding protein A (Xlrbpa), the TAR-RNA binding protein (TRBP) and NF90 were also shown to bind ribosomes (Eckmann and Jantsch, 1997; Zhu *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1998; Langland *et al.*, 1999). The molecular mechanism for ribosome association may be similar between members of the family since association of PKR with ribosomes involves both the presence of functional dsRBDs and an additional RNA-independent ribosome-association site (Zhu *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1998). We do not exclude the possibility that Stau<sup>55</sup>/ribosome complexes are

localized close to or linked to membranes *in vivo* since Staufen mainly colocalizes with markers of the RER when observed by fluorescence microscopy (Kiebler *et al.*, 1999; Marión *et al.*, 1999; Wickham *et al.*, 1999).

Therefore, we propose that Stau<sup>55</sup> is involved in a ribosome-related function. Since Stau<sup>55</sup> is ubiquitously expressed in mammals, it may be involved in a general pathway of translation regulation. Alternatively, it may define a functional subpopulation of ribosomes, for example, those recruited for RNA localization which is a phenomenon described in every cell type but more easily documented in neurons. In neurons, hStau<sup>55</sup>-GFP colocalized with SYTO 14-labeled RNA granules (Köhrmann *et al.*, 1999), suggesting that Stau<sup>55</sup> is a component of these granules. It was previously shown that SYTO 14-labeled granules are clusters of ribosomes, poly(A<sup>+</sup>) RNA and translation factors (Knowles *et al.*, 1996). Therefore, Stau<sup>55</sup> may be an important player in a dynamic and multi-step pathway involved in the transport of translationally silent RNA granules, transfer of specific mRNAs to active polysomes following cell activation or direct modulation of translation at local sites (Kiebler and DesGroseillers, 2000). The meaning of Stau<sup>55</sup>/ribosome association for any of these functions is unknown. Stau<sup>55</sup> may recruit ribosomes and allow their transport and localization along with mRNAs. Alternatively, it may directly modulate ribosome functions through interaction with ribosomal proteins, rRNA, ribosome-associated proteins or translation factors. It may repress translation in RNA granules during transport and derepress it once RNAs are localized. Genetic studies involving *oskar* mRNA and Staufen in *Drosophila* (Kim-Ha *et al.*, 1995) are consistent with the possibility that Staufen modulates translation. It will be interesting to determine

whether Stau<sup>55</sup> is involved in the derepression of mRNA translation as does its *Drosophila* homologue (Micklem *et al.*, 2000) or whether it plays other role(s). In the former hypothesis, dsRBD5 might functionally cooperate with the identified ribosome association domains to regulate translation since *Drosophila* dsRBD5 was shown to be involved in the derepression of *oskar* mRNA translation once localized (Micklem *et al.*, 2000).

In addition, Stau<sup>55</sup> may compete for ribosome-binding sites or modulate the function(s) of other ribosome-bound members of the dsRBP family. Heterodimer formation between members of the family have been described (Cosentino *et al.*, 1995; Benkirane *et al.*, 1997).

### **Ribosome association through dsRNA-binding activity**

Our analyses of mutants demonstrate that dsRBD3 is the major RNA-binding domain and one of the molecular determinants for Stau<sup>55</sup> association with ribosomes. Our results are consistent with the proposal that it is the RNA-binding activity of dsRBD3 that is crucial for this function. Indeed, a point mutation that disrupted the dsRBD3 RNA-binding activity has the same phenotype as the complete deletion of dsRBD3. The same mutation introduced in the highly conserved phenylalanyl residue in both *Drosophila* Staufen and mammalian PKR dsRBDs was shown to strongly reduce the RNA binding activity of these domains without affecting structurally important residues (Bycroft *et al.*, 1995; Green *et al.*, 1995; McMillan *et al.*, 1995; Krovat and Jantsch, 1996; Patel *et al.*, 1996). Consistently, structural studies demonstrated that the phenylalanyl residue has a role in the function of the domain rather than in its structure (Bycroft *et al.*, 1995; Kharrat *et al.*, 1995; Nanduri *et al.*,

1998; Ryter and Schultz, 1998). In contrast, the weak RNA-binding activity of dsRBD4 observed *in vitro* is not necessary for these functions. Indeed, dsRBD4 seems to contribute very little, if any, to the RNA-binding activity of the full-length protein *in vivo*. We do not exclude the possibility that dsRBD3 is also involved in protein-protein interaction. A point mutation in dsRBD1 of PKR that abrogates the RNA-binding activity of the protein was also shown to abolish PKR interaction with the 60S ribosomal protein L18, suggesting that competition between L18 and dsRNA for dsRBD1-binding site regulates PKR activity (Kumar *et al.*, 1999).

Recruitment of Stau<sup>55</sup> RNA-binding activity as molecular determinant for ribosome association suggests that Stau<sup>55</sup> may directly bind ribosomal RNA. This would be consistent with the fact that Stau<sup>55</sup> binds both ribosomal subunits (this paper) and that the NMR solution structure of *Drosophila* dsRBD3 shares many features common to the N-terminal domain of the bacterial ribosomal RNA-binding protein S5 (Bycroft *et al.*, 1995). If bound to rRNA, Stau<sup>55</sup> may not be directly linked to mRNAs. Stau<sup>55</sup>/ribosome complexes may represent a reservoir of Stau<sup>55</sup> waiting for incoming RNAs to become active. Recruitment of specific mRNAs within these complexes may be done by associated RNA-binding proteins such as ZBP or FMRP that recognized sequence-specific elements in the 3'-UTR of localized mRNAs. Upon cell signal(s), Stau<sup>55</sup> may bind mRNAs, leave the ribosome granules, and reach polysomes to allow local translation. Alternatively, Stau<sup>55</sup> may only indirectly be associated with ribosomes via binding of mRNAs. However, not consistent with this hypothesis is the fact that Stau<sup>55</sup> is still associated with ribosomes after RNase treatment, in contrast to the poly(A)-binding protein which was dissociated from

ribosome-enriched fractions and found in the supernatant (Duchaîne and DesGroseillers, unpublished).

### **Protein-protein interaction is also involved in hStau<sup>55</sup>-ribosome association**

Protein-protein interaction plays a role in Stau<sup>55</sup>-ribosome association. Our results demonstrate that the region encompassing dsRBD4 and TBD is sufficient for this association. However, since hStau<sup>55</sup>Δ4-HA<sub>3</sub> bound ribosomes in the absence of protein-protein interaction, this region does not seem to be essential. Our results are consistent with the possibility that dsRBD4 is responsible for Stau<sup>55</sup>'s protein-protein interaction. Protein-protein interactions mediated by dsRBDs have been reported for *Drosophila* Staufen and other members of the dsRNA-binding protein family (Cosentino *et al.*, 1995; Schmedt *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1997; Schuldt *et al.*, 1998). A putative target for dsRBD4 is the endogenous Stau<sup>55</sup> or other members of the dsRBP family that are already present on ribosomes. dsRBD4 would then specify dimer formation rather than ribosome association. From this perspective, the role of RNA-binding activity in Stau<sup>55</sup>/ribosome association is markedly underestimated. Formation of dimers between endogenous Staufen isoforms (Duchaîne *et al.*, 2000) or between different members of the family has been shown before (Cosentino *et al.*, 1995; Benkirane *et al.*, 1997). Dimer formation between different Stau isoforms may be necessary for the formation of the SYTO 14-labeled ribosome clusters observed in dendrites of neurons and for the regulation of the transport or translation of Stau-containing particles. Binding to endogenous Staufen is consistent with the fact that Stau<sup>55</sup>/ribosome association through the RNA-binding independent mechanism is

saturable, meaning that only a limited and fixed amount of proteins were associated with ribosomes even in conditions where proteins were overexpressed. In contrast, the amount of ribosome-bound hStau<sup>55</sup>-HA<sup>3</sup> increased with overexpression.

If dsRBD4 is dispensable for proper ribosome binding, TBD is essential. However, its role is still unclear and may involve indirect mechanisms. For example, Stau<sup>55</sup> binding to ribosomes may involve prior or simultaneous association with the microtubule network. It is known that ribosomes are associated with the cytoskeleton (Pachter, 1992) and that both the distribution (Kiebler *et al.*, 1999) and the movement (Köhrmann *et al.*, 1999) of Stau<sup>55</sup>-containing ribosome clusters within dendrites of neurons in culture are sensitive to drugs that disrupt microtubules. In addition, TBD was shown to bind tubulin *in vitro* (Wickham *et al.*, 1999). Therefore, TBD may be part of a molecular mechanism involved in the dynamic translocation of hStau-containing complexes between ribosomes and microtubules. In the absence of TBD, Stau<sup>55</sup> protein-protein interaction through dsRBD4 may be either unregulated or may involve inappropriate partners.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Montmarquette for technical assistance; Drs. A. Mouland, R. Subramanian, L. Brakier-Gingras and M.A. Kiebler for critical reading of different versions of the manuscript; Judith Kashul for editing the manuscript; Dr Michel Bouvier (Département de Biochimie, Université de Montréal) for the anti-HA antibodies; Dr A. Ziemiecki (University of Berne, Switzerland) and Dr M. Reichlin (Oklahoma Medical Research Foundation, USA) for the anti-ribosomal L7a and P antibodies, respectively; and L. Cournoyer for help with tissue culture. This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to LDG. TD was supported by an NSERC studentship.

## REFERENCES

Antebi, A., and Fink, G.R. (1992). The yeast Ca(2+)-ATPase homologue, PMR1, is required for normal Golgi function and localizes in a novel Golgi-like distribution. *Mol Biol Cell* 3, 633-654.

Benkirane, M., Neuveut, C., Chun, R.F., Smith, S.M., Samuel, C.E., Gatignol, A., and Jeang, K.T. (1997). Oncogenic potential of TAR RNA binding protein TRBP and its regulatory interaction with RNA-dependent protein kinase PKR. *EMBO J.* 16, 611-624.

Brizard, F., Luo, M., and DesGroseillers, L. (2000). Genomic organization of the human and mouse *stau* genes. *DNA Cell Biol.* 19, 331-339.

Bycroft, M., Grünert, S., Murzin, A.G., Proctor, M., and St Johnston, D. (1995). NMR solution structure of a dsRNA binding domain from *Drosophila* stau protein reveals homology to the N-terminal domain of ribosomal protein S5. *EMBO J.* 14, 3563-3571.

Cosentino, G.P., Venkatesan, S., Serluca, F.C., Green, S.R., Mathews, M.B., and Sonenberg, N. (1995). Double-stranded-RNA-dependent protein kinase and TAR RNA-binding protein form homo- and heterodimers *in vivo*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92, 9445-9449.



Duchaine, T., Wang, H.J., Luo, M., Steinberg, S.V., Nabi, I.R., and DesGroseillers, L. (2000). A Novel Murine Staufen Isoform Modulates the RNA Content of Staufen Complexes. *Mol.Cell Biol.* 20, 5592-5601.

Eckmann, C.R., and Jantsch, M.F. (1997). Xlrpba, a double-stranded RNA-binding protein associated with ribosomes and heterogeneous nuclear RNPs. *J.Cell Biol.* 138, 239-253.

Green, S.R., Manche, L., and Mathews, M.B. (1995). Two functionally distinct RNA-binding motifs in the regulatory domain of the protein kinase DAI. *Mol.Cell.Biol.* 15, 358-364.

Jockers, R., Da Silva, A., Strosberg, A.D., Bouvier, M., and Marullo, S. (1996). New molecular and structural determinants involved in beta 2-adrenergic receptor desensitization and sequestration. Delineation using chimeric beta 3/beta 2-adrenergic receptors. *J.Biol.Chem.* 271, 9355-9362.

Kharrat, A., Macias, M.J., Gibson, T.J., Nilges, M., and Pastore, A. (1995). Structure of the dsRNA binding domain of *E.coli* RNase III. *EMBO J.* 14, 3572-3584.

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

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

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.

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.

Köhrmann, 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.

Krovat, B.C., and Jantsch, M.F. (1996). Comparative mutational analysis of the double-stranded RNA binding domains of *Xenopus laevis* RNA-binding protein A. *J.Biol.Chem.* *271*, 28112-28119.

Kumar, K.U., Srivastava, S.P., and Kaufman, R.J. (1999). Double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) is negatively regulated by 60S ribosomal subunit protein L18. *Mol.Cell Biol.* *19*, 1116-1125.

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. *Biochemistry* *38*, 6361-6368.

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.

Marión, 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.

McMillan, N.A.J., Chun, R.F., Siderovski, D.P., Galabru, J., Toone, W.M., Samuel, C.E., Mak, T.W., Hovanessian, A.G., Jeang, K.T., and Williams, B.R.G. (1995). HIV-1 Tat directly interacts with the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent kinase, PKR. *Virology* *213*, 413-424.

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.

Monshausen, M., Putz, U., Rehbein, M., Schweizer, M., DesGroseillers, L., Kuhl, D., Richter, D., and Kindler, S. (2001). Two rat brain Staufen isoforms differentially bind RNA. *J.Neurochem.* *76*, 155-165.

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 Encapsulation. *J.Virol.* *74*, 5441-5451.

Nanduri, S., Carpick, B.W., Yang, Y.W., Williams, B.R.G., and Qin, J. (1998). Structure of the double-stranded RNA-binding domain of the protein kinase PKR reveals the molecular basis of its dsRNA-mediated activation. *EMBO J.* *17*, 5458-5465.

Pachter, J.S. (1992). Association of mRNA with the cytoskeletal framework: its role in the regulation of gene expression. *Crit.Rev.Eukaryotic gene expression* *2*, 1-18.

Patel, R.C., Stanton, P., and Sen, G.C. (1996). Specific mutations near the amino terminus of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) differentially

affect its double-stranded RNA binding and dimerization properties. *J.Biol.Chem.* 271, 25657-25663.

Ryter, J.M., and Schultz, S.C. (1998). Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA. *EMBO J.* 17, 7505-7513.

Schmedt, C., Green, S.R., Manche, L., Taylor, D.R., Ma, Y., and Mathews, M.B. (1995). Functional characterization of the RNA-binding domain and motif of the double-stranded RNA-dependent protein kinase DAI (PKR). *J.Mol.Biol.* 249, 29-44.

Schuldt, A.J., Adams, J.H.J., 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.

Siomi, M.C., Zhang, Y., Siomi, H., and Dreyfuss, G. (1996). Specific sequences in the fragile X syndrome protein FMR1 and the FXR proteins mediate their binding to 60S ribosomal subunits and the interactions among them. *Mol Cell Biol* 16, 3825-3832.

St Johnston, D. (1995). The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell* 81, 161-170.

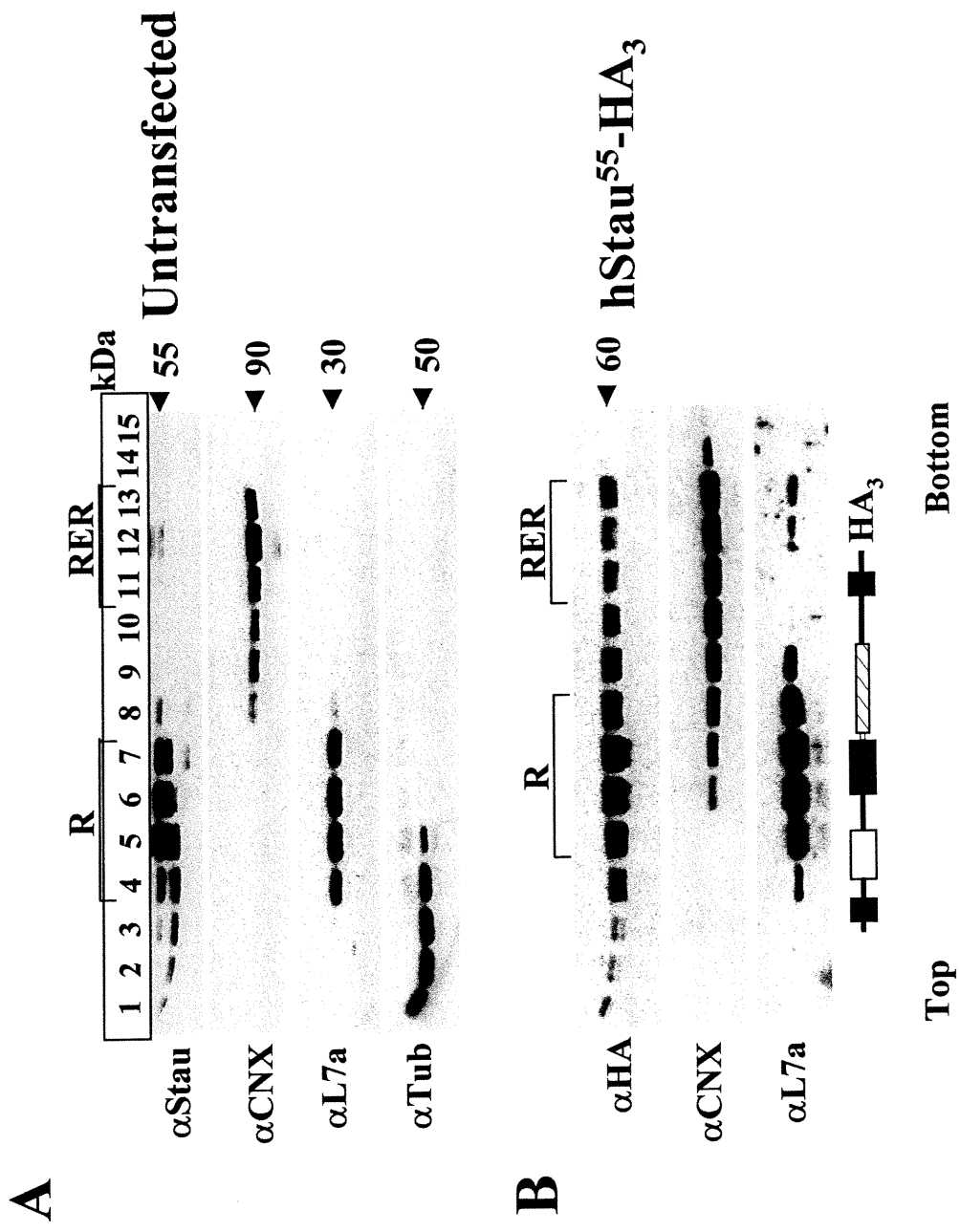
Wickham, L., Duchaine, T., Luo, M., Nabi, I.R., and DesGroseillers, L. (1999). Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol.Cell Biol.* 19, 2220-2230.

Wu, S., Kumar, K.U., and Kaufman, R.J. (1998). Identification and requirement of three ribosome binding domains in dsRNA-dependent protein kinase (PKR). *Biochemistry* 37, 13816-13826.

Zhu, S., Romano, P.R., and Wek, R.C. (1997). Ribosome targeting of PKR is mediated by two double-stranded RNA- binding domains and facilitates in vivo phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2. *J.Biol.Chem.* 272, 14434-14441.

**Figure 1. Association of the Stau<sup>55</sup> isoform with ribosomes.**

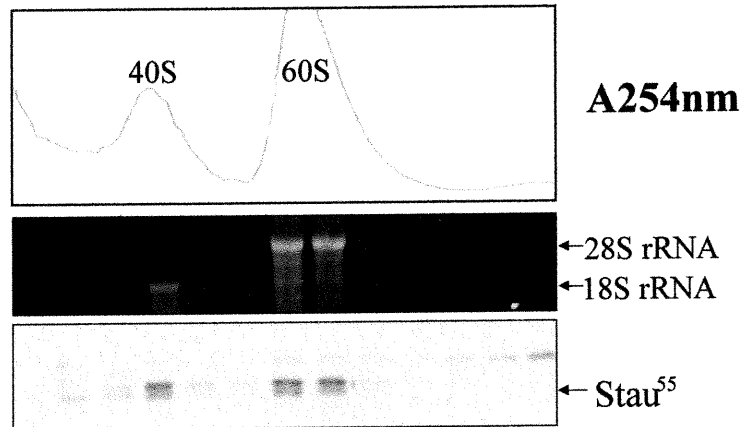
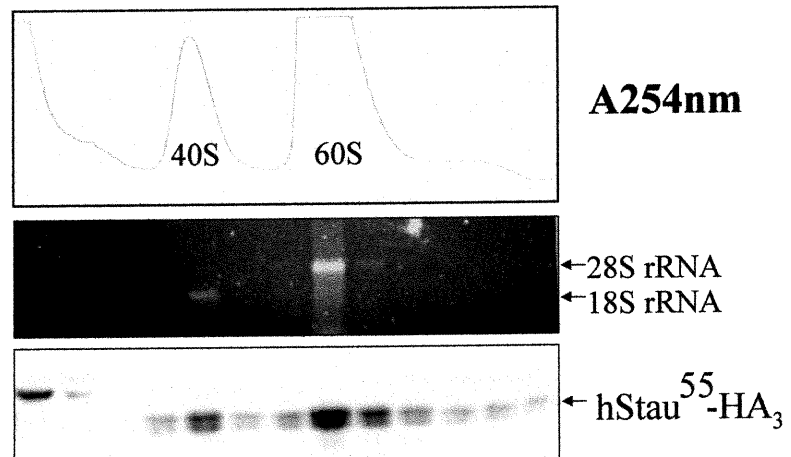
(A) Untransfected COS7 cells were homogenized and fractionated on a sucrose gradient. Each fraction was collected and the proteins separated by SDS-PAGE. Staufen, RER, ribosomes and soluble proteins were detected as indicated with anti-Staufen (Stau), anti-calnexin (CNX), anti-L7a and  $\alpha$ -tubulin (Tub) antibodies, respectively. Molecular mass (kDa) of the proteins is indicated on the right. The fast migrating proteins of about 53 kDa are generated from Stau<sup>55</sup> by differential translation initiation at different ATGs (Luo and DesGroseillers, unpublished). **R**: ribosome. (B) COS7 cells were transfected with cDNAs coding for hStau<sup>55</sup>-HA<sub>3</sub>, lysed 16 h post-transfection and analyzed as described in (A), except that fusion proteins were detected with the anti-HA antibody. L7a is also detected in RER fractions on overexposed blots. Schematic representation of transfected protein is shown below the gel. White and grey boxes represent the major and minor RNA-binding domains, respectively, while black boxes represent regions with RNA-binding consensus sequence but lacking RNA-binding activity *in vitro*. The hatched box indicates the position of the region similar to the MAP1B microtubule-binding domain.





**Figure 2. Endogenous and transfected Stau<sup>55</sup> cofractionate with ribosomal subunits.**

Untransfected COS7 cells (A) or cells transfected with a cDNA coding for hStau<sup>55</sup>-HA<sub>3</sub> (B) were incubated in the presence 25mM EDTA and loaded on a linear 10 to 40% sucrose gradient. Each fraction was collected and screened for rRNA by Northern blotting and for Stau<sup>55</sup> by Western blotting using anti-Stau (A) or anti-HA (B) antibodies.











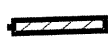
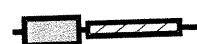


**A** Untransfected**B** hStau<sup>55</sup>-HA<sub>3</sub>

Top

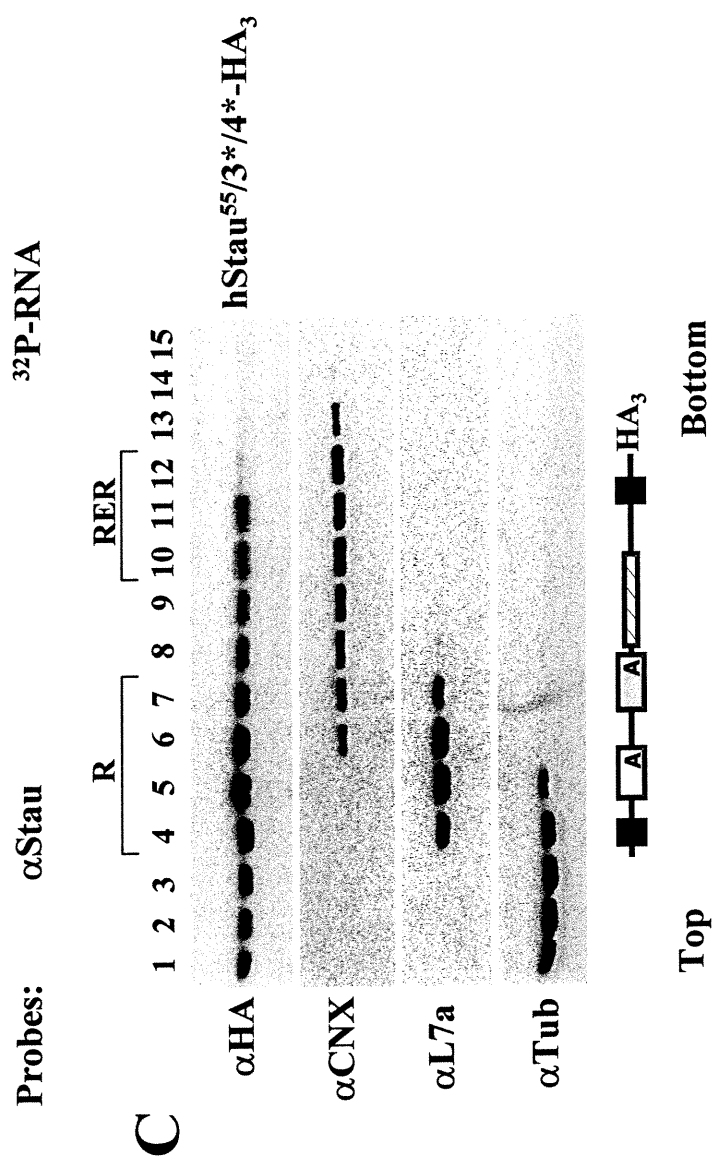
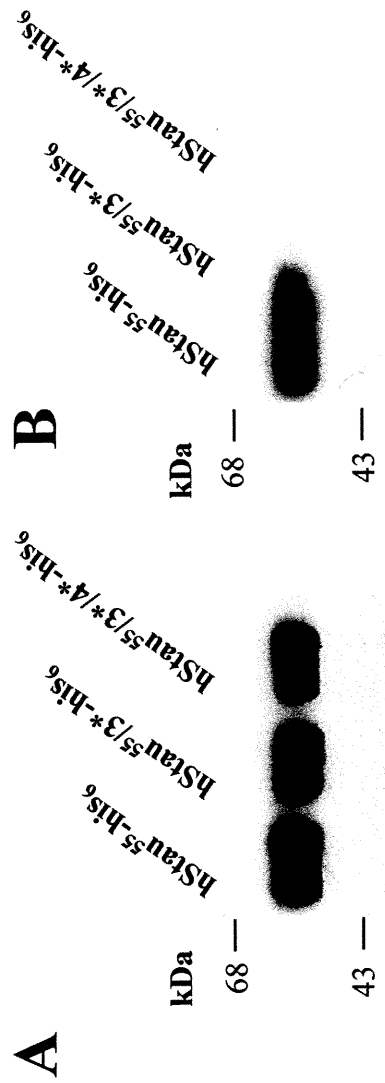
Bottom

**Figure 3. Schematic representation of hStau mutants.**

Left side: schematic representation of Staufen mutants. The color code is the same as in the legend of Fig. 1. A: mutations F135A or F238A. Right side: summary of results obtained by IF and cell fractionation (gradients). **IF:** +, full association with subcellular organelles/structures in the absence or presence of Triton X-100; -, random cytosolic/nuclear distribution before Triton treatment and complete protein removal after Triton treatment; +/-, random cytosolic/nuclear distribution before Triton treatment but significant association with subcellular organelles/structures after Triton treatment. **Gradients:** +, cofractionation of Staufen with ribosomes; +/-, cofractionation with ribosomes and with soluble proteins; -, lack of cofractionation with ribosomes.

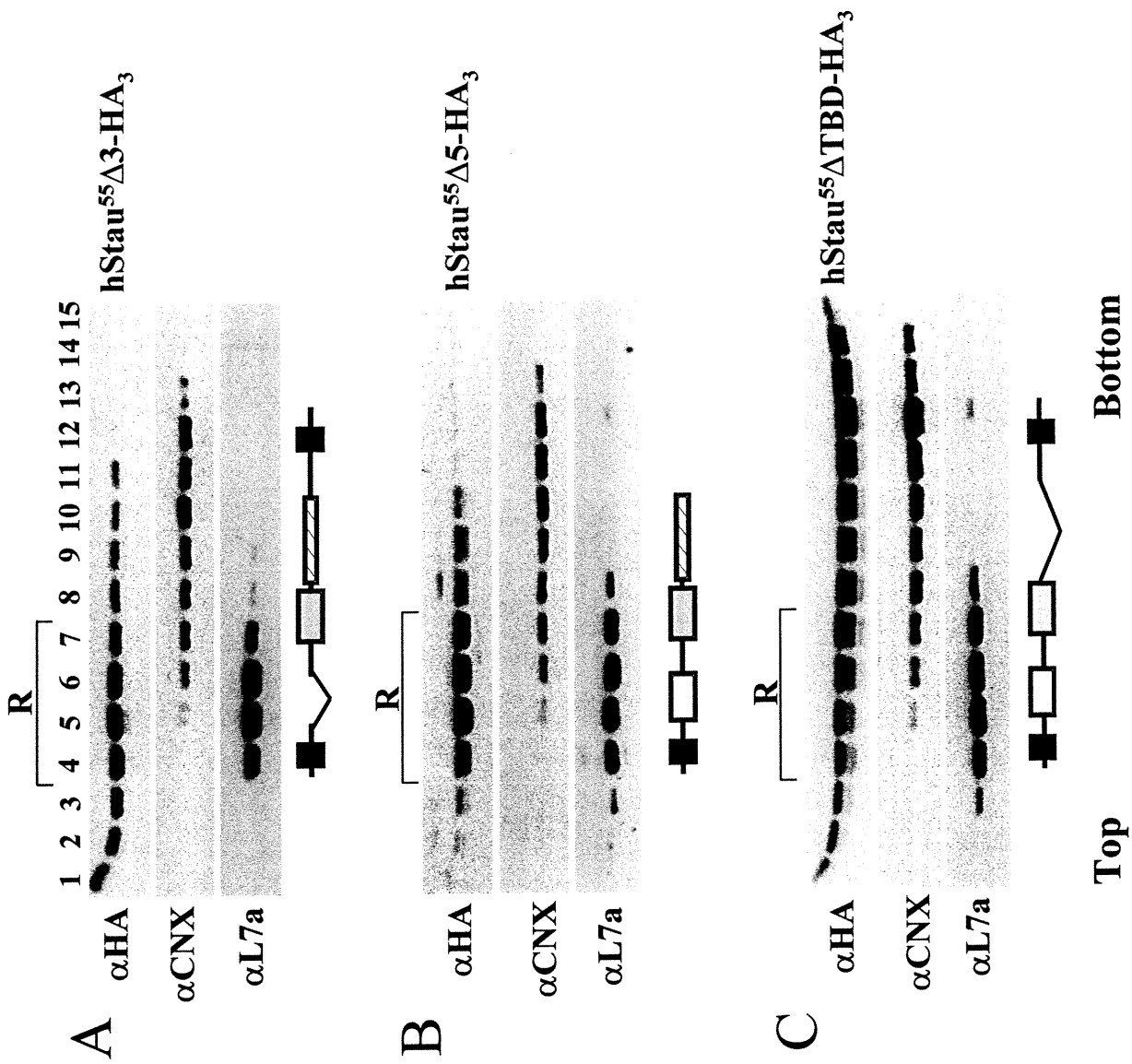
	RBD2 RBD3 RBD4 TBD RBD5	IF	Gradients
hStau <sup>55</sup>		+	+
hStau <sup>55/3*/4*</sup>		+/-	+/-
hStau <sup>55/3*</sup>		+/-	+/-
hStau <sup>55/4*</sup>		+	+
hStau <sup>55Δ5</sup>		+	+
hStau <sup>55Δ3</sup>		+/-	+/-
hStau <sup>55ΔTBD</sup>		+	-
hStau <sup>55Δ4</sup>		+	+
hStau <sup>55/3*/Δ4</sup>		-	-
RBD4		-	-
TBD		-	-
RBD4/TBD		+/-	+/-
RBD4*/TBD		+/-	+/-
TBD/5		-	-

**Figure 4. hStau<sup>55</sup> RNA-binding activity is involved in ribosome association.** cDNAs coding for either hStau<sup>55</sup>-his<sub>6</sub>, hStau<sup>55</sup>/3\*-his<sub>6</sub> or hStau<sup>55</sup>/3\*/4\*-his<sub>6</sub> were transfected in HEK293 cells and the his-tagged proteins were purified on Ni-NTA columns. **A)** Western blot experiment with anti-hStau antibodies. **B)** RNA-binding assay. The fusion proteins were electrophoresed on a 10% polyacrylamide gel, transferred to nitrocellulose, and incubated with <sup>32</sup>P-labeled bicoid 3'UTR RNA as described previously (Wickham *et al.*, 1999). After extensive washing, RNA binding was detected by autoradiography. **C)** COS7 were transfected with hStau<sup>55</sup>/3\*/4\*-HA<sub>3</sub> and fractionated on the sucrose gradient. Each fraction was collected and the proteins separated by SDS-PAGE and analyzed as described in Fig. 1.



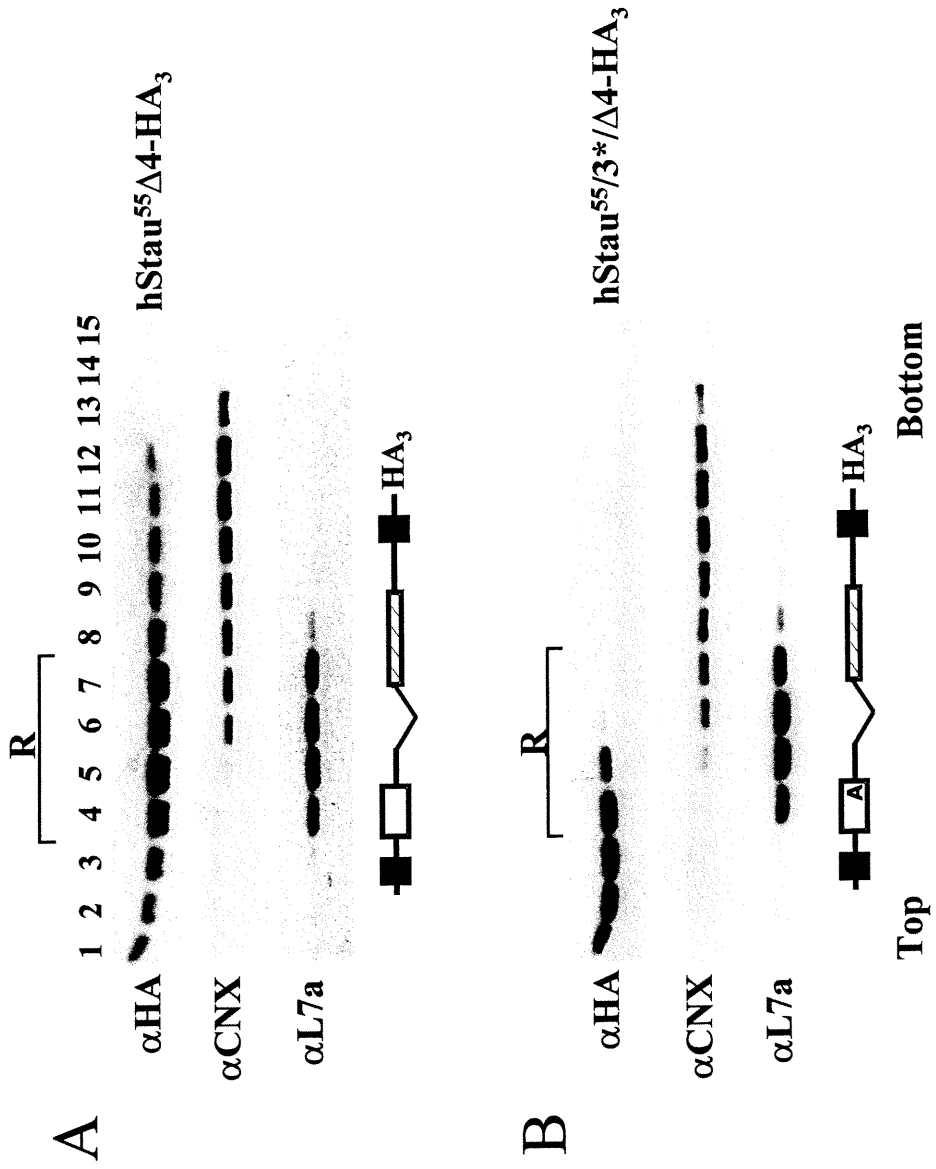
**Figure 5. Critical role of TBD in ribosome association.**

COS7 cells were transfected with cDNAs coding for (A) hStau<sup>55</sup>Δ3-HA<sub>3</sub>, (B) hStau<sup>55</sup>Δ5-HA<sub>3</sub>, or (C) hStau<sup>55</sup>ΔTBD-HA<sub>3</sub> and fractionated on the sucrose gradient. Each fraction was collected and the proteins separated by SDS-PAGE and analyzed as described in Fig. 1.





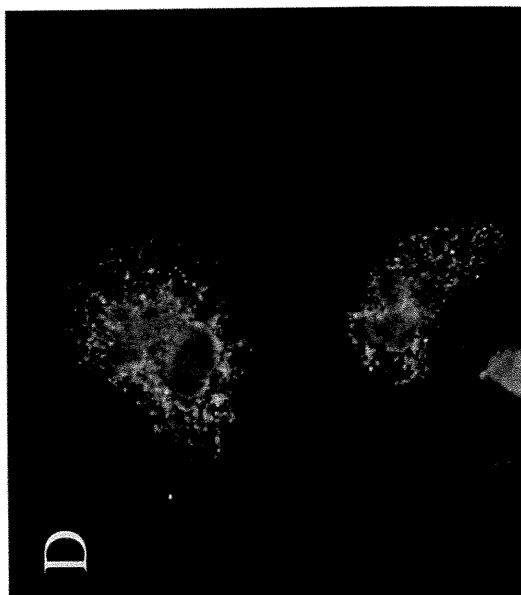
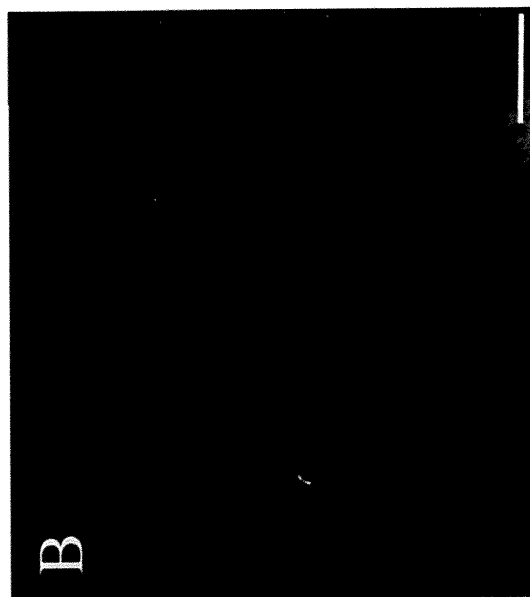
**Figure 6. Critical role of dsRBD4 in ribosome association.** COS7 cells were transfected with cDNAs coding for (A) hStau<sup>55</sup>Δ4-HA<sub>3</sub> or (B) hStau<sup>55</sup>/3\*/Δ4-HA<sub>3</sub> and fractionated on the sucrose gradient. Each fraction was collected and the proteins separated by SDS-PAGE and analyzed as described in Fig. 1.



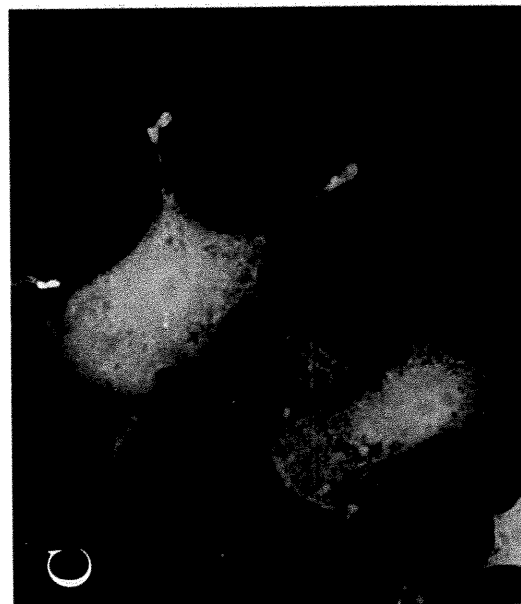
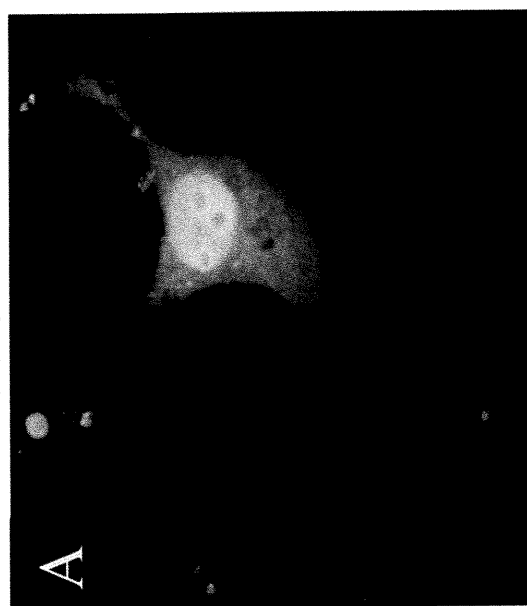
**Figure 7. RBD4/TBD is necessary and sufficient for ribosome association.**

COS7 cells were transfected with cDNAs coding for (A, B) RBD4-GFP or (C, D) RBD4/TBD-GFP. Untreated (A, C) or Triton X-100 treated (B, D) cells were fixed and visualized by fluorescence with the anti-HA antibodies. Scale bar = 20  $\mu$ m.

Triton +

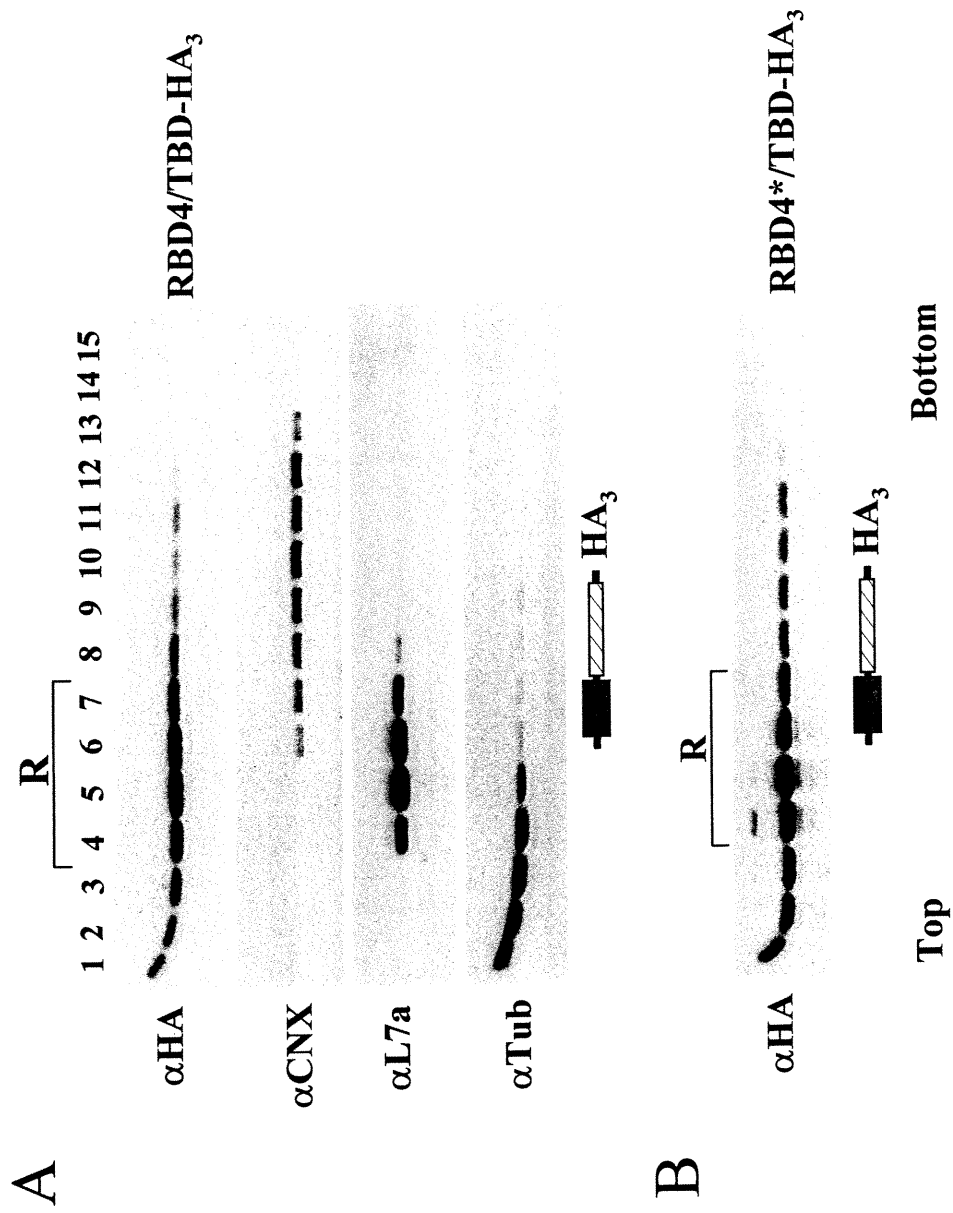


Triton -



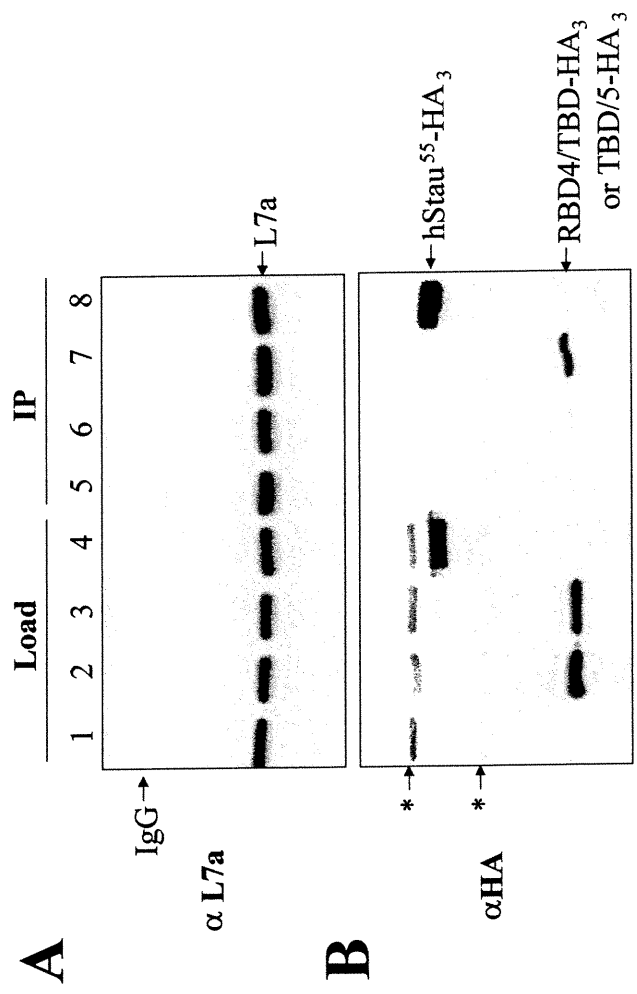
**Figure 8. RBD4/TBD is the minimal RNA-independent ribosome-association domain.**

COS7 cells were transfected with cDNAs coding for **(A)** RBD4/TBD-HA<sub>3</sub> or **(B)** RBD4\*/TBD-HA<sub>3</sub> and fractionated on the sucrose gradient. Each fraction was collected and the proteins separated by SDS-PAGE and analyzed as described in Fig. 1.



**Figure 9. hStau<sup>55</sup>-HA<sub>3</sub> and RBD4/TBD-HA<sub>3</sub> co-immunoprecipitate with ribosomes.**

Cellular extracts from untransfected (lanes 1, 5) and cells transfected with cDNAs coding for RBD5/TBD-HA<sub>3</sub> (lanes 2, 6), RBD4/TBD-HA<sub>3</sub> (lanes 3, 7) or hStau<sup>55</sup>-HA<sub>3</sub> (lanes 4, 8) were immunoprecipitated with a human anti-ribosome autoimmune serum. Total extracts (lanes 1 to 4) and immunoprecipitates (lanes 5 to 8) were loaded on a 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using anti-L7a A) ribosomal protein and B) anti-HA antibodies. The asterisks denote non-specific bands detected by the anti-HA antibody.





## **DISCUSSION**

Les travaux présentés dans cette thèse ont soulevé de nouveaux thèmes et de nouvelles avenues de recherche pour élucider les fonctions des homologues de *Staufen*. Ils ont aussi permis de développer de nouveaux outils pour pousser plus loin cet objectif général. Dans cette section, je mettrai en perspective les principales découvertes relatives aux protéines *Stau1* et *Stau2* et discuterai de leur signification pour notre connaissance de leurs fonctions. J'examinerai ensuite plus en détails les arguments supportant une implication des protéines *Stau* dans le transport d'ARN dans le neurone et je dégagerai une suite de prédictions qui devront être examinées pour appuyer davantage cette fonction. Finalement, j'élaborerai des stratégies et des esquisses d'expériences qui devraient permettre de répondre aux questions les plus pertinentes et de tester les prédictions émises.

#### *Clonage des homologues de *Staufen* et conservation de la structure*

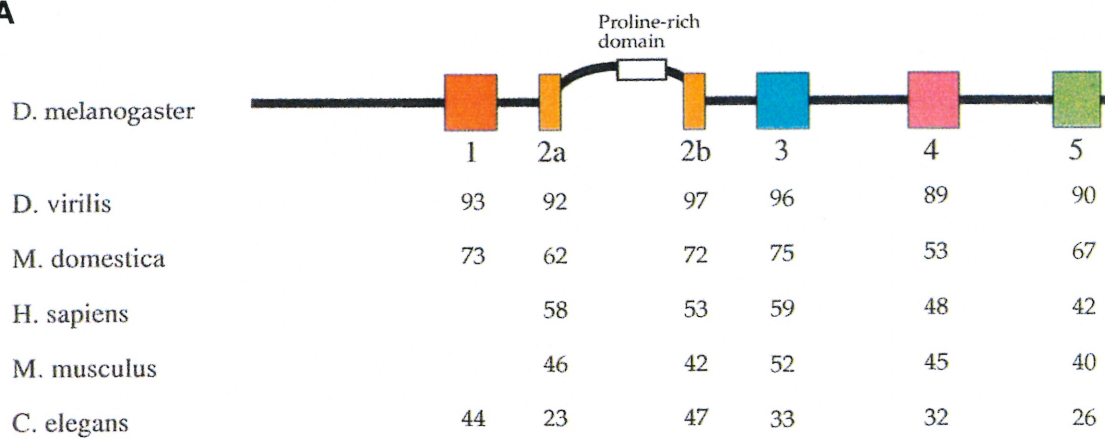
Nos travaux ont premièrement mené au clonage moléculaire de deux homologues mammifères de *stau1*. Une première observation qui, en soit, est très suggestive de la fonction de ces paralogues, est la conservation de leur structure primaire, particulièrement les dsRBD. Après la publication de nos travaux sur *Stau1*, une comparaison phylogénique fut publiée par Micklem et al. (2000), révélant la similitude des domaines des protéines *Staufen* chez plusieurs espèces (Figure 1). Leur analyse établit que les dsRBD de *Staufen* n'ont pas conservé que les propriétés structurales générales des dsRBD : chacun conserve une plus grande similitude avec le dsRBD équivalent chez les autres homologues. Par exemple, la grande boucle dans le dsRBD2, qui est impliquée dans le transport d'*oskar* le long des microtubules dans l'*ovocyte* de la drosophile, n'est présente que dans le domaine équivalent chez

**Figure 1 : Comparaison d'homologues de Staufen de différentes espèces.**

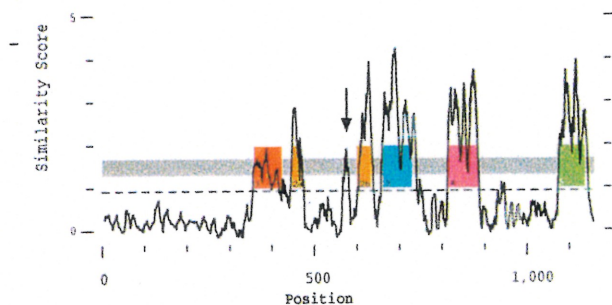
En (A) est présenté un diagramme comparant les pourcentages d'identité de séquence des dsRBD équivalents. B) Diagramme de comparaison des régions conservant un haut degré d'identité de séquence (PlotSimilarity obtenu à partir d'un alignement ClustalW) entre les six homologues de Staufen étudiés. Les régions qui correspondent aux dsRBD sont indiquées avec le même code de couleur qu'en A). La flèche indique la seule autre région conservée à l'extérieur des dsRBD, une région riche en prolines dont l'alignement des différents homologues est présenté en C). D) Arbre dérivé d'un alignement ClustalW des dsRBD d'un groupe de protéines de cette famille, incluant les homologues Staufen de six espèces. L'arbre illustre le fait que les dsRBD équivalents des homologues de Staufen conservent davantage de similitudes qu'avec les autres dsRBD. Seule exception notable, est le dsRBD5 de Stau chez *C. elegans* (CeStau).

Figure tirée de Micklem et al. (2000).

**A**



**B**



**C**

```

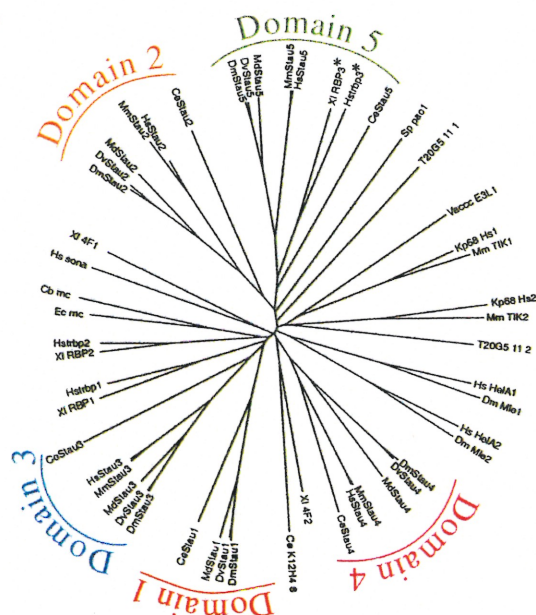
GQRPFPPKFPDSRFALPPPL D.mel
HQRPFAPKYQDSRYALAPAL D.vir
RGGHYDPACYPVLPPHMAA M.dom
RGGAYPPRYFYDFPVPLL Mouse
RGGAYPPRYFYDFPVPP Human
SMALYAPPFPDTLPIDPARP C.ele

```

YPP<sup>D</sup>ky<sup>D</sup><sub>r</sub> F<sup>D</sup>l<sup>D</sup>PP 1  
 r<sub>f</sub> av

Consensus

**D**



*D. virilis*, *M. domesticus*, *C. elegans*, de même que Stau1 et Stau2 chez les mammifères. Cette comparaison leur permit de remarquer que seuls les dsRBD et un motif riche en prolines dans la boucle du dsRBD2 étaient conservés entre les homologues. À partir de ces observations, ils émirent l'hypothèse que seules ces portions devraient constituer les déterminants fonctionnels des protéines Staufen.

Or, une faille existe dans leur analyse. En dépit de la forte similitude de ce domaine chez toutes les autres espèces étudiées, le dsRBD1 est absent de la protéine Stau1 chez l'homme et la souris. Je tenterai donc ici de proposer une explication simple pour cette divergence, autre que l'absence de fonction de ce domaine.

La comparaison réalisée par Micklem ne tenait pas compte de Stau2. Bien qu'à ce moment les séquençages des génomes de la drosophile et de *C. elegans* eurent été complétés, ou étaient très près de l'être, les séquences publiées ne révélèrent (et ne révèlent toujours pas) la présence d'un autre gène *staufen* chez ces espèces. Je crois donc que la clef pour la solution du problème que je soulève réside dans la duplication récente du gène *staufen* chez les mammifères. Les comparaisons de séquence et de structure ne tenant pas compte de Stau2, les particularités structurales propres à chaque paralogue mammifère ne furent pas considérées. Ces divergences de même que les plages d'expression superposées, mais distinctes, des protéines Stau1 et Stau2 suggèrent que la duplication de *staufen* chez les mammifères permit une spécialisation et une adaptation de chacun des paralogues à une niche cellulaire et biochimique distincte. Plus précisément, l'absence du dsRBD1 chez Stau1 et la divergence de la structure du dsRBD5 chez Stau2 suggèrent que chaque paralogue

n'a conservé qu'une partie des déterminants et conséquemment des fonctions propres à un ancêtre commun unique.

#### *Association avec l'ARNdb*

Notre étude fonctionnelle de l'activité de liaison de l'ARN par les protéines Stau1 et Stau2 fut très révélatrice des propriétés de ces protéines. En premier lieu, une cartographie démontra que leurs dsRBD n'ont pas tous la capacité de s'associer à l'ARN. Dans le cas des deux protéines et comme pour DmStau, le dsRBD3 est le déterminant majeur pour cette interaction. De nombreuses observations suggèrent qu'il s'agit du seul déterminant dont l'activité de liaison à l'ARN est significatif biologiquement. Premièrement, une mutation ponctuelle du dsRBD3 est suffisante pour reproduire les phénotypes de perte de fonction chez DmStau. Deuxièmement, des observations suggèrent que seule l'activité de liaison à l'ARNdb du dsRBD3 est strictement maintenue au cours de l'évolution. En accord avec ceci, bien que le dsRBD1 de DmStau lie l'ARNdb *in vitro*, ce domaine est absent de Stau1 et ne lie pas l'ARNdb chez Stau2 et bien que le dsRBD4 lie l'ARNdb chez DmStau et Stau1 chez la souris, cette activité est à peine détectable pour Stau1 chez l'humain.

Deux autres caractéristiques observées poussent encore plus loin la problématique de la spécificité de liaison à l'ARN par Stau1 et Stau2. Ces protéines montrent une très grande affinité pour l'ARNdb ( $K_d$  de l'ordre du nanomolaire) et la spécificité de ces protéines est limitée à la structure de l'ARNdb, indépendamment de sa séquence. Or, des portions bicaténaires d'ARN sont très souvent retrouvées dans la cellule, que ce soit dans des portions régulatrices d'ARNm, dans des ARN structuraux, ou d'autres ARN qui remplissent d'autres fonctions.

Ces observations soulèvent deux questions : les homologues de Staufen chez les mammifères ont-ils une spécificité pour des transcrits particuliers *in vivo*? Et, si oui, comment la liaison de l'ARN par Staufen est-elle limitée à certains transcrits? À l'image des protéines Nanos et Pumilio (Sonoda et Wharton, 1999), il est possible que l'interaction simultanée de plusieurs protéines avec un signal d'ARN soit nécessaire pour recruter celui-ci en complexe RNP. Il sera donc intéressant et nécessaire de tenter d'identifier d'autres protéines pouvant interagir avec l'ARN et qui partageraient une implication dans la reconnaissance de transcrits avec Staufen. Il est possible que la spécificité de reconnaissance de l'ARN par les protéines Staufen ne soit dévoilée qu'après l'identification de ces facteurs supplémentaires.

Une autre possibilité est que l'activité de liaison à l'ARNdb de Stau soit restreinte par une exclusion physique, par exemple, par une séquestration de la protéine dès sa traduction. L'activité pourrait n'être libérée qu'au moment et à l'endroit où cette fonction est requise et le ligand est retrouvé.

#### *Dimérisation/multimérisation*

Plusieurs observations réalisées au cours de nos travaux suggèrent que Staufen est présent sous forme multimérique *in vivo*. Par exemple, la courbe de liaison à l'ARNdb présentant une allure sigmoïde (Article 1), une coopérativité semble en œuvre pendant la liaison. Cette observation peut suggérer que des molécules distinctes interagissent au moment de la reconnaissance du transcrit, mais peut aussi être interprétée comme une coopération intramoléculaire. Or, nous avons aussi pu démontrer la multimérisation de Stau1 par des essais de co-immunoprécipitation (Article 2) et d'affinité *in vitro* (Annexe). Des résultats

préliminaires prenant avantage du transfert d'énergie de résonance par bioluminescence (BRET) démontrent aussi la proximité des monomères de Staufen *in vivo* (C. Martel, données non-publiées).

Aussi, plusieurs criblages par la méthode des deux hybrides supportent cette interaction. Staufen fut repêchée par elle-même au cours d'un tel criblage chez la drosophile et il semble que cette interaction soit médiée par le dsRBD5 (D. St-Johnston, données non-publiées). Des criblages entrepris dans notre laboratoire ont aussi permis de repêcher Stau2, mais dans ce cas, un fragment encodant la portion C-terminale de la protéine (dsRBD4 au codon d'arrêt) fut repêchée avec un appât constitué des dsRBD1 et 2. Il semble donc que cette interaction soit médiée par des déterminants différents chez les différentes espèces, ou qu'elle puisse être réalisée par de multiples déterminants. Considérées ensemble, ces observations supportent la conclusion que la dimérisation/multimérisation est une propriété partagée par les différents homologues de Staufen.

Pour le moment, la fonction biologique de la multimérisation de Staufen n'est pas connue. Une fonction pour une telle interaction, qui fut évoquée dans l'introduction, serait de permettre un certain niveau d'échaffaudage dans le cadre d'un complexe de transport. Une autre possibilité est la modulation des propriétés du complexe par l'association de protomères modulateurs, comme nous le proposons pour l'isoforme Stau1<sup>i</sup>. Finalement, il est aussi possible que l'interaction observée révèle plutôt, ou en même temps, des interactions qui normalement se produisent de façon intramoléculaires. Par exemple, une interaction intramoléculaire pourrait masquer des déterminants d'interaction protéine-protéine ou protéine-ARN.



Pour le moment, on connaît peu de choses sur la possibilité d'hétérodimérisation entre les protéines Stau1 et Stau2. Une expérience préliminaire a permis de co-immunoprécipiter ces protéines en transfection transitoire, mais cette interaction est perdue par un traitement à la Rnase. La signification biologique de ces résultats n'est pour le moment pas connue. Plusieurs autres résultats jettent un bémol sur cette série d'observations : aucune tentative de co-immunoprécipiter les formes endogènes de Stau1 et Stau2 n'a été couronnée de succès et ces deux protéines montrent des distributions distinctes par immunofluorescence dans le neurone.

#### *Interaction avec les ribosomes*

Nous avons démontré l'interaction des protéines Stau1 et Stau2 avec les ribosomes. La sensibilité similaire des deux protéines aux différents traitements (Article 3, Annexe et données non-publiées), leur profil de sédimentation en gradient de sucrose, avec ou sans traitement à l'EDTA et l'observation qu'elles co-sédimentent et co-immunoprécipitent avec les deux sous-unités ribosomiques supportent l'idée que ces deux protéines partagent les mêmes types d'interactions avec les ribosomes.

Les travaux présentés dans l'article 4 ont démontré que deux déterminants de Stau1 étaient suffisants pour une association aux ribosomes. Un premier déterminant, que nous désignons comme majeur, est la capacité du dsRBD3 de lier l'ARNdb. À priori, un observateur averti serait tenté de croire que cette interaction est due à une association indirecte, par un transcrit au moment de la traduction par exemple. Cependant plusieurs observations plaident en défaveur d'une telle possibilité. Premièrement, après un traitement à 25 mM EDTA, conditions dans lesquelles les

polyribosomes et les sous-unités ribosomiques sont dissociés, l'interaction des protéines Stau avec les deux sous-unités demeure stable (Article 3 et 4). Deuxièmement, un traitement à une forte concentration de ribonucléase n'affecte que très peu la co-sédimentation avec les ribosomes dans un essai S100-P100. Troisièmement, un traitement avec des inhibiteurs de la traduction comme la pactamycine ou la puromycine, qui interfèrent avec le recrutement des sous-unités ribosomiques sur les messagers ou les en décrochent, n'affecte à peu près pas l'association des protéines Stau avec les ribosomes (Annexe). Il semble donc, à cette lumière, que l'interaction des protéines Stau1 et Stau2 avec les ribosomes soit médiée directement par une association avec l'ARN ribosomique, ou en interagissant avec une protéine qui serait solidement ancrée sur le ribosome.

Un deuxième déterminant de Stau1 a aussi été mis en évidence par les travaux présentés dans l'article 4. Complètement indépendant de la capacité de la protéine à lier l'ARN, ce déterminant a été localisé dans les dsRBD4-TBD de la protéine. Le déterminant ribosomique médiant cette interaction n'est, pour le moment, pas connu. Une possibilité à envisager est un recrutement de la protéine transfectée à un nombre saturable de récepteurs, par exemple la dimérisation avec Stau endogène.

Quelle est la fonction biologique de cette interaction? La nature même de celle-ci, de même que l'implication de DmStau dans la dé-répression du transcrite d'*oskar*, suggèrent une implication des protéines Stau1 et Stau2 dans le contrôle traductionnel. Il est tentant de spéculer que cette interaction puisse, comme chez la drosophile, dé-réprimer la traduction de certains transcrits (Gunkel et al., 1998). Or, bien que Stau1 et Stau2 semblent interagir d'une façon similaire avec les deux sous-

unités ribosomiques, le dsRBD5 qui est nécessaire pour la dérépression du transcrit d'*oskar* chez DmStau n'est pas conservé chez Stau2. Mis à part la possibilité que le domaine soit réorganisé, mais que les déterminants impliqués dans la dé-répression traductionnelle y soient toujours présents, il semble que l'interaction avec les ribosomes, du moins pour Stau2, puisse refléter une autre fonction.

À ce point-ci, nous devons envisager un large spectre de possibilités pour la fonction de cette interaction. Les protéines Stau pourraient être impliquées dans une étape de répression ou d'activation traductionnelle, liée ou indépendante d'une fonction dans le transport d'ARN. Une série d'expériences réalisées dans le laboratoire par George Elvira sont davantage en accord avec une fonction dans l'activation ou la dérépression traductionnelle. Lorsqu'un transcrit-rapporteur incluant l'élément TAR du HIV (une structure bicaténaire à laquelle Stau peut se lier *in vitro*) est incubé dans des extraits de réticulocytes en présence d'un fragment recombinant de Stau1, l'activité traductionnelle du rapporteur est significativement augmentée. Cependant, étant donné le peu de spécificité de liaison observé *in vitro*, il serait important de connaître la nature des transcrits qui sont reconnus par les protéines Stau *in vivo* pour connaître la pertinence biologique de ces observations.

Une autre fonction possible pour cette interaction est suggérée par les travaux de Kosik et al. Ceux-ci ont décrit la présence, dans les dendrites neuronales, de gros granules présumément transportés qui contiennent de nombreuses sous-unités ribosomiques (Knowles et al., 1996). Selon leur hypothèse, ces « agrégats » de ribosomes seraient transportés jusqu'aux sites de traduction locale dans les synapses. Récemment, cette équipe a tenté de purifier de tels agrégats et y a immuno-déecté

Stau1 en microscopie électronique (Kosik, K.S., données non-publiées). Ces observations, de même que les caractéristiques de Stau1 et Stau2 dans le neurone présentées plus bas, suggèrent que les protéines pourraient jouer un rôle dans l'une ou l'autre des étapes d'emballage ou de transport de tels agrégats.

#### *Association avec le RER*

Nous avons démontré que Stau1 est retrouvée en association avec le RER. À ce moment, nous croyons que les divers isoformes de Stau1 médient cette association via des déterminants distincts. Bien que l'isoforme de Stau1 le mieux caractérisé à présent, Stau1<sup>55</sup>, co-localise très bien avec les marqueurs du RER par microscopie confocale, sur un gradient de sucrose cet isoforme sédimente avec les ribosomes avec lesquels il interagit. Nous proposons donc que l'association de cet isoforme avec le RER est médiée par les interactions faibles des ribosomes avec leur récepteur membranaire. Par contre, un autre isoforme appelé Stau1<sup>65</sup> semble interagir plus directement avec le RER. Stau1<sup>65</sup> cosédimente avec le RER dans un gradient de sucrose et cette interaction est insensible à un traitement à 25 mM EDTA. Néanmoins, lorsqu'un détergent non ionique est utilisé pour solubiliser les membranes du RER, Stau1<sup>65</sup> adopte le même profil de sédimentation que Stau1<sup>55</sup>, c'est-à-dire une co-sédimentation avec les ribosomes. Ces observations suggèrent que l'isoforme Stau1<sup>65</sup> interagit directement avec un facteur sur le RER et que cette interaction n'est pas dépendante d'une association préalable avec les ribosomes (article 4 et données non-publiées). Il serait intéressant de connaître les déterminants de Stau1<sup>65</sup> qui médient l'interaction avec le RER. Cependant, une cartographie de tels déterminants est, pour le moment, inaccessible puisque le cDNA codant pour

l'isoforme Stau1<sup>65</sup> n'a pas encore été cloné. Nous croyons qu'une séquence en amont du codon d'initiation de Stau1<sup>55</sup> code pour les déterminants spécifiques à cet isoforme. Or, toutes les tentatives de 5' RACE et les criblages de bibliothèques de cDNA (dont la construction exploite aussi la Réverse Transcriptase) ont échoué sur une portion de séquence extrêmement riche en G/C.

Un autre aspect de la relation de Stau1 avec le RER provient des travaux réalisés sur l'isoforme Stau1<sup>i</sup>. Dans l'article 2, nous avons montré qu'un déséquilibre dans le rapport entre les isoformes de Stau1 pouvait entraîner des conséquences drastiques, entre autres sur la structure du RER. En formant un complexe avec les autres isoformes de Stau1, Stau1<sup>i</sup> affecte la capacité du complexe à s'associer avec l'ARN. Il est clair qu'il ne s'agit pas d'une conséquence relative à une fonction nouvellement créée par la structure distincte du dsRBD3 de Stau1<sup>i</sup>. Ceci est appuyé par le fait que la transfection d'une construction qui présente une mutation ponctuelle dans le domaine dsRBD3, mutation qui affecte spécifiquement sa capacité à lier l'ARNdb, engendre aussi le réarrangement du RER observé avec Stau1<sup>i</sup>.

Ces résultats soulèvent une autre énigme. Il est difficile, au premier abord, de trouver une explication pour le fait que la perte de l'activité de liaison à l'ARNdb du complexe de Stau1/Stau1<sup>i</sup> corrèle avec des conséquences structurales sur une organelle comme le RER. Quelle est donc la relation entre la liaison à l'ARN du complexe Stau et l'intégrité du RER?

Je propose l'explication suivante. Le RER est une structure dynamique, en constant réarrangement. L'apparente stabilité de sa structure résulte d'un équilibre entre la fusion de membranes qui proviennent d'une variété de compartiments d'une part, et

de la dissociation de membranes qui évoluent vers divers autres compartiments (ex. Golgi) d'autre part. Il fut démontré que le transport membranaire est dépendant de protéines motrices, telles les dynéines et kinésines (Lane et Allan, 1999; McIlvain, Jr. et al., 1993). Il est connu qu'interférer avec la fonction de ces protéines entraîne des conséquences structurales importantes pour le RER, qui sont fort probablement le résultat d'un collapsus des membranes. Une solution envisageable pour expliquer le phénotype engendré lors du déséquilibre d'isoformes de Stau1 est que le transport d'ARN soit couplé au transport vésiculaire par l'exploitation de ces moteurs. Le recrutement et le transport des particules de Staufen chez la drosophile est dépendant de la liaison à l'ARN. La présence d'un excès d'isoforme Stau1<sup>i</sup> dans le complexe pourrait interférer avec l'association à l'ARN et avec la formation d'un complexe efficacement transporté en le bloquant à une étape intermédiaire d'assemblage. Cet intermédiaire pourrait ainsi « titrer » une partie de l'outillage moléculaire aussi nécessaire au mécanisme de transport de vésicules.

Le modèle d'un couplage entre le transport d'ARN et des vésicules est aussi supporté par l'association de Stau1 dans les portions distales des dendrites avec les marqueurs du RER (Kiebler et al., 1999). De plus, au moins un autre système de transport d'ARN, le transcrite de *Vgl* chez le Xénope, implique une portion du RER (Deshler et al., 1997).

#### *Caractérisation des protéines Stau dans les neurones*

Étant donné l'intérêt pour le transport de l'ARN dans le système nerveux, nous avons entrepris une caractérisation des propriétés cellulaires et biochimiques des protéines Stau dans le neurone. Ces travaux s'inscrivent dans la foulée d'un effort

concerté, réalisé en collaboration avec l'équipe de M. Kiebler, qui vise à élucider la ou les fonctions des protéines Stau dans ce système cellulaire. Les observations qui ont été réalisées au cours de ces travaux convergent en plusieurs points, et elles forment ensemble le cœur du modèle actuel pour la fonction des protéines Stau1 et Stau2. Je résumerai donc ici les observations que nous avons réalisées dans le contexte neuronal.

À ce jour, nos travaux sur Stau1 ont démontré que : 1- Stau1 est retrouvé en association avec des particules de grande taille dans le soma et les dendrites neuronaux, 2- ces particules colocalisent avec des marqueurs du RER; 3- une fraction des granules de Stau1 dans les dendrites est positive au marquage au SYTO14, un colorant marquant l'ARN et 4- ces granules se retrouvent à proximité des microtubules dendritiques (Kiebler et al., 1999). D'autre part, une approche de Vidéomicroscopie à saut temporel (Time-lapse videomicroscopy) avec une fusion GFP de Stau1 en transfection transitoire a révélé que les particules observées étaient en mouvement (Vitesse moyenne de 6,4  $\mu\text{m}$  par minute) le long des prolongements dendritiques. En accord avec la proximité des granules avec le cytosquelette, un traitement avec des drogues qui déstabilisent les microtubules interfère avec le mouvement des granules de Stau1, mais aussi avec leur assemblage (Kohrmann et al., 1999).

Dirigés par le patron d'expression de *stau2*, qui suggère que ses isoformes jouent un rôle particulier dans le système nerveux, nous avons amorcé une caractérisation des propriétés de Stau2 en culture primaire de neurones. Nous avons décrit, dans l'article 3, sa distribution par des expériences de biochimie classique et par

immunofluorescence. Les isoformes de Stau2 sédimentent comme des complexes de haute densité et cette sédimentation est indépendante des microtubules et des vésicules.

Une caractéristique majeure des particules telles qu'observées par des techniques de biochimie, est la diversité de leurs propriétés. Un premier niveau de diversité est évident lorsqu'on compare les propriétés des isoformes de Stau2 : alors que l'isoforme Stau2<sup>62</sup> est principalement retrouvé dans les toutes premières fractions d'un gradient de sucrose, Stau2<sup>52</sup> et Stau2<sup>59</sup> cofractionnent, et comme nous l'avons vu, interagissent, avec les ribosomes.

Un deuxième niveau de diversité est représenté par le patron de sédimentation obtenu pour Stau2<sup>52</sup> et Stau2<sup>59</sup>. Les isoformes Stau2<sup>52</sup> et Stau2<sup>59</sup> sédimentent en populations de complexes de densités diverses dans un gradient de sucrose. Une première série de fractions, dans lesquelles Stau<sup>52</sup> et Stau2<sup>59</sup> sont détectées, correspond aux monosomes et aux polysomes, ce qui fut décrit dans l'article 3. Cependant, nous observons un second pool de Stau2 dans les fractions plus denses des gradients de sucrose. Il est aussi intéressant de mentionner que les marqueurs des ribosomes sont aussi détectés dans de telles fractions. Comme nous le proposerons plus bas, il est possible que de tels complexes correspondent aux « agrégats » de ribosomes qui furent décrits par Kosik et al.

En accord avec la caractérisation biochimique de Stau2, nous observons en immunofluorescence une distribution particulière. Au moins deux types de marquages peuvent ainsi être observés. Un marquage typique de la structure du RER



est observé dans le soma, tandis que dans les dendrites des particules de Stau2 sont alignées le long des faisceaux de microtubules.

Le patron de distribution de la protéine Stau2 dans les dendrites ressemble, à priori, au marquage qui y fut observé pour Stau1. Bien que des anticorps compatibles pour un double marquage ne soient pour le moment pas disponibles, un examen minutieux des marquages de Stau1 et Stau2 dans les dendrites neuronaux révèle quelques différences. En comparaison avec Stau1, Stau2 semble distribuée dans une portion plus distale des dendrites. De plus, des résultats préliminaires avec une saignée de souris qui détecte Stau2 indiquent aussi que les deux protéines n'y co-localisent pas, ou très peu. En accord avec ces observations, les deux protéines ne co-immunoprécipitent pas à partir d'extraits cytoplasmiques de neurones. Ensemble, nos observations indiquent que les deux protéines font partie de complexes distincts. Cependant, ces travaux devront être poursuivis et les conclusions qui en sont déductibles devront être validées par des expériences supplémentaires.

Le marquage de Stau2 dans les dendrites et l'association de Stau2<sup>59</sup> et Stau2<sup>52</sup> avec les ribosomes ont soulevé la possibilité que cette interaction puisse se produire dans des portions distantes de ces prolongements cellulaires. Nous avons donc comparé la distribution des ribosomes avec Stau2 par microscopie confocale. Ces travaux ont démontré que Stau2 colocalise avec les ribosomes principalement dans le soma et dans une portion proximale des dendrites (Annexe).

*Implication des protéines Stau dans le transport dendritique d'ARN : modèle et prédictions*

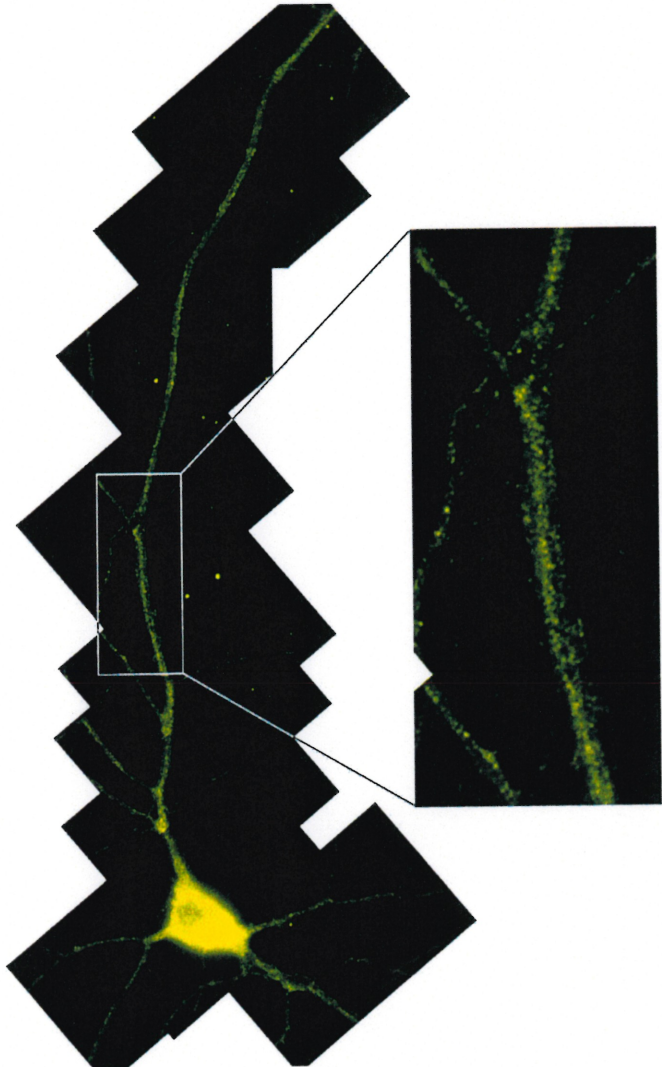
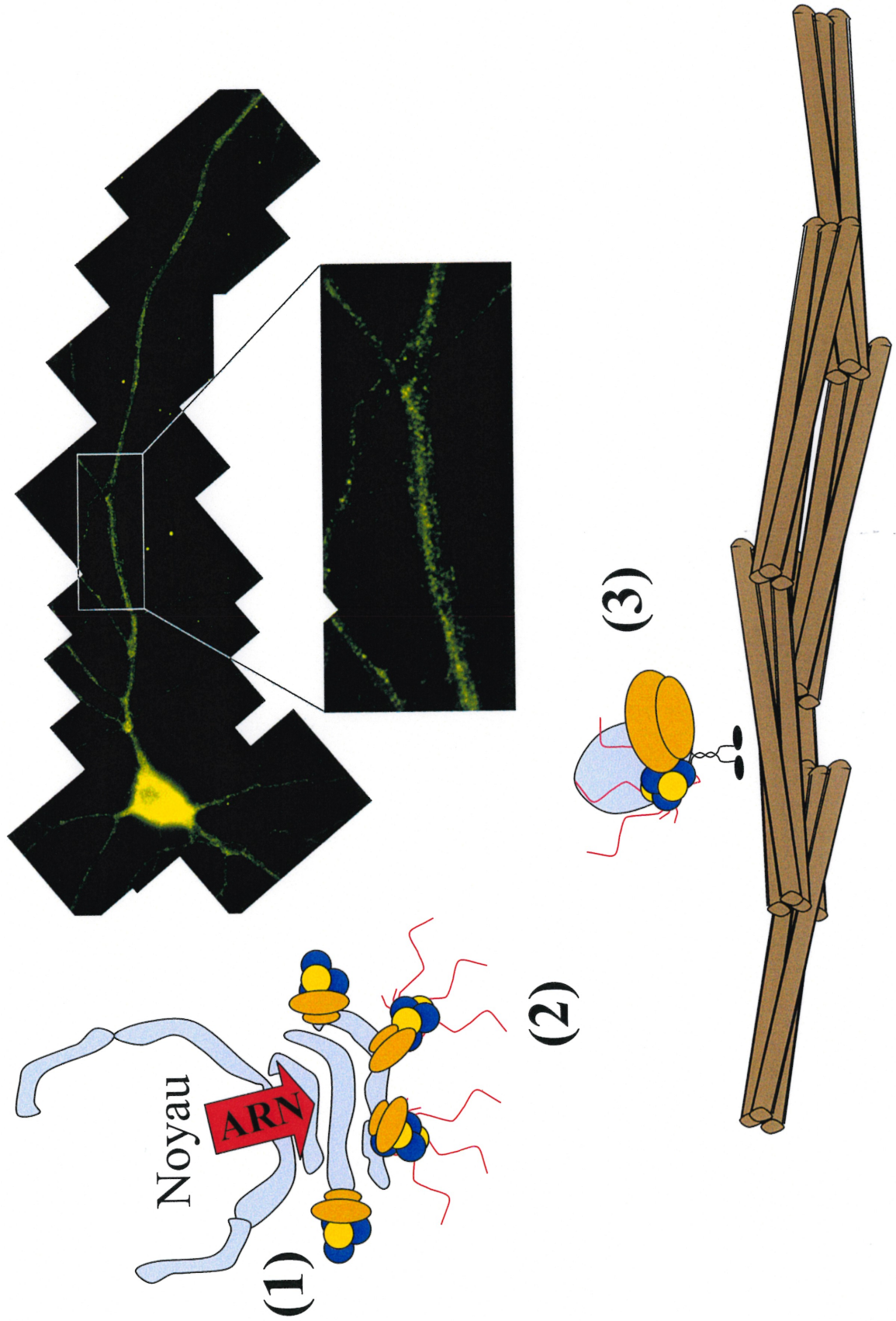
De toutes les observations faites sur les protéines Stau1 et 2, le plus important support pour une implication dans le transport de l'ARN provient des données obtenues sur leur distribution dans les dendrites neuronales. Le marquage particulière des protéines Stau dans les portions distales des dendrites, en association avec les microtubules, de même que l'observation des particules de Stau1-GFP en mouvement supportent un modèle selon lequel ces protéines seraient recrutées en complexes et ensuite transportées sur les microtubules dendritiques (Figure 2). L'adoption d'un tel modèle suggère aussi une fonction supplémentaire pour les protéines observées dans le soma. Ces protéines constitueraient un « pool » de machinerie de transport en attente d'un signal, possiblement l'ARN. En considérant cette possibilité, l'hétérogénéité décrite pour Stau2 est facilement explicable. Les pics de sédimentation observés pourraient correspondre à des complexes qui réalisent différentes étapes d'un seul mécanisme.

Néanmoins, il est important de mentionner que la fonction suggérée dans ce modèle n'est pas nécessairement mutuellement exclusive à une implication dans le contrôle traductionnel. Il est clairement possible que différents isoformes de Stau jouent des rôles distincts, dans l'une et/ou l'autre de ces fonctions. Il est aussi possible que, comme pour DmStau, la protéine soit impliquée dans la coordination entre le transport d'ARN et le contrôle traductionnel.

**Figure 2 : Modèle d'implication de Stau dans le transport d'ARN dans les neurones.**

(1) Un *pool* latent de Stau serait retrouvé dans le soma, en association avec les ribosomes sur le RER. Les cercles bleus et jaunes représentent des monomères d'isoformes de Stau1 ou Stau2. (2) Après exposition à un signal de localisation, un granule de transport serait assemblé. (3) Le granule de transport serait ensuite recruté et transporté le long des microtubules dendritiques. Le modèle est assorti d'une reconstitution de champs d'immunofluorescence d'un neurone marqué pour Stau2 (particules jaunes). Un champ montrant l'alignement des particules dans les dendrites est présenté à plus fort grossissement.

La reconstitution de champs a été fournie par M. Kiebler et K. Hemraj.



Ce modèle est aussi fondé sur les analogies qui se dégagent d'une comparaison avec ce qui est connu du transport du transcrit *d'oskar* au cours de l'ovogenèse chez la drosophile. Or, il serait imprudent pour le moment de conclure que Stau1 et/ou Stau2 peuvent médier le transport de transcrits dans les dendrites comme Staufen le fait pour le transcrit *d'oskar* chez la drosophile. Si un tel modèle s'avérait véridique, je propose qu'au moins trois prédictions devraient être vérifiables. Premièrement, les granules recrutés dans les dendrites devraient contenir les transcrits transportés. Deuxièmement, les déterminants impliqués dans le transport d'ARN par Staufen chez la drosophile devraient aussi être impliqués dans le mouvement et la localisation dendritique de Stau1 et/ou Stau2. Troisièmement, une démonstration que les paralogues Stau voyagent dans les dendrites comme composante fonctionnelle dans le transport d'ARN, et non comme de simples passagers ou cargo devrait être réalisable. En d'autres mots, interférer avec la fonction des protéines Stau devrait empêcher le transport de transcrits normalement reconnus par ces protéines.

#### *Approches et expériences proposées...*

Les travaux présentés dans cette thèse ont mis en relief un certain nombre de questions qui méritent d'être examinées pour pousser plus loin notre connaissance des fonctions des protéines Stau. J'énumérerai ici quatre objectifs, qui visent à répondre à ces questions. L'atteinte de ces objectifs permettra aussi de tester les prédictions fondées sur notre modèle qui implique Stau1 et Stau2 dans le transport d'ARN. En me basant sur ma connaissance des propriétés de ces protéines, j'élaborerai aussi des esquisses d'expériences pertinentes.

### Identification des ARN ligands endogènes

Un objectif central et inévitable pour la compréhension de la fonction des protéines Stau, est l'identification de ligands d'ARN reconnus *in vivo*. Il s'agit d'une étape nécessaire à la fois pour tester une implication dans le contrôle traductionnel et une fonction dans le transport d'ARN. Or, le design de stratégies fondées sur des essais *in vitro* est rendu difficile principalement par deux réalités. Premièrement, dans les expériences que nous avons menées, Stau ne montre aucune spécificité *in vitro* autre que pour la structure bicaténaire de l'ARNdb. Deuxièmement, la protéine est très difficile à obtenir sous forme soluble et lorsqu'elle l'est, nous observons une inconsistance entre les préparations pour des essais de liaison en solution. Il s'agit d'une entrave importante pour des essais comme le SELEX, par exemple.

Une autre réalité qui introduit un bémol pour la signification biologique de résultats qui seraient obtenus par des criblages dans la levure, comme les triples-hybrides. Les caractéristiques de DmStau démontrent que sa spécificité de liaison à l'ARN est intimement liée au contexte cellulaire. Ceci suggère que les propriétés fonctionnelles de la protéine ne seraient adéquatement représentées que dans son contexte biochimique endogène. La stratégie proposée ici, élaborée et utilisée à profit par S. Tenenbaum et al. (Tenenbaum et al., 2000), tient compte de ces réalités et repose plutôt sur une purification par immunoaffinité des complexes, à partir de leur « environnement » propre. Après immunoprécipitation de la protéine d'intérêt à partir d'un extrait cytoplasmique, l'ARN du complexe est extrait et une Réverse-Transcription est réalisée en présence de nucléotides marqués. L'ADNc qui en résulte

est ensuite utilisé comme sonde pour hybrider des bibliothèques sur filtres à haute densité (arrays). Enfin, les signaux résultants sont analysés pour identifier les gènes positifs dans l'hybridation. Nous avons, au cours des dernières années, généré de multiples antiserae contre une variété d'épitopes de Stau1 et Stau2, dont plusieurs fonctionnent bien en immunoprécipitation. Réaliser ces expériences en parallèle avec les différents antiserae permettrait possiblement d'appuyer la validité des résultats par la redondance des signaux obtenus.

La démonstration d'une liaison spécifique à une ou plusieurs classes de transcrits serait riche de conséquences pour le modèle de la fonction des protéines Stau. Cette démonstration défavoriserait l'hypothèse d'une implication dans un mécanisme qui affecte les ARN en général, par exemple une fonction dans la traduction au sens large. Mais de façon plus importante encore, l'identification d'ARN cibles permettrait d'envisager un bon nombre d'essais fonctionnels jusqu'ici inaccessibles. Par exemple, une combinaison d'hybridation *in situ* et d'immunofluorescence permettrait de comparer la localisation des protéines Stau et des ARN nouvellement identifiés. En exploitant la transfection de neurones, il serait aussi possible de suivre la localisation d'un transcrit rapporteur et de comparer sa localisation avec celle des protéines Stau. Dans le même ordre d'idées, une technique très élégante pour observer la localisation d'un transcrit en temps réel tire profit de la fusion d'un élément d'ARN, ou d'un transcrit d'intérêt, à un élément de liaison de la protéine MS2. Une protéine MS2-GFP est alors co-transfectée avec le transcrit rapporteur, ce qui permet de suivre la distribution du transcrit dans une cellule vivante par fluorescence. Par l'une ou l'autre de ces stratégies, il devrait être possible de tester la

première prédiction élaborée dans le modèle de transport d'ARN (Bertrand et al., 1998).

L'identification d'ARN liés par Stau rendrait aussi envisageable un examen de l'activité traductionnelle du transcrit et l'observation de la distribution de cette activité dans les dendrites, par exemple. Nous pourrions réaliser ceci en plaçant l'élément d'ARN reconnu par Stau en aval de la séquence codant pour la GFP, ou la luciférase et quantifier la fluorescence ou la bioluminescence émise.

#### Cartographie des déterminants impliqués dans le transport dendritique

Les travaux réalisés dans le neurone ont été très révélateurs des propriétés des protéines Stau1 et Stau2. Plusieurs caractéristiques, dont la relation avec le cytosquelette et la distribution dans les prolongements dendritiques, y furent très avantageusement examinés. Ce système offre d'intéressantes possibilités pour « disséquer » la dynamique des protéines Stau1 et Stau2. En transfectant des neurones avec des fusions GFP, on peut suivre le mouvement des particules le long des dendrites et une cartographie des déterminants impliqués dans les différentes étapes peut ainsi être effectuée.

En se basant sur la connaissance des déterminants de DmStau, au moins deux mutations devraient être examinées. Premièrement une mutation ponctuelle, affectant la capacité du dsRBD3 de lier l'ARNdb, permettrait de déterminer si la liaison de l'ARN est importante pour le recrutement et le mouvement le long des microtubules dendritiques. Une seconde mutation qui serait intéressante de réaliser est l'élimination de la boucle du dsRBD2. Comme il le fut mentionné dans l'introduction, cette boucle est essentielle pour le mouvement du transcrit d'*oskar* au



pôle postérieur de l'ovocyte dans la drosophile. Interférer par de telles mutations avec le recrutement des particules de Stau1 et 2 sur les microtubules dendritiques permettrait de pointer vers un parallèle mécanistique avec le système de la drosophile. L'exploitation des mêmes déterminants que pour la fonction de DmStau offrirait une signature rassurante d'un mécanisme commun et permettrait de confirmer la seconde prédiction du modèle.

#### Ablation génique de *stau1* et *stau2*

L'ablation génique de *stau1* a été réalisée par l'équipe de S. Aparicio du Wellcome \ CRC, en Angleterre. Les souris qui en résultent ont au premier coup d'oeil un développement normal, mais un haut taux de mortalité pré-natal fut aussi remarqué (données non-publiées). Il est important de mentionner que le phénotype, pour des fonctions comme le transport d'ARN dans les dendrites, n'a pas encore été examiné. Dans l'éventualité où aucun phénotype n'est révélé, il est possible qu'une redondance ou une compensation entre les fonctions des gènes *stau* en soit la cause.

Pour éliminer la possibilité de compensation génique et étudier le phénotype engendré par la perte de *stau2*, nous avons entrepris son ablation génique. À cette fin, j'ai réalisé une construction permettant la recombinaison homologue d'un exon commun aux isoformes de Stau2, qui code pour la partie C-terminale du dsRBD1. Une fois recombinaison, la construction insère une cassette codant pour le gène de résistance à la néomycine et un codon d'arrêt dans le cadre de lecture de la protéine. Nous avons, depuis, convenu de réaliser ce projet en collaboration avec l'équipe de S. Aparicio. Des cellules ES *stau2*<sup>-/-</sup> ont été obtenues et les souris devraient être

accessibles d'ici peu. Cette collaboration nous permettra aussi de réaliser le croisement avec les souris *stau1*<sup>-/-</sup>.

Le patron d'expression de *Stau2* dans le cerveau nous laisse croire que cette protéine puisse servir une fonction spécifique à cet organe. Son implication possible dans le transport de transcrits et le contrôle traductionnel dans le neurone font de *Stau2* un candidat prometteur pour une implication dans des phénomènes comme la mémoire. Outre un examen détaillé du développement du système nerveux, ces souris devraient donc être examinées pour leur aptitude à l'apprentissage. Obtenir des cultures primaires de neurones à partir de telles souris permettrait aussi d'examiner une déficience possible de localisation de transcrits normalement transportés.

#### Identification du site d'interaction de *Stau* avec les ribosomes

Un axe de recherche qui est susceptible d'éclairer la fonction médiée par l'interaction des protéines *Stau* avec les ribosomes est la caractérisation du site d'interaction. Cartographier l'interaction à un site impliqué dans le recrutement de la petite sous-unité, du complexe d'initiation, ou aux différents sites impliqués dans l'élongation pourrait en dire long sur la signification biologique de cette interaction. Je décrirai donc ici quelques expériences qui visent à atteindre cet objectif.

Je propose d'utiliser premièrement une approche de reconstitution. Après avoir traité un extrait cytoplasmique à l'EDTA, une purification de sous-unités ribosomiques pourrait être réalisée en passant l'extrait à travers un coussin 1,5 M sucrose. La portion ainsi recueillie en culot contient alors presque exclusivement les ribosomes, dissociés en sous-unités et les protéines qui y sont associées, incluant *Stau*. Le culot serait alors resuspendu dans du tampon contenant une forte concentration de KCl

pour libérer les protéines associées, qui se retrouvent dans la fraction HSW (high salt wash), par centrifugation. Dans mes travaux menés à partir d'extraits neuronaux, Stau1 et Stau2 sont libérés par un tel traitement. Nous obtiendrions alors d'une part, des sous-unités ribosomiques dénudées d'une très grande partie de ses protéines « périphériques » et d'autre part, des protéines libérées par le traitement. Plusieurs possibilités s'offrent ensuite à nous. L'une d'entre elles est la reconstitution de l'interaction avec les protéines Stau1 et Stau2 recombinantes. Après incubation avec la fraction ribosomique et sédimentation, le fractionnement de Stau serait examiné. La reconstitution de l'interaction par de telles expériences constituerait une preuve solide d'une interaction directe avec les ribosomes.

Dans l'affirmative, plusieurs avenues sont envisageables ensuite pour identifier le « récepteur » sur les ribosomes. Premièrement, séparer les deux sous-unités sur un gradient de sucrose après la reconstitution pourrait révéler une interaction avec l'une, l'autre ou les deux sous-unités. Une autre possibilité serait de tester, par FarWestern, l'interaction sur une préparation des deux sous-unités ribosomiques résolues en gel de protéines 2D.

La sensibilité partielle à la RNase de l'association de Stau2 avec les ribosomes suggère que le récepteur de cette protéine puisse être une portion de l'ARNr qui n'est que partiellement ou temporairement accessible à la RNase. Tenter une reconstitution après un traitement partiel à des RNases pourrait tester cette possibilité. Comme alternative, nous pourrions aussi exploiter les approches de pontage aux UV, ce qui pourrait permettre d'identifier le site précis d'interaction sur l'ARNr.

Une autre technique, qui permettrait de localiser grossièrement un site de liaison possible, est la microscopie électronique sur des sous-unités marquées par immunohistochimie. L'observation du site de liaison de l'anticorps sur la petite sous-unité avec suffisamment de résolution (grossissement 240 000x) permet ainsi de localiser le site de liaison de la protéine S14 (Tischendorf et al., 1975).

Il est toutefois toujours envisageable, à ce point, que la protéine interagisse indirectement avec le ribosome, par exemple via une protéine se liant en périphérie. Si les ribosomes obtenus après HSW étaient inaptes à médier le recrutement de Stau, il pourrait alors être envisagé de reconstituer l'interaction avec des fractions obtenues à partir du surnageant HSW.

#### *Autres fonctions de Stau1 et Stau2...*

Enfin, il est prévisible que les nombreux isoformes de Stau1 et 2 seront impliqués dans de nouvelles fonctions dans un avenir rapproché. Des travaux menés de concert avec l'équipe de A. Mouland ont aussi impliqué Stau1 dans l'encapsidation des particules virales du HIV-1 (Mouland et al., 2000). Plus récemment encore, plusieurs approches indépendantes ont permis de créer un lien entre Stau1 et la télomérase (Bachand et al., 2001; Le et al., 2000). Finalement, des criblages par le système des deux hybrides sont présentement en cours dans le laboratoire et les partenaires de ces protéines jetteront, nous l'espérons, une toute nouvelle lumière sur la diversité de leurs fonctions. La diversité des isoformes de Stau et de leurs propriétés laisse présager une implication dans une grande variété de fonctions et « d'environnements » biochimiques distincts.

## CONCLUSIONS

Les travaux présentés dans cette thèse ont mené à une reconsidération du modèle de la fonction des protéines Staufen. Nous avons étudié les propriétés moléculaires de Stau1 et Stau2 et mis en évidence une variété de liens cellulaires qui nous permettent maintenant de mieux connaître le contexte biochimique propre à ces protéines. Nos résultats supportent une implication de Stau1 et Stau2 dans le transport dendritique d'ARN, mais mettent aussi en perspective la diversité des fonctions que pourraient réaliser leurs différents isoformes. Une fonction candidate particulièrement supportée est une implication dans le contrôle traductionnel. Finalement, ces efforts ont mené à l'élaboration d'une approche intégrée, exploitant des outils de biologie cellulaire, de biochimie, de biologie moléculaire et de génétique inverse. Ce nouveau cadre de recherche permet d'envisager l'élucidation des fonctions des protéines Stau1 et Stau2 dans un avenir rapproché.

**SOURCES DOCUMENTAIRES**

Ainger,K., Avossa,D., Diana,A.S., Barry,C., Barbarese,E. et Carson,J.H. (1997). Transport and localization elements in myelin basic protein mRNA. *J. Cell Biol.* *138*, 1077-1087.

Ainger,K., Avossa,D., Morgan,F., Hill,S.J., Barry,C., Barbarese,E. et Carson,J.H. (1993). Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes. *J. Cell Biol.* *123*, 431-441.

Bachand,F., Triki,I. et Autexier,C. (2001). Human telomerase RNA-protein interactions. *Nucleic Acids Res.* *29*, 3385-3393.

Barbarese,E., Koppel,D.E., Deutscher,M.P., Smith,C.L., Ainger,K., Morgan,F. et Carson,J.H. (1995). Protein translation components are colocalized in granules in oligodendrocytes. *J. Cell Sci.* *108 (Pt 8)*, 2781-2790.

Bassell,G.J., Oleynikov,Y. et Singer,R.H. (1999). The travels of mRNAs through all cells large and small. *FASEB J.* *13*, 447-454.

Bassell,G.J., Taneja,K.L., Kislauskis,E.H., Sundell,C.L., Powers,C.M., Ross,A. et Singer,R.H. (1994). Actin filaments and the spatial positioning of mRNAs. *Adv. Exp. Med. Biol.* *358*, 183-189.

Berleth,T., Burri,M., Thoma,G., Bopp,D., Richstein,S., Frigerio,G., Noll,M. et Nusslein-Volhard,C. (1988). The role of localization of bicoid RNA in organizing the anterior pattern of the *Drosophila* embryo. *EMBO J.* *7*, 1749-1756.

Berry FB, Brown IR. 1996. CaM I mRNA is localized to apical dendrites during postnatal development of neurons in the rat brain. *J. Neurosci. Res.* 43, 565–75.

Bertrand,E., Chartrand,P., Schaefer,M., Shenoy,S.M., Singer,R.H. et Long,R.M. (1998). Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Mol. Cell* 2, 437-445.

Bevilacqua,P.C. et Cech,T.R. (1996). Minor-groove recognition of double-stranded RNA by the double- stranded RNA-binding domain from the RNA-activated protein kinase PKR. *Biochemistry* 35, 9983-9994.

Bian F, Chu T, Schilling K, Oberdick J. 1996. Differential mRNA transport and the regulation of protein synthesis: selective sensitivity of Purkinje cell dendritic mRNAs to translational inhibition. *Mol. Cell. Neurosci.* 7, 116–33.

Breitwieser,W., Markussen,F.H., Horstmann,H. et Ephrussi,A. (1996). Oskar protein interaction with Vasa represents an essential step in polar granule assembly. *Genes Dev.* 10, 2179-2188.

Brendza,R.P., Serbus,L.R., Duffy,J.B. et Saxton,W.M. (2000). A function for kinesin I in the posterior transport of oskar mRNA and Stauf protein. *Science* 289, 2120-2122.

Broadus,J., Fuerstenberg,S. et Doe,C.Q. (1998). Stauf-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature* 391, 792-795.



Burgin KE, Waxham MN, Rickling S, Westgate SA, Mobley WC, Kelly PT. 1990. In situ hybridization histochemistry of Ca/calmodulin dependent protein kinase in developing rat brain. *J. Neurosci.* 10, 1788–89.

Carson, J.H., Cui, H., Krueger, W., Schlepchenko, B., Brumwell, C. et Barbarese, E. (2001). RNA trafficking in oligodendrocytes. *Results Probl. Cell Differ.* 34, 69-81.

Carson, J.H., Worboys, K., Ainger, K. et Barbarese, E. (1997). Translocation of myelin basic protein mRNA in oligodendrocytes requires microtubules and kinesin. *Cell Motil. Cytoskeleton* 38, 318-328.

Clark, I., Giniger, E., Ruohola-Baker, H., Jan, L.Y. et Jan, Y.N. (1994). Transient posterior localization of a kinesin fusion protein reflects anteroposterior polarity of the *Drosophila* oocyte. *Curr. Biol.* 4, 289-300.

Clark, I.E., Wyckoff, D. et Gavis, E.R. (2000). Synthesis of the posterior determinant Nanos is spatially restricted by a novel cotranslational regulatory mechanism. *Curr. Biol.* 10, 1311-1314.

Cooperstock, R.L. et Lipshitz, H.D. (2001). RNA localization and translational regulation during axis specification in the *Drosophila* oocyte. *Int. Rev. Cytol.* 203, 541-566.

Curtis, D., Treiber, D.K., Tao, F., Zamore, P.D., Williamson, J.R. et Lehmann, R. (1997). A CCHC metal-binding domain in Nanos is essential for translational regulation. *EMBO J.* 16, 834-843.

Dahanukar,A., Walker,J.A. et Wharton,R.P. (1999). Smaug, a novel RNA-binding protein that operates a translational switch in *Drosophila*. *Mol. Cell* 4, 209-218.

Dahanukar,A. et Wharton,R.P. (1996). The Nanos gradient in *Drosophila* embryos is generated by translational regulation. *Genes Dev.* 10, 2610-2620.

Dale,L., Matthews,G., Tabe,L. et Colman,A. (1989). Developmental expression of the protein product of Vg1, a localized maternal mRNA in the frog *Xenopus laevis*. *EMBO J.* 8, 1057-1065.

Deshler,J.O., Highett,M.I. et Schnapp,B.J. (1997). Localization of *Xenopus* Vg1 mRNA by Vera protein and the endoplasmic reticulum. *Science* 276, 1128-1131.

Elisha,Z., Havin,L., Ringel,I. et Yisraeli,J.K. (1995). Vg1 RNA binding protein mediates the association of Vg1 RNA with microtubules in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 14, 5109-5114.

Ephrussi,A., Dickinson,L.K. et Lehmann,R. (1991). Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell* 66, 37-50.

Ephrussi,A. et Lehmann,R. (1992). Induction of germ cell formation by oskar. *Nature* 358, 387-392.

Ferrandon,D., Elphick,L., Nusslein-Volhard,C. et St Johnston,D. (1994). Staufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* 79, 1221-1232.

Ferrandon,D., Koch,I., Westhof,E. et Nusslein-Volhard,C. (1997). RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3' UTR-STAUFIN ribonucleoprotein particles. *EMBO J.* 16, 1751-1758.

Furuichi T, Simon-Chazottes D, Fujino I, Yamada N, Hasegawa M et al.1993. Widespread expression of inositol 1,4,5-triphosphate receptor type 1 gene (Insp3r1) in the mouse central nervous system. *Recept. Channels* 1, 11–24.

Garner CC, Tucker RP, Matus A. 1998. Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. *Nature* 336, 674–77.

Gavis,E.R. et Lehmann,R. (1992). Localization of nanos RNA controls embryonic polarity. *Cell* 71, 301-313.

Gavis,E.R. et Lehmann,R. (1994). Translational regulation of nanos by RNA localization. *Nature* 369, 315-318.

Gavis,E.R., Lunsford,L., Bergsten,S.E. et Lehmann,R. (1996). A conserved 90 nucleotide element mediates translational repression of nanos RNA. *Development* 122, 2791-2800.

Gazzaley AH, Benson DL, Huntley GW, Morrison JH. 1997. Differential subcellular regulation of NMDAR1 protein and mRNA in dendrites of dentate gyrus granule cells after perforant path transection. *J. Neurosci.* 17, 2006–17.

Gonzalez-Reyes,A., Elliott,H. et St Johnston,D. (1995). Polarization of both major body axes in *Drosophila* by gurken-torpedo signalling. *Nature* 375, 654-658.

Gunkel,N., Yano,T., Markussen,F.H., Olsen,L.C. et Ephrussi,A. (1998). Localization-dependent translation requires a functional interaction between the 5' and 3' ends of oskar mRNA. *Genes Dev.* *12*, 1652-1664.

Havin,L., Git,A., Elisha,Z., Oberman,F., Yaniv,K., Schwartz,S.P., Standart,N. et Yisraeli,J.K. (1998). RNA-binding protein conserved in both microtu. *Genes Dev.* *12*, 1593-1598.

Hay,B., Jan,L.Y. et Jan,Y.N. (1990). Localization of vasa, a component of *Drosophila* polar granules, in maternal-effect mutants that alter embryonic anteroposterior polarity. *Development* *109*, 425-433.

Herb A, Wisden W, Catania DMV, Marechal D, Dresse A, Seeberg PH. 1997. Prominent dendritic localization in forebrain neurons of a novel mRNA and its product, dendrin. *Mol. Cell Neurosci.* *8*, 367-74.

Hoek,K.S., Kidd,G.J., Carson,J.H. et Smith,R. (1998). hnRNP A2 selectively binds the cytoplasmic transport sequence of myelin basic protein mRNA. *Biochemistry* *37*, 7021-7029.

Hyatt,B.A. et Yost,H.J. (1998). The left-right coordinator: the role of Vgl in organizing left-right axis formation. *Cell* *93*, 37-46.

Jansen,R.P. (1999). RNA-cytoskeletal associations. *FASEB J.* *13*, 455-466.

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

Kiebler,M.A. et 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. et 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-Ha,J., Kerr,K. et Macdonald,P.M. (1995). Translational regulation of oskar mRNA by bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential. *Cell* *81*, 403-412.

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

Kim-Ha,J., Webster,P.J., Smith,J.L. et Macdonald,P.M. (1993). Multiple RNA regulatory elements mediate distinct steps in localization of oskar mRNA. *Development* *119*, 169-178.

Kislauskis,E.H., Li,Z., Singer,R.H. et Taneja,K.L. (1993). Isoform-specific 3'-untranslated sequences sort alpha-cardiac and beta- cytoplasmic actin messenger RNAs to different cytoplasmic compartments. *J. Cell Biol.* *123*, 165-172.

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

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

Kobayashi,S., Yamada,M., Asaoka,M. et Kitamura,T. (1996). Essential role of the posterior morphogen nanos for germline development in *Drosophila*. *Nature* *380*, 708-711.

Kohrmann,M., Luo,M., Kaether,C., DesGroseillers,L., Dotti,C.G. et 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.

Krovat,B.C. et Jantsch,M.F. (1996). Comparative mutational analysis of the double-stranded RNA binding domains of *Xenopus laevis* RNA-binding protein A. *J. Biol. Chem.* *271*, 28112-28119.

Lane,J.D. et Allan,V.J. (1999). Microtubule-based endoplasmic reticulum motility in *Xenopus laevis*: activation of membrane-associated kinesin during development. *Mol. Biol. Cell* *10*, 1909-1922.

Lane,M.E. et Kalderon,D. (1994). RNA localization along the anteroposterior axis of the *Drosophila* oocyte requires PKA-mediated signal transduction to direct normal microtubule organization. *Genes Dev.* *8*, 2986-2995.

Lasko,P. (1999). RNA sorting in *Drosophila* oocytes and embryos. *FASEB J.* *13*, 421-433.

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

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

Lehmann,R. et Nusslein-Volhard,C. (1991). The maternal gene nanos has a central role in posterior pattern formation of the *Drosophila* embryo. *Development* *112*, 679-691.

Li,P., Yang,X., Wasser,M., Cai,Y. et Chia,W. (1997). Inscuteable and Staufen mediate asymmetric localization and segregation of prospero RNA during *Drosophila* neuroblast cell divisions. *Cell* *90*, 437-447.

Lie,Y.S. et Macdonald,P.M. (1999). Translational regulation of oskar mRNA occurs independent of the cap and poly(A) tail in *Drosophila* ovarian extracts. *Development* *126*, 4989-4996.

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

Link W, Konietzko G, Kauselmann G, Krug M, Schwanke B et al.1995. Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *92*, 5734-38.

Litman,P., Behar,L., Elisha,Z., Yisraeli,J.K. et Ginzburg,I. (1996). Exogenous tau RNA is localized in oocytes: possible evidence for evolutionary conservation of localization mechanisms. *Dev. Biol.* 176 , 86-94.

Long,R.M., Gu,W., Lorimer,E., Singer,R.H. et Chartrand,P. (2000). She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to ASH1 mRNA [In Process Citation]. *EMBO J.* 19, 6592-6601.

Long,R.M., Singer,R.H., Meng,X., Gonzalez,I., Nasmyth,K. et Jansen,R.P. (1997). Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA. *Science* 277, 383-387.

Lyford G, Yamagata K, Kaufmann W, Barnes C, Sanders L et al.1995. Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* 14, 433–45.

Macdonald,P.M. (1990). bicoid mRNA localization signal: phylogenetic conservation of function and RNA secondary structure. *Development* 110, 161-171.

Macdonald,P.M. et Kerr,K. (1997). Redundant RNA recognition events in bicoid mRNA localization. *RNA.* 3, 1413-1420.

Macdonald,P.M., Kerr,K., Smith,J.L. et Leask,A. (1993). RNA regulatory element BLE1 directs the early steps of bicoid mRNA localization. *Development* 118, 1233-1243.



Macdonald,P.M., Leask,A. et Kerr,K. (1995). *exl* protein specifically binds BLE1, a bicoid mRNA localization element, and is required for one phase of its activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 10787-10791.

Macdonald,P.M., Luk,S.K. et Kilpatrick,M. (1991). Protein encoded by the *exuperantia* gene is concentrated at sites of bicoid mRNA accumulation in *Drosophila* nurse cells but not in oocytes or embryos. *Genes Dev.* 5, 2455-2466.

Macdonald,P.M. et Struhl,G. (1988). *cis*-acting sequences responsible for anterior localization of bicoid mRNA in *Drosophila* embryos. *Nature* 336, 595-598.

Markussen,F.H., Michon,A.M., Breitwieser,W. et Ephrussi,A. (1995). Translational control of oskar generates short OSK, the isoform that induces pole plasma assembly. *Development* 121, 3723-3732.

McIlvain,J.M., Jr., Lamb,C., Dabora,S. et Sheetz,M.P. (1993). Microtubule motor-dependent formation of tubulovesicular networks from endoplasmic reticulum and Golgi membranes. *Methods Cell Biol.* 39, 227-236.

Micklem,D.R. (1995). mRNA localisation during development. *Dev. Biol.* 172, 377-395.

Micklem,D.R., Adams,J., Grunert,S. et St Johnston,D. (2000). Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. *EMBO J.* 19, 1366-1377.

Mouland,A.J., Mercier,J., Luo,M., Bernier,L., DesGroseillers,L. et 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.

Mowry,K.L. et Melton,D.A. (1992). Vegetal messenger RNA localization directed by a 340-nt RNA sequence element in *Xenopus* oocytes. *Science* 255, 991-994.

Murata,Y. et Wharton,R.P. (1995). Binding of pumilio to maternal hunchback mRNA is required for posterior patterning in *Drosophila* embryos. *Cell* 80, 747-756.

Niessing,D., Driever,W., Sprenger,F., Taubert,H., Jackle,H. et Rivera-Pomar,R. (2000). Homeodomain position 54 specifies transcriptional versus translational control by Bicoid. *Mol. Cell* 5, 395-401.

Nusslein-Volhard,C. (1991). Determination of the embryonic axes of *Drosophila*. *Dev. Suppl* 1, 1-10.

Nusslein-Volhard,C., Frohnhof,H.G. et Lehmann,R. (1987). Determination of anteroposterior polarity in *Drosophila*. *Science* 238, 1675-1681.

Oleynikov,Y. et Singer,R.H. (1998). RNA localization: different zipcodes, same postman? *Trends Cell Biol.* 8, 381-383.

Paradies MA, Steward O. 1997. Multiple subcellular mRNA distribution patterns in neurons: a nonisotopic *in situ* hybridization analysis. *J. Neurobiol.* 33, 473-93.

Pokrywka, N.J. (1995). RNA localization and the cytoskeleton in *Drosophila* oocytes. *Curr. Top. Dev. Biol.* *31*, 139-166.

Pokrywka, N.J. et Stephenson, E.C. (1991). Microtubules mediate the localization of bicoid RNA during *Drosophila* oogenesis. *Development* *113*, 55-66.

Prakash N, Fehr S. Mohr E. Richter D. 1997. Dendritic localization of rat vasopressin mRNA: ultrastructural analysis and mapping of targeting elements. *Eur. J. Neurosci.* *9*, 523-32.

Racca C, Gardiol A, Triller A. 1997. Dendritic and postsynaptic localizations of glycine receptor alpha subunit mRNAs. *J. Neurosci.* *17*, 1691-1700.

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

Rivera-Pomar, R., Niessing, D., Schmidt-Ott, U., Gehring, W.J. et Jackle, H. (1996). RNA binding and translational suppression by bicoid. *Nature* *379*, 746-749.

Rongo, C., Gavis, E.R. et Lehmann, R. (1995). Localization of oskar RNA regulates oskar translation and requires Oskar protein. *Development* *121*, 2737-2746.

Ross, A.F., Oleynikov, Y., Kislauskis, E.H., Taneja, K.L. et Singer, R.H. (1997). Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol. Cell Biol.* *17*, 2158-2165.

Ruohola,H., Bremer,K.A., Baker,D., Swedlow,J.R., Jan,L.Y. et Jan,Y.N. (1991). Role of neurogenic genes in establishment of follicle cell fate and oocyte polarity during oogenesis in *Drosophila*. *Cell* 66, 433-449.

Ryter,J.M. et Schultz,S.C. (1998). Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA. *EMBO J.* 17, 7505-7513.

Schmedt,C., Green,S.R., Manche,L., Taylor,D.R., Ma,Y. et Mathews,M.B. (1995). Functional characterization of the RNA-binding domain and motif of the double-stranded RNA-dependent protein kinase DAI (PKR). *J. Mol. Biol.* 249, 29-44.

Schnorrer,F., Bohmann,K. et Nusslein-Volhard,C. (2000). The molecular motor dynein is involved in targeting swallow and bicoid RNA to the anterior pole of *Drosophila* oocytes. *Nat. Cell Biol.* 2, 185-190.

Schuldt,A.J., Adams,J.H., Davidson,C.M., Micklem,D.R., Haseloff,J., St Johnston,D. et Brand,A.H. (1998). Miranda mediates asymmetric protein and RNA localization in the developing nervous system. *Genes Dev.* 12, 1847-1857.

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

Shen,C.P., Knoblich,J.A., Chan,Y.M., Jiang,M.M., Jan,L.Y. et 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.

Shulman,J.M., Benton,R. et St Johnston,D. (2000). The *Drosophila* homolog of *C. elegans* PAR-1 organizes the oocyte cytoskeleton and directs oskar mRNA localization to the posterior pole. *Cell* 101, 377-388.

Silva,A.J., Stevens,C.F., Tonegawa,S. et Wang,Y. (1992). Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium- calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 257, 201-206.

Simpson-Brose,M., Treisman,J. et Desplan,C. (1994). Synergy between the hunchback and bicoid morphogens is required for anterior patterning in *Drosophila*. *Cell* 78, 855-865.

Smibert,C.A., Lie,Y.S., Shillinglaw,W., Henzel,W.J. et Macdonald,P.M. (1999). Smaug, a novel and conserved protein, contributes to repression of nanos mRNA translation in vitro. *RNA*. 5, 1535-1547.

Smibert,C.A., Wilson,J.E., Kerr,K. et Macdonald,P.M. (1996). smaug protein represses translation of unlocalized nanos mRNA in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 10, 2600-2609.

Sonoda,J. et Wharton,R.P. (1999). Recruitment of Nanos to hunchback mRNA by Pumilio. *Genes Dev.* 13, 2704-2712.

Sonoda,J. et Wharton,R.P. (2001). *Drosophila* Brain Tumor is a translational repressor. *Genes Dev.* 15, 762-773.

Spradling,A.C. (1993). Germline cysts: communes that work. *Cell* 72, 649-651.

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

St Johnston,D., Brown,N.H., Gall,J.G. et Jantsch,M. (1992). A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10979-10983.

St Johnston,D., Driever,W., Berleth,T., Richstein,S. et Nusslein-Volhard,C. (1989). Multiple steps in the localization of bicoid RNA to the anterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Development* 107 *Suppl.*, 13-19.

Stephenson,E.C., Chao,Y.C. et Fackenthal,J.D. (1988). Molecular analysis of the swallow gene of *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* 2, 1655-1665.

Stephenson,E.C. et Pokrywka,N.J. (1992). Localization of bicoid message during *Drosophila* oogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* 26, 23-34.

Struhl,G., Johnston,P. et Lawrence,P.A. (1992). Control of *Drosophila* body pattern by the hunchback morphogen gradient. *Cell* 69, 237-249.

Tannahill,D. et Melton,D.A. (1989). Localized synthesis of the Vg1 protein during early *Xenopus* development. *Development* 106, 775-785.

Tenenbaum,S.A., Carson,C.C., Lager,P.J. et 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). Premature microtubule-dependent cytoplasmic streaming in cappuccino and spire mutant oocytes. *Science* 265, 2093-2096.

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

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

Wang,C. et Lehmann,R. (1991). Nanos is the localized posterior determinant in *Drosophila*. *Cell* 66, 637-647.

Wang,S. et Hazelrigg,T. (1994). Implications for *bcd* mRNA localization from spatial distribution of *exu* protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature* 369, 400-403.

Watson JB, Coulter PM, Margulies JE, de Lecea L, Danielson PE et al.1994. G-protein gamma7 subunit is selectively expressed in medium-sized neurons and dendrites of the rat neostriatum. *J. Neurosci. Res.* 39, 108–16.

Webster,P.J., Liang,L., Berg,C.A., Lasko,P. et Macdonald,P.M. (1997). Translational repressor *bruno* plays multiple roles in development and is widely conserved. *Genes Dev.* 11, 2510-2521.

Wharton,R.P. et Struhl,G. (1991). RNA regulatory elements mediate control of *Drosophila* body pattern by the posterior morphogen nanos. *Cell* 67, 955-967.

Wilhelm,J.E., Mansfield,J., Hom-Booher,N., Wang,S., Turck,C.W., Hazelrigg,T., and Vale,R.D. (2000). Isolation of a ribonucleoprotein complex involved in mRNA localization in *Drosophila* oocytes. *J. Cell Biol.* 148, 427-440.

Wilhelm,J.E. et Vale,R.D. (1993). RNA on the move: the mRNA localization pathway. *J. Cell Biol.* *123*, 269-274.

Wilsch-Brauninger,M., Schwarz,H. et Nusslein-Volhard,C. (1997). A sponge-like structure involved in the association and transport of maternal products during *Drosophila* oogenesis. *J. Cell Biol.* *139*, 817-829.

Wreden,C., Verrotti,A.C., Schisa,J.A., Lieberfarb,M.E. et Strickland,S. (1997). Nanos and pumilio establish embryonic polarity in *Drosophila* by promoting posterior deadenylation of hunchback mRNA. *Development* *124*, 3015-3023.

Yisraeli,J.K. et Melton,D.A. (1988). The maternal mRNA Vg1 is correctly localized following injection into *Xenopus* oocytes. *Nature* *336*, 592-595.

Yisraeli,J.K., Sokol,S. et Melton,D.A. (1989). The process of localizing a maternal messenger RNA in *Xenopus* oocytes. *Development* *107 Suppl*, 31-36.

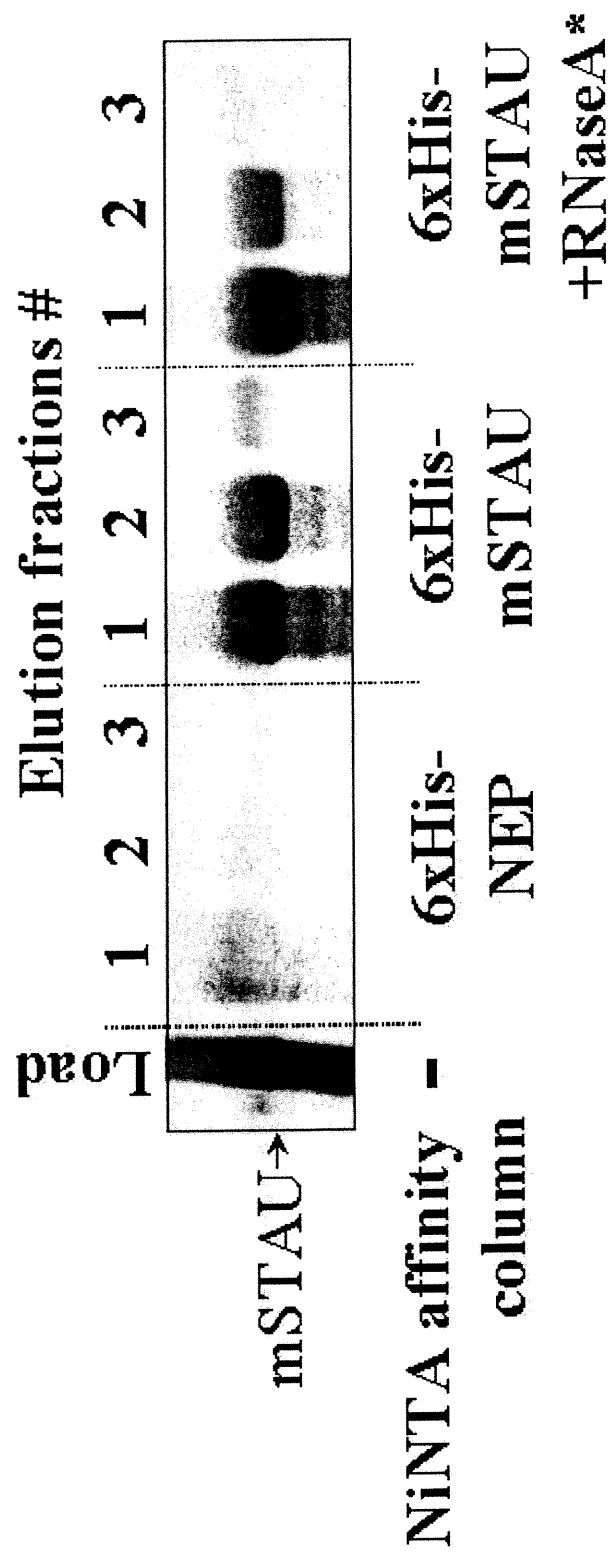
Yisraeli,J.K., Sokol,S. et Melton,D.A. (1990). A two-step model for the localization of maternal mRNA in *Xenopus* oocytes: involvement of microtubules and microfilaments in the translocation and anchoring of Vg1 mRNA. *Development* *108*, 289-298.



## **APPENDICES**

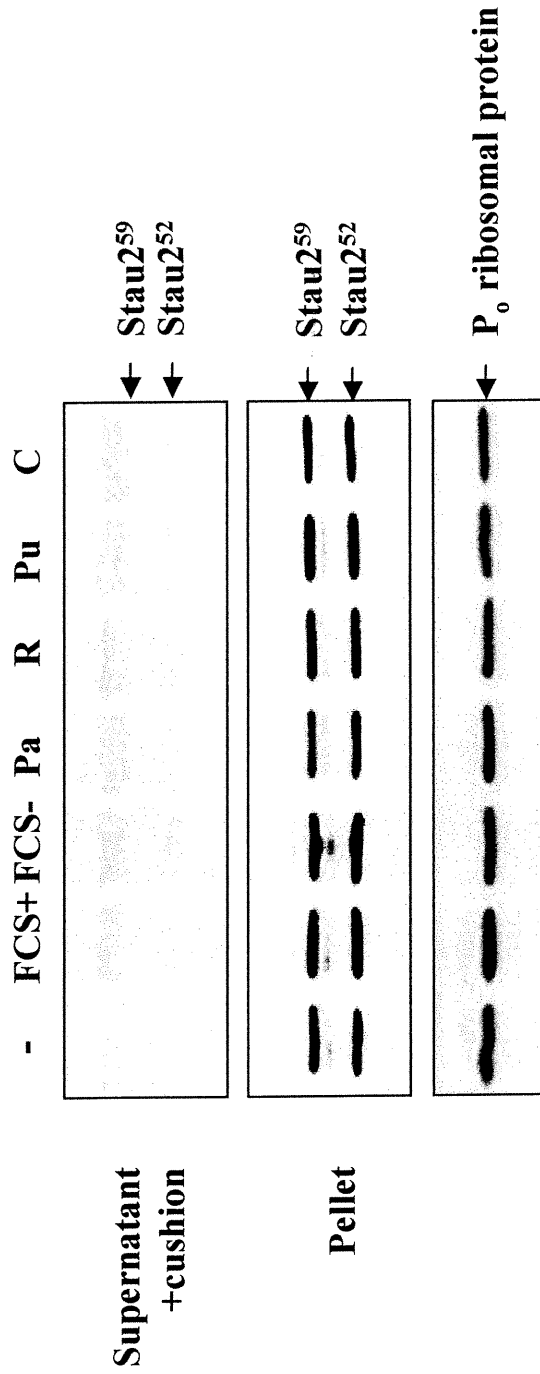
**Figure 1: Stau1 dimerizes *in vitro*.**

Stau1-6xHis was immobilized on a NiNTA-agarose matrix, non-specific sites were blocked and *in vitro* translated <sup>35</sup>S-labelled Stau1 was loaded onto the column. After extensive washings, bound proteins were eluted with 300mM imidazole and three fractions were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. As a control, a NEP-6xHis -NiNTA column was used. In one experiment, the *in vitro* translation extract was treated with 20µg per ml RNaseA for 1 hour prior to loading.



**Figure 2 : Translational activity does not influence Stau2<sup>59</sup> and Stau2<sup>52</sup> association with the ribosomes.**

Cortical neurons in culture were treated with different translation inhibitors prior to the preparation of the cytoplasmic extracts. The cytoplasmic extract was placed on a 1,5 M sucrose cushion in the presence of 0,5% Nonidet P40 and centrifuged at 300,000x g for 3h. The recovered supernatants and cushions (upper panel) and the ribosome-enriched fractions (Pellet, middle panel) were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with anti-Stau2 antibodies. Neurons were either treated with the carrier solution DMSO (-), Pactamycin (Pa), Rapamycin (R), Puromycin (Pu) or Cycloheximide (C). Other cultures were starved by serum depletion (FCS<sup>-</sup>) for 4h or starved and refed with 10% calf serum for 1h (FCS<sup>+</sup>) before preparation of cell extracts. Protein loads were compared with the anti-P<sub>0</sub> antibody (lower panel).



**Figure 3 : Confocal analysis of Stau2 and ribosomes in cortical neurons.**

Cortical neurons in culture were fixed and labeled with anti-Stau2 (A, red) or anti-P<sub>0</sub> (B, green) antibodies. Anti-P<sub>0</sub> was detected with Alexa fluor 488-conjugated anti-human IgG antibodies and anti-Stau2 with Alexa fluor 568 -conjugated anti-rabbit IgG antibodies. Panel C is the superposition of A-B. Controls demonstrated that the observed signals are specific. White arrows indicate distal dendrites crossing the field. These extensions are not labelled with Anti-P<sub>0</sub> antibodies. Bar = 20 μm. Images were taken on a Leica DM IRBE microscope (True Confocal Scan- Spectral Photomultiplier) and processed with the Leica PowerScan TCS-NT software package.

