

Tutorat n°2

Notions fondamentales de biologie – Le dogme central de la biologie

Adressage de l'ARNm Gurken l'ovocyte de Drosophile

Ce préceptorat s'appuie sur la publication de Rom et al. parue dans le journal BBA en 2007.

Chez de nombreux Invertébrés et Vertébrés, un ou plusieurs axes de polarité de l'adulte sont déjà mis en place dans l'oeuf. Chez la drosophile, les axes antéro-postérieur et dorso-ventral sont établis pendant l'ovogenèse par la localisation asymétrique des ARNm bicoid, oskar et gurken dans l'ovocyte (le futur oeuf) qui dépend de la polarisation préalable du follicule ovarien et de l'ovocyte lui-même.

1/ Question générale

Quels sont les différents types d'ARN présents dans une cellule. Décrivez brièvement leurs rôles et leur localisation cellulaire.

A partir de quelle catégorie d'ARN sont produites les protéines ? Que sont les introns et les exons ? Que sont les régions non traduites (UTR Untranslated Regions) ?

Résumer les étapes de la synthèse d'une protéine.

Dans cette étude les auteurs ont identifié une protéine capable d'interagir avec la partie 3'UTR, séquence connue pour être impliquée dans l'adressage de nombreux ARNm, de l'ARNm Gurken. Cette protéine est DDLC1 jouerait un rôle dans l'adressage ou l'ancrage de l'ARN dans une zone spécifique de l'oeuf.

2/ Mise en évidence de l'interaction entre DDLC1 et ARNm gurken

Pour mettre en évidence l'interaction entre l'ARNm gurken et DDLC1, les auteurs ont réalisé une expérience de RNA binding assays à l'aide de sondes radio marquées d'ARN correspondant à *gurken* qu'ils ont incubé avec la protéine DDLC1 fusionnée à la GST. (L'étiquette GST sert à la purification de la protéine). L'interaction est ensuite analysée sur gel d'électrophorèse (SDS PAGE) puis autoradiographie. Fig 1.

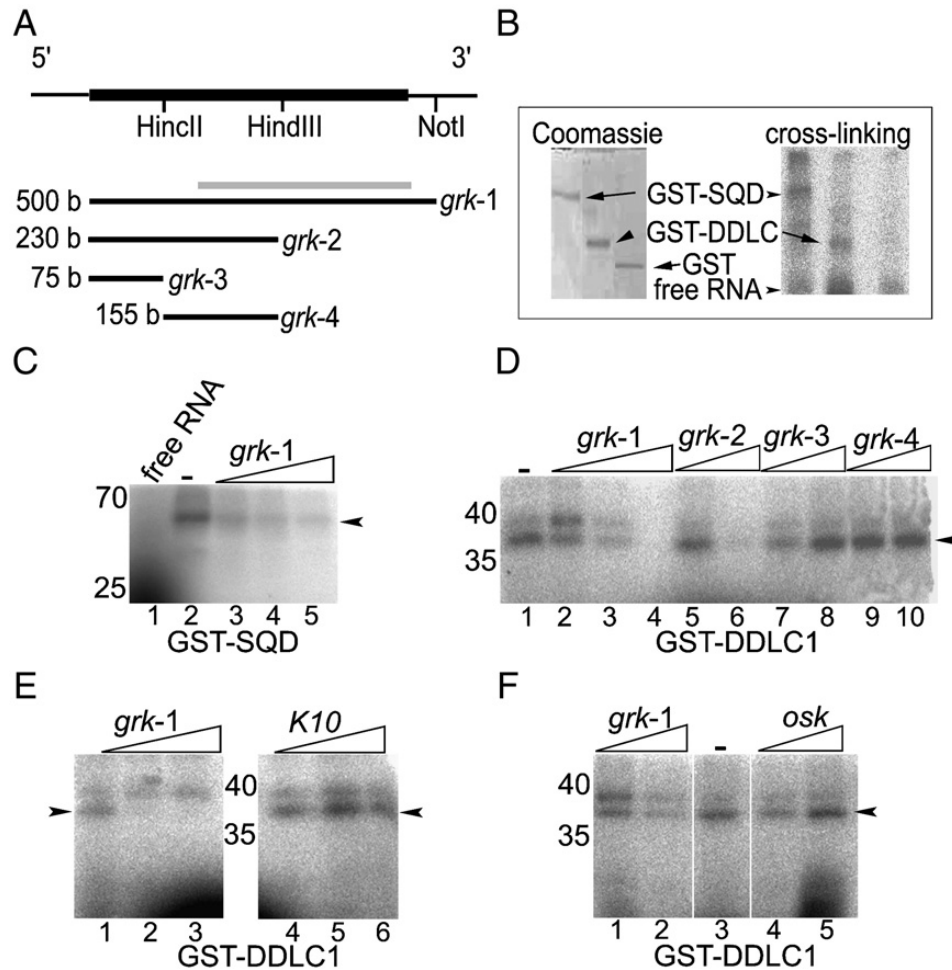


Fig. 1. DDLC1 specifically binds to a 230-nucleotide region within *grk* 3'UTR. (A) Regions in the 3'UTR of *grk*, that were used as probe (*grk1*) and as RNA competitors (*grk-2*, *grk-3*, *grk-4*) in the *grk*/DDLC1 binding experiments. Gray bar (above *grk1*) indicates region proposed to bind to SQD protein [15]. (B) SQD-GST and DDLC1-GST fusion proteins and GST protein, shown in the left panel, were UV cross-linked to radiolabeled *grk1* probe. Both SQD-GST and DDLC1-GST fusions bound to *grk-1* probe, while GST alone did not bind (right panel). (C–F) RNA binding competition assays. (C) Binding of SQD-GST to radiolabeled *grk-1* in the absence (–) or increasing amounts of *grk-1* RNA competitor (lanes 3–5: x25, x50, x150 cold RNA molar excess). (D–F) Binding of DDLC1-GST to radiolabeled *grk-1* in the absence (–) or increasing amounts of cold *grk-1* RNA (D lanes 2–4 and E lanes 1–3: x25, x50, x150 RNA excess; F lanes 1, 2: x50, x150), *grk-2* (D lanes 5, 6: x25, x50), *grk-3* (D lanes 7, 8: x50, x150), *grk-4* (D lanes 9, 10: x50, x150), full length *fs(1)K10* 3'UTR (900 nucleotides) (E lanes 4–6: x25, x50, x150) and full length *osk* RNA (3Kb) (F lanes 4, 5: x50, x150). In D–F, the band marked by the arrowhead is the only band expected for dynein-GST fusion protein. The nature of the slower migrating band that appears sometimes above the dynein-GST is not completely clear.

Décrivez la technique de séparation des protéines sur gel SDS-PAGE en expliquant son principe.

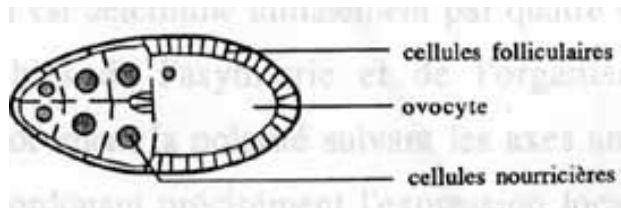
Expliquez comment la fixation d'un ARN joue sur la distance de migration des protéines?

Décrire les résultats et déterminer quelle est la région du 3'UTR qui interagit avec DDLC1 ?

Dans les figures E et F, l'ajout de K10 ou de *osk* modifie-t-il la liaison entre l'ARNm Gurken et DDLC1 ? A quoi servent les expériences en présence de K10 et *osk* dans les figures E et F.

3/ Localisation de l'ARNm Gurken et rôle de DDLC1 dans cette localisation

Organisation d'un oeuf de drosophile



Les auteurs ont recherché l'ARNm de gurken par hybridation in situ (A-C et E-K) ; la protéine Gurken (D, L-N) par immunofluorescence, dans des drosophiles sauvages (A à D) et dans des mutants DDLC1 (E à N). Différentes mutations sont connues pour le gène DDLC1 : exc39, ins1 et DIIA82. Et ceci à différents stades de développement. La flèche jaune indique la position du noyau de l'ovocyte.

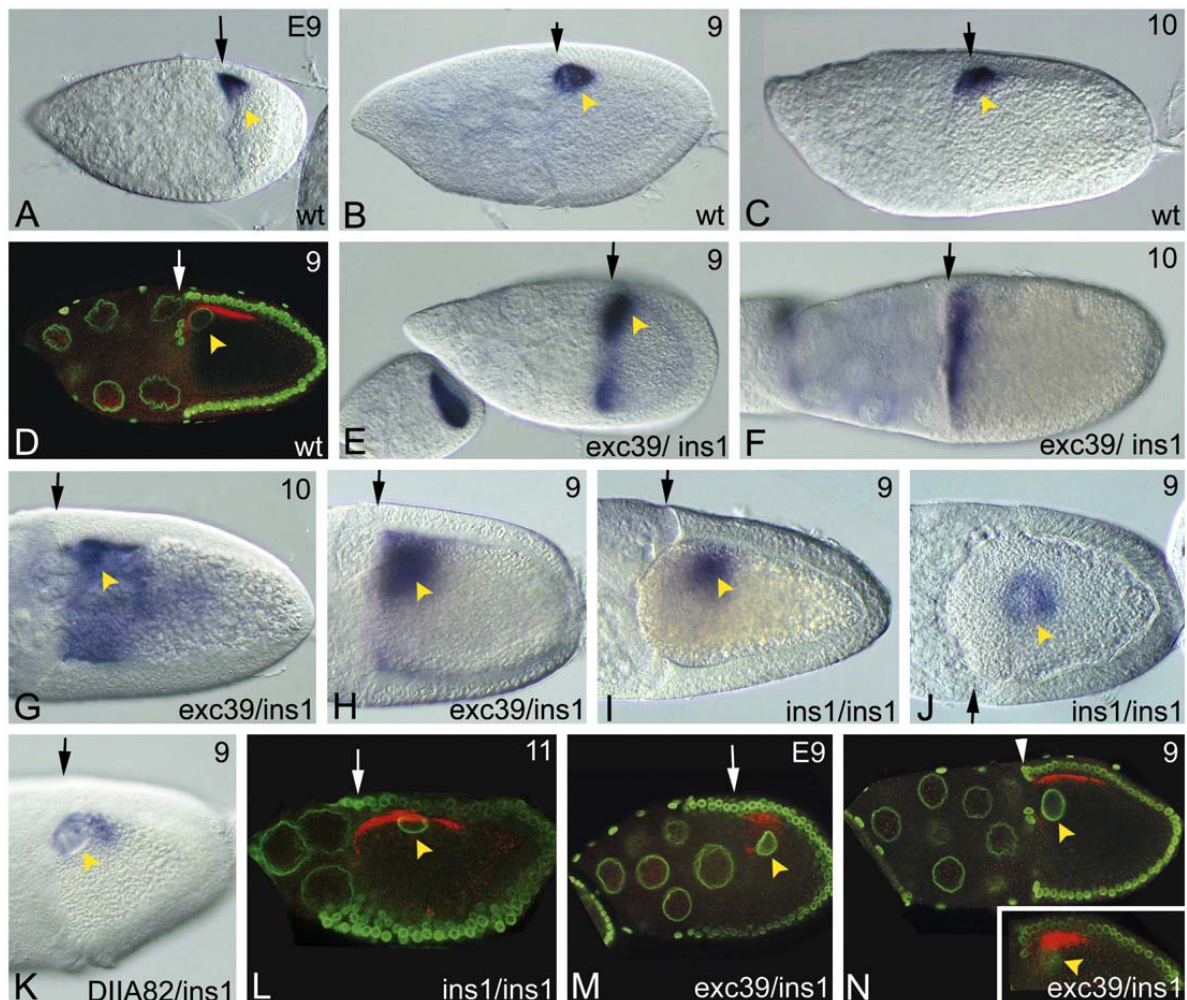


Fig. 4. Mutations in *ddlc1* interfere with *grk* RNA localization and anchoring and with positioning of the oocyte nucleus. *grk* RNA (A-C, E-K) and GRK protein (D, L-N) localization patterns in wt (A-D) and *ddlc1* mutants (E-N). In wt egg chambers *grk* RNA is tightly localized to the AD (A-C), whereas in a fraction of *ddlc1* mutant chambers *grk* resides at the anterior margin (E, F), or displays a diffused pattern around the anterior (G) or the ON (H, I, K). Additionally, contrary to wt (A-D), in mutant chambers the ON may reside at various positions along the AP axis (I, J, L). GRK protein (red), in wt, tightly associates with the AD cortex and with the ON. In the mutants association of GRK with the nucleus is lost while association with the cortex is still maintained (M, N). Inset in N shows an additional section of the same oocyte closer to the surface. Nuclear membrane is stained for lamin (green). Egg chambers were from

ddlc1exc39/ddlc1ins1 (E–H, M, N), ddlc1ins1/ddlc1ins1 (I, J, L) and ddlc1DIIA82/ddlc1ins1 (K). Chambers are at early stage 9 (A and M), middle to late stage 9 (B, D, E, H–K, N), stage 10 (C, F, G) or stage 11 (L). Anterior is to the left and dorsal is up in A–E, G–I and K–N. The black and white arrows in each panel indicate anterior margin. Yellow arrowheads indicate the ON.

Décrire les résultats A à C puis D.

Décrire le reste de la figure.

Quelle expérience auriez-vous rajouté pour compléter ce travail ?

Conclure sur le rôle de DDLC.

4/ Projet industriel

Sur la base des outils et/ou techniques abordés dans ce tutorat, proposez une application à retombées industrielle et économique.