



HAL
open science

CLIP-170 : Interaction avec LIS1, régulations et implication dans le fonctionnement du complexe dynéine/dynactine.

Frédéric Coquelle

► **To cite this version:**

Frédéric Coquelle. CLIP-170 : Interaction avec LIS1, régulations et implication dans le fonctionnement du complexe dynéine/dynactine.. Biologie cellulaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2003. Français. NNT: . tel-00344719

HAL Id: tel-00344719

<https://theses.hal.science/tel-00344719>

Submitted on 5 Dec 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N° D'ORDRE :

**UNIVERSITE PARIS XI
U.F.R. SCIENTIFIQUE D'ORSAY**

THESE

Présentée

Pour obtenir

**Le GRADE de DOCTEUR EN SCIENCES
DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY**

PAR

Frédéric COQUELLE

**Sujet : CLIP-170 : Interaction avec LIS1, Régulation et Implication dans le
Fonctionnement du Complexe Dynéine / Dynactine.**

Soutenue le 10 janvier 2003 devant la Commission d'examen

| | |
|----------------------------------|-----------------------------|
| Pr. Michel JACQUET | (Président) |
| Dr. Isabelle VERNOS | (Rapporteur) |
| Dr. Didier JOB | (Rapporteur) |
| Dr. Jean-Claude COURVALIN | (Examineur) |
| Dr. Franck PEREZ | (Examineur) |
| Pr. Jan DE MEY | (Directeur de thèse) |

A mes parents,

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le professeur Jan De Mey pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir ainsi permis de réaliser mon DEA et ma thèse sur un sujet passionnant et compétitif. Merci Jan d'avoir eu la « bonne » idée de me contacter au début du mois de juillet 1996 pour me proposer d'effectuer ma formation doctorale à tes côtés. Ce simple appel téléphonique a changé mon existence et restera dans mon esprit le point de départ de mon aventure scientifique. Merci pour la confiance que tu m'as accordée, les précieux conseils que tu m'as prodigués et ton enthousiasme tellement rassurant dans les moments difficiles.

Ce travail a été initié à l'Institut Jacques Monod et poursuivi à l'Institut Curie. Je remercie les docteurs Danièle Hernandez-Verdun et Jacques Ghysdael, responsables respectivement du département de Biologie Cellulaire de l'Institut Jacques Monod et de l'UMR-146 du CNRS/IC. Je remercie également le docteur Georges Calothy, fondateur et ancien directeur de l'UMR-146, qui nous a accueilli avec tant d'enthousiasme en 1999. Merci Georges pour ta simplicité, ta bienveillance envers les étudiants et tes précieux conseils.

Je tiens à remercier le professeur Michel Jacquet de me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse et pour le travail qu'il a accompli à la tête du DEA « Biologie Moléculaire de la Cellule ». Je profite de cette occasion pour remercier toute l'équipe pédagogique de ce DEA avec une mention spéciale pour le regretté professeur André Adoutte. Un grand merci à Muriel Decraene qui a tant fait pour les étudiants de cette formation doctorale.

Je remercie les docteurs Isabelle Vernos et Didier Job d'avoir accepté sans hésitation d'être les rapporteurs de cette thèse et d'avoir rédigé leur rapport dans un temps plus que limité. Mes remerciements s'adressent également aux docteurs Jean-Claude Courvalin et Franck Perez pour avoir accepté de juger ce travail.

Je souhaite également remercier les personnes qui m'ont soutenu et conseillé pendant ma thèse. Je tiens tout particulièrement à remercier le docteur Simon Saule pour son soutien et ses précieux conseils notamment pendant la rédaction de ce mémoire, ainsi que le docteur Jean-Claude Courvalin pour m'avoir guidé tout au long de cette thèse.

Mes remerciements vont également aux docteurs Brigitte Buendia, Ricardo Bastos et Patrick Martin qui m'ont tant appris et qui ont consacré beaucoup de leur temps pour m'enseigner les techniques essentielles à la réalisation de mon projet.

Ce travail de thèse n'aurait pas été possible sans la contribution du professeur Orly Reiner et de son équipe. Je remercie tout particulièrement Michal Caspi avec qui je travaille depuis près de trois ans par courrier électronique interposé et qui m'a enseigné les joies du « double hybride » lors de mon séjour mémorable en Israël.

Je remercie également mes deux acolytes : Jim Dompierre et Fabrice Cordelières. Jim, mon compère dans la galère du « cell free system », merci pour ton aide, ton soutien et ton amitié sans faille si réconfortante dans les moments difficiles. Fabrice, notre « petit » génie de l'informatique jamais avare de conseils, merci pour ton aide et ton humour. Je remercie aussi Jean-Richard Prat notre talentueux technicien. Je n'oublie pas les anciens du laboratoire et en

particulier le professeur Sylvie Busson, les docteurs Christian Bleux et Denis Dujardin, Anne Moreau et Erwan Delbarre, mon premier stagiaire dont je suis si fier.

Je remercie tous les membres de l'équipe de Simon Saule pour leur gentillesse, la bonne ambiance et les nombreuses aides qu'ils m'ont apportées. Merci donc à Nathalie Planque, Laurence Leconte, Raffaella Zaccarini, Vincent Dolez, Jean-Sébastien Bèche-Belsot, Océane Anezo et, le petit nouveau, Jérôme Souga.

Je remercie tous les personnels de l'UMR146 et de l'Institut Jacques Monod, et plus particulièrement : Françoise Arnouilh, Frédérique Berger, Véra Guez, Christine Houlbert, Denise Maitre, Corinne Poncet, Hervé Tourbez et Marco Tramier.

Merci évidemment à ma famille et en particulier à mes parents et mes grands-parents maternels sans lesquels je n'aurais pas eu le courage et l'ambition de faire ces études doctorales. Merci tout particulièrement de m'avoir soutenu pendant la rédaction laborieuse de ce manuscrit.

Merci à tous ceux que je n'ai pas cités et qui méritent leur place ici.

ABREVIATIONS

| | |
|-------------|---|
| ADN | <u>A</u> cide <u>D</u> éoxyribo <u>N</u> ucléique |
| ADNc | <u>A</u> DN <u>c</u> omplémentaire |
| AMPPNP | 5'-adénylylimidodiphosphate |
| APC | <u>A</u> denomatous <u>P</u> olyposis <u>C</u> oli |
| ARN | <u>A</u> cide <u>R</u> ibo <u>N</u> ucléique |
| Arp | <u>A</u> ctin <u>R</u> elated <u>P</u> rotein |
| ATP | <u>A</u> dénosine <u>T</u> riphosphate |
| Bik1 | <u>B</u> ilateral <u>k</u> aryogamy defect protein 1 |
| CLASP | <u>C</u> LIP- <u>A</u> ssociated <u>P</u> rotein |
| CLIP | <u>C</u> ytoplasmic <u>L</u> inker <u>P</u> rotein |
| C-terminale | extrémité <u>C</u> arboxy-terminale |
| DAPI | 4', 6-diamine-2'-phenylindole dihydrochloride |
| D/D | Complexe moteur dynéine – dynactine |
| DblZm | « doigts de zinc » N° 1 et 2 mutés (double mutant) |
| DHC | <u>D</u> ynein <u>H</u> eavy <u>C</u> hain |
| DIC | <u>D</u> ynein <u>I</u> ntermediate <u>C</u> hain |
| dNTP | déoxyribo <u>N</u> ucléotide <u>T</u> ri <u>P</u> hosphate |
| EB1 | <u>E</u> nd <u>B</u> inding protein 1 |
| EDTA | <u>A</u> cide <u>E</u> thylène <u>D</u> iamine <u>T</u> étracétique |
| Fig. | Figure |
| GFP | <u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein |
| GTP | <u>G</u> uanosine <u>T</u> riphosphate |
| GMPCPP | guanylyl-(alpha,beta)-methylene-diphosphonate |
| HIV | <u>H</u> uman <u>I</u> mmunodeficiency <u>V</u> irus |
| HSP | <u>H</u> eat- <u>S</u> hock <u>P</u> rotein |
| kb | <u>K</u> ilo <u>b</u> ases |
| kDa | <u>K</u> ilo <u>D</u> alton |
| LC | Light Chain |
| LIC | Light Intermediate Chain (dynein) |
| LIS1 | Lissencephaly-1 |
| MAP | <u>M</u> icrotubule <u>A</u> ssociated <u>P</u> rotein |
| MBP | <u>M</u> icrotubule <u>B</u> inding <u>P</u> rotein |
| MDa | <u>M</u> ega <u>D</u> alton |
| MT | <u>M</u> icro <u>T</u> ubule |
| N-terminale | extrémité amino-terminale |
| NUD | <u>N</u> uclear <u>D</u> istribution |
| pb | paire de <u>b</u> ases |
| PBS | Phosphate Buffer Saline |
| PCR | <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction (<u>R</u> éaction de <u>P</u> olymérisation en <u>C</u> haîne) |
| PHEM | <u>P</u> ipes <u>H</u> epes <u>E</u> GTA <u>M</u> gCl ₂ (buffer) |
| +TIP | + End <u>T</u> racking <u>P</u> rotein |
| WT | <u>W</u> ild <u>T</u> ype |

Z1m
Z2m

« doigt de zinc » N°1 muté
« doigt de zinc » N°2 muté

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCTION..... | 1 |
| I. Le réseau microtubulaire | 4 |
| A. Organisation et structure du microtubule | 4 |
| B. Dynamique des microtubules | 7 |
| 1. Assemblage et dynamique des microtubules <i>in vitro</i> | 7 |
| 2. Assemblage et dynamique des microtubules <i>in vivo</i> | 12 |
| a) Nucléation des microtubules <i>in vivo</i> | 12 |
| b) Modifications post-traductionnelles des microtubules..... | 14 |
| c) Protéines stabilisant les microtubules <i>in vivo</i> | 16 |
| d) Protéines déstabilisant les microtubules <i>in vivo</i> | 18 |
| e) Les « + End Tracking Proteins » | 21 |
| C. Dynamique des microtubules, remodelage du réseau microtubulaire et polarisation cellulaire | 25 |
| 1. La migration cellulaire | 25 |
| a) Rôle des petites GTPases Rho | 26 |
| b) Rôle des microtubules | 29 |
| 2. La division cellulaire | 35 |
| a) Assemblage du fuseau de division | 35 |
| b) Mécanismes de l'orientation et du positionnement du fuseau de division | 38 |
| c) Rôle du kinétochore dans le processus mitotique | 43 |
| II. Le complexe moteur dynéine cytoplasmique/dynactine | 53 |
| A. Structure de la dynéine cytoplasmique | 53 |
| 1. Les chaînes lourdes (HC ou DHC) | 54 |
| 2. Les chaînes intermédiaires (IC ou DIC) | 56 |
| 3. Les chaînes légères intermédiaires (LIC) | 57 |
| 4. Les chaînes légères (LC) | 58 |
| 5. Régulation de la dynéine cytoplasmique par phosphorylation | 60 |
| B. La dynactine | 61 |
| 1. Structure de la dynactine | 61 |
| a) Le filament Arp1 | 63 |
| b) Le bras latéral et la p150 ^{Glued} | 64 |
| c) Les autres protéines du complexe dynactine | 66 |
| 2. La dynactine interagit avec la dynéine cytoplasmique | 67 |

| | | |
|-------------|---|------------|
| 3. | Association de la dynactine avec d'autres protéines | 68 |
| 4. | Fonctions de la dynactine vis-à-vis de la dynéine cytoplasmique | 69 |
| | a) La dynactine, activateur de l'activité ATPasique de la dynéine cytoplasmique | 69 |
| | b) La dynactine, récepteur de la dynéine cytoplasmique sur les organites | 70 |
| | c) La dynactine, facteur de processivité de la dynéine cytoplasmique | 71 |
| C. | Fonctions du complexe dynéine cytoplasmique/dynactine | 72 |
| 1. | En interphase | 73 |
| 2. | En mitose | 74 |
| | a) Rupture de l'enveloppe nucléaire | 74 |
| | b) Assemblage et orientation du fuseau de division | 75 |
| | c) Fonctions au kinétochore | 75 |
| | d) La cytokinèse | 77 |
| 3. | Le complexe dynéine cytoplasmique/dynactine constitue une +TIP | 77 |
| III. | LIS1 | 80 |
| A. | La lissencéphalie | 80 |
| 1. | Le développement du néocortex | 80 |
| 2. | La lissencéphalie | 83 |
| B. | La protéine LIS1 humaine et ses orthologues | 84 |
| C. | LIS1 est une sous-unité du PAFAH(I) | 87 |
| D. | NUDC, NUDE et leurs orthologues | 88 |
| E. | LIS1 interagit avec le complexe dynéine cytoplasmique/dynactine | 90 |
| F. | Fonctions cellulaires de LIS1 | 94 |
| 1. | LIS1 contrôle l'activité de la dynéine cytoplasmique | 94 |
| 2. | LIS1 contrôle la dynamique des microtubules | 95 |
| | a) Chez <i>Aspergillus nidulans</i> | 95 |
| | b) Chez les mammifères | 96 |
| 3. | LIS1 participe au fonctionnement du MTOC | 97 |
| 4. | LIS1 contrôle la migration nucléaire | 100 |
| 5. | Fonctions de LIS1 au cours de la mitose | 100 |
| | a) LIS1 et les sites corticaux | 101 |
| | b) LIS1 et le kinétochore | 101 |
| G. | Fonctions de LIS1 au cours du développement embryonnaire | 103 |
| 1. | Prolifération cellulaire et développement précoce | 103 |
| 2. | Migration des neurones et développement du cerveau | 104 |
| 3. | Translocation nucléaire, détermination de l'ovocyte et maturation des neurones | 109 |
| 4. | Mitose et migration des neurones au cours du développement embryonnaire | 111 |

| | |
|---|------------|
| IV. La CLIP-170 | 113 |
| A. La CLIP-170 est une « Microtubule Binding Protein » dont l'association aux microtubules est régulée par phosphorylation | 113 |
| B. Structure et propriétés de la CLIP-170 et des protéines apparentées | 115 |
| 1. La CLIP-170 | 115 |
| a) Organisation fonctionnelle de la CLIP-170 | 115 |
| b) La boîte CCHC | 116 |
| c) Propriétés de l'interaction de la CLIP-170 avec les microtubules..... | 117 |
| d) Structure de la CLIP-170 | 118 |
| 2. Les homologues et orthologues de la CLIP-170 | 118 |
| a) Les isoformes de la CLIP-170 | 118 |
| b) La CLIP-115, un paralogue de la CLIP-170 chez les mammifères | 120 |
| c) La CLIPR-59, une CLIP associée à l'appareil de Golgi chez les mammifères. | 121 |
| d) La D-CLIP-190, une CLIP chez la drosophile | 121 |
| e) Bik1p et Tip1p, les orthologues de la CLIP-170 chez les levures | 122 |
| C. Fonctions cellulaires de la CLIP-170 | 124 |
| 1. Implication des CLIPs dans le trafic intracellulaire | 124 |
| a) Transport des vésicules d'endocytose | 124 |
| b) Transport vers le réseau trans-golgien | 125 |
| 2. Contrôle de la dynamique et de la polarisation des microtubules, implication dans la polarisation cellulaire | 126 |
| a) La plupart des CLIPs sont des « +End Tracking Proteins » (+TIPs)..... | 126 |
| b) Rôles des CLIPs dans la polarisation des microtubules et des cellules | 129 |
| 3. Fonctions des CLIPs dans la ségrégation des chromosomes | 136 |
| a) La CLIP-170 | 136 |
| b) Bik1p | 138 |

RESULTATS : **139**

I. LIS1 constitue un adaptateur entre la CLIP-170 et le complexe dynéine cytoplasmique/dynactine. Article I **142**

Données complémentaires sur le recrutement de LIS1 aux bouts (+) des microtubules 147

II. Etude de mutations ponctuelles de LIS1, découvertes chez des patients atteints de lissencéphalie. Article II **151**

DISCUSSION GENERALE et PERSPECTIVES **153**

ANNEXES

Je présente ici des travaux annexes auxquels j'ai collaboré pendant ma thèse et qui ont fait l'objet de deux publications scientifiques en 2001.

INTRODUCTION

AVANT-PROPOS

Le comportement dynamique des microtubules (MTs) est essentiel au remodelage du cytosquelette, dont dépendent de nombreux processus cellulaires fondamentaux comme la morphogenèse, la motilité et la mitose. Cela implique l'existence de mécanismes très élaborés permettant le contrôle, dans le temps et dans l'espace, de l'assemblage et de l'organisation des MTs.

De nombreuses études ont permis d'identifier des protéines capables de contrôler directement la dynamique des MTs, comme les MAPs (« Microtubules Associated Proteins ») et certains moteurs moléculaires. Cependant, nous ne connaissons pas, à ce jour, les mécanismes précis qui assurent le contrôle spatio-temporel de la dynamique des MTs et qui permettent l'ancrage de ces derniers dans des structures particulières comme le cortex cellulaire et le kinétochore. Toutefois, les cinq dernières années de recherche, dans ce domaine, ont permis de faire la lumière sur une « nouvelle » famille de protéines qui pourrait remplir de telles fonctions. Il s'agit des +TIPs pour « +end Tracking Proteins ». Ces protéines partagent la propriété de se localiser à l'extrémité « plus » des MTs (extrémité la plus dynamique) en cours de polymérisation. Elles contribuent, non seulement, à la régulation de la dynamique des MTs, mais constituent aussi d'excellents candidats pour assurer le guidage de l'assemblage des MTs vers une région spécialisée du cortex cellulaire. Par ailleurs, en interagissant avec certaines protéines corticales et kinétochoriennes, les +TIPs devraient permettre l'ancrage et la stabilisation concomitants des MTs au cortex cellulaire et au kinétochore.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé principalement au prototype des +TIPs : la CLIP-170 (« Cytoplasmic Linker Protein of 170 kDa »). Cette protéine a été identifiée originellement comme une molécule capable d'interagir avec les MTs de façon ATP dépendante. Elle est requise, *in vitro*, pour l'établissement d'un lien statique entre les vésicules d'endocytose et les MTs. Elle est également impliquée dans le contrôle de la dynamique des MTs et pourrait jouer un rôle dans la capture des MTs au cortex cellulaire et aux kinétochores. De plus, la CLIP-170 semble participer au fonctionnement de la dynéine cytoplasmique, un moteur moléculaire impliqué dans de nombreux processus cellulaires en interphase et en mitose. Cependant, nous ne savons pas quels rôles précis la CLIP-170 joue

vis-à-vis de la dynéine cytoplasmique et aucun lien physique entre cette +TIP et ce moteur moléculaire n'avait pu être mis en évidence jusqu'à aujourd'hui.

Tout d'abord, mon travail de thèse a contribué à mettre en évidence un lien physique entre la dynéine cytoplasmique et la CLIP-170. En effet, nous avons montré, par de multiples approches, une interaction directe entre la CLIP-170 et LIS1, une protéine capable, par ailleurs, d'interagir directement avec la dynéine cytoplasmique et son principal co-facteur, la dynactine. LIS1 est une MAP, mutée chez de nombreux patients atteints d'une lissencéphalie de type I, qui semble également jouer un rôle de co-facteur activateur de la dynéine cytoplasmique. Dans le cadre de ce travail, nous avons également identifié les domaines de chacune des deux protéines impliqués dans cette interaction, et nous avons apporté des éléments indiquant une possible régulation de cette interaction par phosphorylation.

Ensuite, l'étude des fonctions cellulaires potentielles de cette interaction m'a permis de participer à la mise en évidence du recrutement de LIS1 sur les extrémités « plus » des MTs. Elle a fourni des éléments substantiels permettant de supposer que ce recrutement est dépendant de la CLIP-170. Par ailleurs, j'ai contribué à démontrer que le recrutement de la CLIP-170 sur les kinétochores dépend de son domaine d'interaction avec LIS1. L'ensemble de ces résultats a permis de montrer que LIS1 constitue un adaptateur de la CLIP-170 sur le complexe moteur dynéine cytoplasmique-dynactine.

Enfin, j'ai contribué à l'étude de protéines LIS1 qui présentent chacune une mutation ponctuelle dans diverses régions conservées. Ces mutations ponctuelles ont été découvertes chez des patients atteints d'une lissencéphalie de type I plus ou moins sévère. Par des approches biochimiques, moléculaires et cellulaires, nous avons montré que, selon la sévérité de la maladie, les différentes propriétés de LIS1 (repliement, stabilité, localisations sub-cellulaires, interaction avec ses partenaires et liaison aux MTs) sont plus ou moins affectées. A ce propos, un tableau permettant de corrélérer la sévérité de la maladie et les propriétés de LIS1 a été réalisé. A l'occasion de cette étude, nous avons également identifié les domaines de LIS1 impliqués dans l'interaction avec les MTs et les sous-unités catalytiques du PAFAH(I) (Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase).

La description de ce travail, sous forme de commentaires d'articles et de données complémentaires, sera précédée d'une partie introductive :

Dans un premier temps, nous décrirons l'assemblage, la structure et la dynamique des MTs. A cette occasion, nous présenterons notamment quelques exemples de protéines

capables de contrôler la dynamique des MTs *in vivo*. Cela nous permettra d'établir les bases moléculaires du recrutement et des fonctions des +TIPs à l'extrémité « plus » des MTs. Nous verrons également de quelles façons le réseau de MTs se polarise et contribue ainsi à des processus cellulaires fondamentaux comme la migration cellulaire et la mitose. Ce dernier point nous permettra d'illustrer les contributions putatives ou avérées des +TIPs dans la polarisation du réseau microtubulaire (guidage des MTs vers des régions spécifiques, et ancrage de ceux-ci au cortex cellulaire et dans le kinétochore).

Dans une deuxième partie, nous décrirons la structure, l'assemblage et les fonctions du complexe moteur dynéine cytoplasmique – dynactine. Dans ce chapitre, nous montrerons en quoi ce complexe moteur constitue une +TIP et quelles fonctions il peut avoir dans la polarisation du réseau microtubulaire, notamment en mitose. Cette partie est essentielle à la compréhension des fonctions cellulaires des protéines LIS1 et CLIP-170.

Dans une troisième partie, nous présenterons la protéine LIS1. Nous décrirons les fonctions cellulaires de LIS1, notamment celles qui l'associent aux MTs et à la dynéine cytoplasmique. Nous tâcherons aussi d'établir un parallèle entre la lissencéphalie et les fonctions de LIS1.

Enfin, dans l'ultime chapitre, nous traiterons de la CLIP-170 et des protéines apparentées dans divers organismes. Nous décrirons plus particulièrement les dernières découvertes concernant les fonctions de la CLIP-170 à l'extrémité « plus » des MTs, dans le contexte des processus cellulaires décrits dans le premier chapitre, c'est-à-dire : la polarisation du réseau microtubulaire préalable à la migration et à la division des cellules.

I. Le réseau microtubulaire

Les microtubules (MTs) forment, avec les microfilaments d'actine et les filaments intermédiaires, le cytosquelette des cellules eucaryotes. Ce sont des agrégats cylindriques creux impliqués dans l'organisation fonctionnelle et l'architecture des cellules eucaryotes. En effet, la dynamique et la remarquable flexibilité de leur organisation font des MTs des déterminants essentiels pour la morphogenèse et la motilité, requis dans l'organisation de structures cellulaires comme l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique et utilisés comme voies de transit pour le transport de certaines organelles (pour revues : (Alberts *et al.*, 1994; Nogales, 2000; Valiron *et al.*, 2001)). Au cours de la mitose, l'organisation des MTs cytoplasmiques est complètement bouleversée pour former le fuseau de division dont la fonction est d'assurer la répartition égale des chromosomes entre les deux cellules filles (pour revue : (Hyman et Karsenti, 1996)).

A. Organisation et structure du microtubule

Alors que les MTs des axonèmes peuvent adopter des structures plus complexes, le MT cytoplasmique est composé de 13 protofilaments qui s'associent latéralement pour former une structure cylindrique de 25 nm de diamètre. Chaque protofilament résulte de la polymérisation d'hétérodimères de tubulines α et β . Des études, fondées sur l'utilisation de monomères de kinésines pour décorer les MTs, suggèrent que le modèle de la « B-lattice » rend le mieux compte de la structure des MTs (Kikkawa *et al.*, 1994; Sosa et Milligan, 1996; Wade *et al.*, 1995). Selon ce modèle, les interactions latérales entre protofilaments se font entre tubulines de même type (α - α et β - β) avec un décalage de 0,9 nm, dans le sens de la longueur, d'un protofilament à un autre. Ce décalage confère à la paroi du MT une structure hélicoïdale décrite dans la figure 1. Pour 13 protofilaments, un tour d'hélice équivaut donc à un décalage de 12 nm, ce qui correspond à trois fois la taille d'un monomère de tubuline. Aussi, compte tenu de ce décalage, ce genre de structure hélicoïdale est dit avoir trois départs (Fig.1). En outre, la structure d'un MT de 13 protofilaments « à trois départs » présente une discontinuité car l'interaction entre le premier et le dernier protofilaments doit se faire obligatoirement entre tubulines différentes (α - β). Ces interactions de type « α - β » sont probablement moins stables et provoquent l'apparition d'une sorte de cicatrice dans la paroi du MT dont les conséquences (ou rôles) physiologiques, si elles existent, ne sont pas encore

connues (pour revue : (Wade et Hyman, 1997)) et quelques hypothèses sont décrites dans : (Nogales, 2000)).

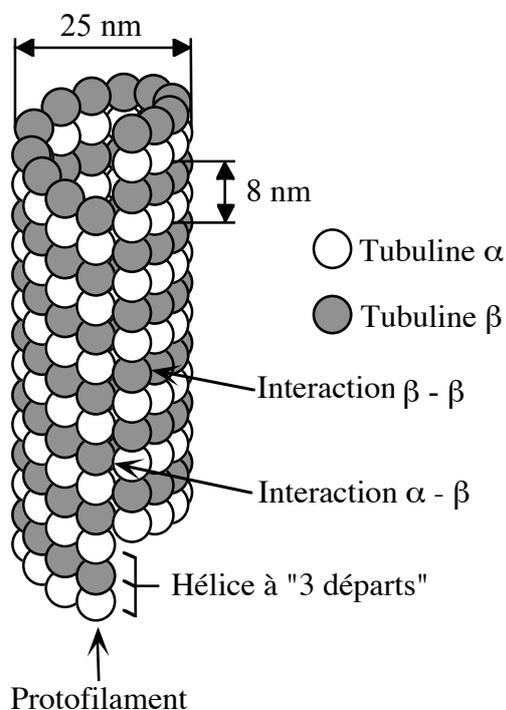


Figure 1 : Schématisation de la structure d'un MT possédant 13 protofilaments.

Les interactions latérales entre protofilaments se font entre tubulines de même type (α - α et β - β) avec un décalage de 0,9 nm entre chaque protofilament. Ainsi, pour 13 protofilaments, un tour d'hélice provoque un décalage, dans le sens de la longueur, d'environ 12 nm, ce qui est équivalent à trois fois la taille d'un monomère de tubuline α ou β . Ce type de structure est dit avoir "trois départs". Cependant cette hélice n'est pas continue, car pour 13 protofilaments, l'interaction entre le premier et le dernier de ceux-ci se fait obligatoirement entre des tubulines différentes (α - β).

D'après (Wade et Hyman, 1997)

L'organisation des hétérodimères de tubulines α et β , dans la paroi du MT, est polarisée, ce qui conduit à l'existence de différences structurales et cinétiques entre les deux extrémités du MT. En effet, chaque MT dispose d'une extrémité « plus » (bouts (+)), dont la polymérisation est plus rapide qu'à l'extrémité « moins » (bouts (-)). Le bout (+) expose la tubuline β , alors que le bout (-) expose la tubuline α . (Wade et Hyman, 1997). *In vivo*, les bouts (-) sont généralement associés au centrosome, à proximité du noyau, tandis que les bouts (+) sont à la périphérie. Par ailleurs, la polarité des MTs est essentielle au bon fonctionnement des moteurs moléculaires que sont les kinésines et la dynéine cytoplasmique.

Les monomères de tubulines α et β sont des protéines de 450 résidus aminoacides (50 kDa chacune) qui présentent 50 % d'identités entre elles (Burns, 1991). Ils appartiennent à une famille de protéines qui comptent, à ce jour, 7 membres différents (Oakley, 2000).

Chaque monomère de tubuline lie une molécule de GTP, non échangeable pour la tubuline α (site N) et échangeable pour la tubuline β (site E). La présence du GTP, associé à la tubuline β , est absolument requise pour l'assemblage des MTs. Son hydrolyse, qui a lieu peu de temps après l'incorporation de l'hétérodimère dans le MT, est nécessaire à la dépolymérisation (Carlier, 1989) et donc à la dynamique des MTs dont nous parlerons plus tard (Hyman *et al.*, 1992). Après l'hydrolyse du GTP, le site E ne pourra pas faire l'objet d'un échange de nucléotides au sein du MT. En effet, cet échange ne peut avoir lieu au site E que si le dimère de tubuline est libre.

La structure atomique de la tubuline a été caractérisée à partir de cristaux de feuillets de tubulines formés en présence d'ions Zn^{2+} et stabilisés par le taxol (Nogales *et al.*, 1998). Ayant été obtenue à partir de feuillets composés de protofilaments, cette structure atomique a fourni des informations capitales concernant la position et l'orientation de chaque sous-unité et a permis de réaliser un modèle de la structure du MT à haute résolution (Nogales *et al.*, 1999). Ce modèle a révélé plusieurs propriétés des MTs, à l'échelle moléculaire, susceptibles d'expliquer certaines de leurs fonctions comme la capacité d'interagir avec les MAPs et les moteurs moléculaires (Nogales, 2000).

Dans la tubuline, les acides aminés impliqués dans l'hydrolyse du GTP sont séparés en deux groupes. Le premier fait partie de la « poche » de liaison du GTP située à l'extrémité amino-terminale de la molécule, alors que le second, qualifié de « synergique », est localisé à l'autre extrémité. Aussi, il a été proposé que la tubuline pourrait constituer son propre GAP (« GTPase-Activating Protein »), stimulant l'hydrolyse du GTP lorsque deux sous-unités entrent en contact. Autrement dit, le contact entre la poche de liaison du GTP du site E d'une sous-unité et les résidus aminoacides synergiques de la sous-unité suivante provoquerait l'hydrolyse du GTP. Cela reste une hypothèse, toutefois l'identification récente de la structure des couples « Ras-RasGAP » et « Rho-RhoGAP » a permis de montrer que le GTP est à l'interface entre la protéine G et la GAP, ce qui corrobore le modèle proposé pour la tubuline (Erickson, 1998; Lu *et al.*, 1998). Par ailleurs, le modèle à haute résolution du MT, obtenu à partir de la structure atomique de la tubuline, semble indiquer que le GTP échangeable de la tubuline β est exposé à l'extrémité (+) du MT, tandis que les résidus synergiques (supposés catalytiques) de la tubuline α sont exposés à l'extrémité (-) (Nogales *et al.*, 1999). Cela tend à montrer que les résidus synergiques de la tubuline α d'un dimère, nouvellement incorporé au bout (+) du MT, pourraient bien entrer en contact avec le GTP de la tubuline β du dimère précédent (et réciproquement pour le bout (-)) (Nogales, 2000).

B. Dynamique des microtubules

1. Assemblage et dynamique des MTs *in vitro*

La polymérisation des dimères de tubuline, *in vitro*, requiert la présence de GTP et une température comprise entre 30°C et 37°C (pour revue : (Valiron *et al.*, 2001)). Il existe deux méthodes permettant de suivre l'assemblage des MTs *in vitro*. Il s'agit de la mesure de la turbidité et de la vidéo-microscopie. En effet, une suspension de MTs est turbide et provoque, de ce fait, une absorption apparente à 350 nm. Cette propriété est communément utilisée pour mesurer la masse totale des MTs assemblés, ce qui donne une idée générale du comportement d'une population de MTs. En revanche, la vidéo-microscopie, en contraste de phase ou en DIC (Differential Interference Contrast), permet de suivre individuellement les MTs.

L'assemblage des MTs, analysé en turbidimétrie, opère suivant 3 phases : la phase de nucléation, la phase d'élongation et la phase stationnaire (Fig. 2). Pendant la phase de nucléation, des grains (ou noyaux) de MTs sont formés. Ces derniers ne donnent naissance à des MTs que si la concentration en tubulines dans le milieu est supérieure à un certain seuil critique, lequel dépend des conditions expérimentales. Au cours de la seconde phase, des dimères de tubulines s'ajoutent aux extrémités des MTs. Lors de la troisième étape, la taille des MTs reste stationnaire, ce qui signifie qu'une certaine proportion de tubulines est assemblée en MTs, tandis qu'une autre reste soluble. La concentration en dimères de tubulines libres, pendant la phase stationnaire, dépend des conditions expérimentales et correspond à la concentration critique dont nous venons de parler.

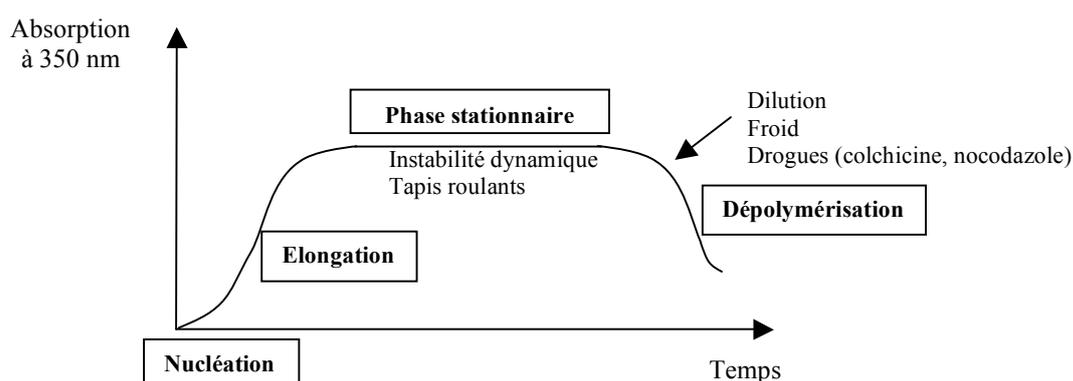


Figure 2 : Assemblage des MTs *in vitro*

Les différentes phases de l'assemblage des MTs telles qu'elles ont été observées en turbidimétrie. D'après (Valiron *et al.*, 2001).

Les MTs se dépolymérisent lors d'une diminution de la température, d'un retrait du GTP ou d'une dilution (c'est-à-dire d'une diminution de la concentration de tubulines libres).

Ce désassemblage des MTs peut également être provoqué par l'ajout de drogues dans la solution de MTs comme la colchicine, la vinblastine ou le nocodazole (et bien d'autres : (Nogales, 2000)). Alors que les deux premières drogues agissent directement sur l'extrémité des MTs en empêchant l'incorporation de nouvelles sous-unités, le nocodazole agit en séquestrant les dimères de tubulines, formant avec ces derniers des complexes inactifs et provoquant ainsi une diminution virtuelle de la concentration en tubulines, en deçà du seuil critique.

En phase stationnaire, les MTs sont en équilibre instable. En effet, l'hydrolyse du GTP (donc la consommation d'énergie) est nécessaire au maintien de cet état stationnaire. Cela signifie probablement que des échanges de dimères de tubulines continuent d'avoir lieu entre les MTs et le milieu, sans que cela change la taille des MTs (nous parlons d'une population de MTs en général et donc d'une taille moyenne des MTs). Deux mécanismes peuvent rendre compte de ce phénomène. Il s'agit du « treadmilling » et de l'instabilité dynamique.

Le « treadmilling » (ou phénomène dit du « tapis roulant ») est fondé sur le fait que les deux extrémités des MTs peuvent se comporter différemment en phase stationnaire. En effet, lors de ce phénomène, alors que le bout (+) incorpore continuellement de nouveaux dimères de tubuline, le bout (-) en perd de façon continue. Un tel comportement asymétrique des MTs requiert la consommation d'énergie et pourrait être dû à une différence entre les concentrations critiques de tubuline nécessaires à la polymérisation aux deux extrémités (Margolis et Wilson, 1978; Margolis et Wilson, 1981) ; (pour revue, (Kirschner et Mitchison, 1986)). Par ailleurs, lorsque les extrémités (-) des MTs ne sont pas ancrées dans une structure fixe, le « treadmilling » conduit au déplacement des MTs. Dans le cas contraire, il se produit un flux de tubulines depuis l'extrémité (+) des MTs vers leur extrémité (-) (Fig.3). Cela dit, le mécanisme qui couple l'hydrolyse du GTP et l'apparition d'une telle asymétrie dans les MTs n'est pas encore connu.

L'existence de MTs de tailles différentes au sein d'une population de MTs en phase stationnaire a conduit les auteurs à proposer le modèle dit de l'instabilité dynamique (Fig. 3 et 4) (Mitchison et Kirschner, 1984a; Mitchison et Kirschner, 1984b). Selon ce modèle, en phase stationnaire, la taille de chaque MT n'est pas maintenue constante. Le MT subit une alternance entre des phases de polymérisation lente et des phases de dépolymérisation rapide. La transition entre une phase de polymérisation lente et une phase de dépolymérisation rapide est nommée : « catastrophe ». La transition opposée est appelée : « sauvetage ». L'instabilité dynamique des MTs a été caractérisée et intensément étudiée par vidéo-microscopie (Horio et Hotani, 1986; Walker *et al.*, 1988). Quatre paramètres décrivent ce phénomène : la vitesse de

polymérisation, la vitesse de dépolymérisation, la fréquence de catastrophe et la fréquence de sauvetage. Il ressort, néanmoins, de ces études que les MTs peuvent parfois adopter, *in vitro*, un temps de pause plus ou moins long pendant lequel leur taille reste vraiment constante (Walker *et al.*, 1988).

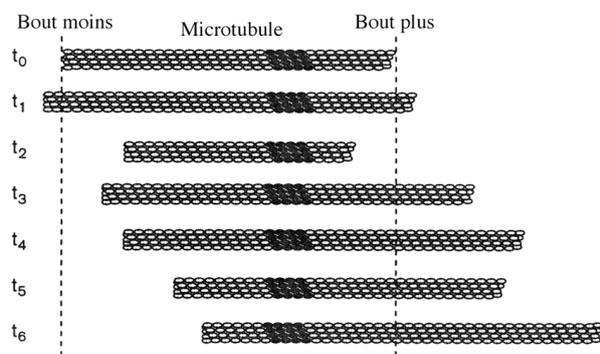


Figure 3 : Illustrations simultanées de l'instabilité dynamique d'un MT et du "treadmilling".

La croissance nette du MT au bout (+) et le raccourcissement net au bout (-) provoquent son évolution par rapport à la zone marquée (tapis roulant).

D'après (Jordan et Wilson, 1998)

Pendant de nombreuses années, les auteurs se sont interrogés sur les mécanismes moléculaires qui permettent aux MTs de subir, de façon stochastique, de telles transitions entre les phases de polymérisation lente et les phases de dépolymérisation rapide. Il est probable que l'énergie provenant de l'hydrolyse du GTP soit utilisée pour déstabiliser la paroi des MTs. En utilisant les données biochimiques publiées par l'équipe de D. Pantaloni (Carlier et Pantaloni, 1981), M. Kirschner et T. Mitchison ont proposé qu'une coiffe de tubulines-GTP pourrait protéger le MT de la dépolymérisation. L'apparition d'une telle « coiffe-GTP » serait due à l'existence d'un délai entre l'incorporation d'un dimère de tubuline dans le MT et l'hydrolyse du GTP (Kirschner et Mitchison, 1986; Mitchison et Kirschner, 1984a). Une diminution du rythme d'incorporation de dimères de tubuline provoquerait donc une diminution de la taille puis une disparition de la « coiffe-GTP » et, de ce fait, une dépolymérisation du MT. Le sauvetage interviendrait dans le cas de la mise en place d'une nouvelle « coiffe-GTP ». Le fait que l'utilisation d'un analogue lentement hydrolysable du GTP augmente la stabilité des MTs est en accord avec ce modèle (Hyman *et al.*, 1992). Cependant, des données plus récentes suggèrent que cette coiffe pourrait être de taille très réduite (Caplow et Shanks, 1996; Drechsel et Kirschner, 1994). Par ailleurs, ce modèle ne décrit pas le mécanisme moléculaire précis par lequel le GTP, et non le GDP, pourrait protéger les MTs de la dépolymérisation.

L'analyse récente de la structure des MTs, en cryo-microscopie électronique, a permis de montrer des différences structurales étonnantes à l'extrémité du MT selon que ce dernier est en cours de polymérisation ou de dépolymérisation (Fig. 4a et b). Au cours de la

polymérisation, l'extrémité du MT apparaît, *in vitro*, sous forme d'un feuillet légèrement courbé qui semble se clore en tube plus en aval dans le MT (Fig. 4a) (Chretien *et al.*, 1995; Simon et Salmon, 1990). Au contraire, les extrémités des protofilaments d'un MT en phase de raccourcissement, semblent perdre leurs contacts latéraux, se boucler et s'éplucher depuis la paroi du MT (Fig. 4d). En effet, l'extrémité des MTs qui se dépolymérisent laisse apparaître, *in vitro*, de petites structures oligomériques « bouclées » (Mandelkow *et al.*, 1991; Simon et Salmon, 1990). Plus récemment, il a été confirmé, dans des conditions physiologiques, que la polymérisation des MTs s'opère par extension d'un feuillet de protofilaments qui se ferme, au fur et à mesure, en un tube (Arnal *et al.*, 2000).

Ces observations structurales ont permis de proposer une évolution du modèle de la coiffe GTP : le modèle de la coiffe structurale. Ce modèle corrèle la fermeture du MT, l'hydrolyse du GTP, la conformation des dimères de tubuline et la courbure des protofilaments (Hyman et Karsenti, 1996). En effet, les dimères de tubuline adoptent des conformations différentes selon la présence, au site E, du GDP ou du GMPCPP, un analogue lentement hydrolysable du GTP (Hyman *et al.*, 1995). Aussi, les auteurs ont proposé que l'hydrolyse du GTP pourrait provoquer un changement de conformation des dimères de tubuline les faisant passer d'une forme rectiligne à une forme courbe (Fig. 4). Partant de cela, il a été suggéré que la fermeture du tube pourrait forcer l'hydrolyse du GTP et provoquer la courbure des protofilaments (observable quand le MT se dépolymérise). Pendant la polymérisation, cette courbure serait contrainte dans la paroi du tube, ce qui constituerait une forme de stockage de l'énergie (tension mécanique). La dépolymérisation surviendrait quand le feuillet terminal se ferme suite à un ralentissement de la polymérisation. Corroborant cette dernière assertion, il a été montré, *in vitro*, que l'augmentation de la vitesse de croissance des MTs est corrélée à leur stabilisation et à l'augmentation de la taille du feuillet terminal (Chretien *et al.*, 1995).

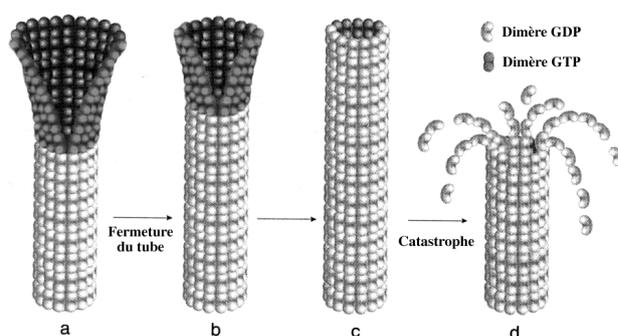


Figure 4 : Modèle de la coiffe structurale de l'instabilité dynamique des MTs.

Le dimère-GTP est rectiligne alors que le dimère-GDP est courbé. (a) : le MT s'allonge et le feuillet terminal contient de la tubuline-GTP. (b) : La fermeture du tube force l'hydrolyse du GTP. (c et d) : Le MT ne contient plus de dimère-GTP, la tension mécanique contrainte dans la structure du MT n'est plus contenue ce qui provoque la dépolymérisation.

D'après (Hyman et Karsenti, 1996).

Une précision concernant ce modèle a été apportée par l'étude de la structure à haute résolution du MT (Nogales *et al.*, 1999). En effet, il semblerait, d'après cette étude, que l'hydrolyse du GTP provoque un changement conformationnel aboutissant à une déstabilisation importante des contacts latéraux entre les tubulines de deux protofilaments voisins. Aussi, l'hydrolyse du GTP des dernières tubulines β , exposées à l'extrémité (+) des MTs, pourrait inhiber suffisamment les interactions latérales entre protofilaments pour permettre la dépolymérisation du MT. En revanche, à l'extrémité (-) des MTs, la tubuline α étant exposée, l'hydrolyse du GTP (site N) ne peut pas avoir lieu et les contacts latéraux devraient être plus stables (Nogales, 2000).

Dans la littérature, il a été longtemps admis que le rythme de nucléation et la vitesse d'élongation des MTs dépendaient directement, à chaque instant, de la concentration en tubulines-GTP libres et suivaient la loi d'action de masse. Toutefois, une étude récente a permis de montrer, d'une part, que la nucléation persiste pendant la phase d'élongation (augmentation constante du nombre de MTs par unité de volume) et, d'autre part, que seules les premières étapes de la nucléation sont étroitement liées à la concentration en tubuline-GTP libres (Caudron *et al.*, 2000). En effet, pour une certaine concentration initiale en tubuline-GTP libre, le rythme de nucléation des MTs reste constant et insensible à la chute de cette concentration pendant la phase d'élongation. Les auteurs ont proposé un modèle selon lequel la formation des noyaux de MTs se ferait à partir d'oligomères précurseurs présents à une certaine concentration, laquelle serait déterminée par la concentration initiale en tubuline-GTP libres (Valiron *et al.*, 2001). De la même façon, il a été montré que la vitesse d'élongation des MTs n'est pas directement sensible à des variations de la concentration en tubuline-GTP libres, pourvu que celle-ci soit supérieure au seuil critique. La vitesse d'élongation dépendrait plutôt de propriétés intrinsèques des MTs, comme la vitesse de fermeture du tube (Valiron *et al.*, 2001). Par ailleurs, en deçà du seuil critique, les MTs se dépolymérisent avec une certaine fréquence de catastrophe qui n'est pas non plus sensible à de fortes variations de la concentration en tubuline-GTP libre. De façon analogue à la nucléation, la fréquence de catastrophe ne semble dépendre directement que de la concentration initiale en tubulines-GTP libres dans le milieu. Cela a conduit les auteurs à proposer l'existence de facteurs structuraux et de régulation, dont la concentration varie en fonction des conditions initiales de l'expérience, qui pourraient déterminer les paramètres de la dynamique des MTs (Caudron *et al.*, 2000).

2. Assemblage et dynamique des MTs *in vivo*

La dynamique des MTs *in vivo* présente les mêmes caractéristiques fondamentales que la dynamique des MTs *in vitro*. En effet, les MTs cytoplasmiques sont très dynamiques et les phénomènes de « treadmilling » et d'instabilité dynamique ont été observés dans certaines cellules. Cependant, la vitesse de polymérisation et les fréquences de transition entre les événements de catastrophe et de sauvetage des MTs cellulaires sont nettement supérieures à celles que l'on a pu mesurer *in vitro* (Cassimeris, 1993). Par exemple, pour une même concentration initiale en tubuline, la vitesse d'assemblage des MTs cellulaires est 5 à 10 fois supérieures à celle des MTs *in vitro*. Cette augmentation importante de la vitesse de polymérisation est due principalement à la contribution des MAPs (« Microtubule Associated Proteins») qui, en se liant aux MTs sur toute leur surface, sont capables de réguler la dynamique des MTs. Par ailleurs, contrairement à ce que l'on observe *in vitro*, l'augmentation de la vitesse de polymérisation est corrélée *in vivo* à une augmentation de la fréquence des événements de catastrophes. Outre le fait que cela complique considérablement le modèle de la coiffe structurale, cela suggère l'existence, dans les cellules, de facteurs de déstabilisation des MTs.

Dans ce paragraphe, avant de décrire brièvement les différentes familles de protéines impliquées dans le contrôle de la dynamique des MTs, nous verrons que la nucléation des MTs, *in vivo*, est généralement initiée par le MTOC (Microtubule Organizing Center) et que les MTs cytoplasmiques subissent des modifications post-traductionnelles dont les conséquences physiologiques semblent être importantes, mais encore matière à débats.

a) Nucléation des MTs *in vivo*

Alors que les MTs s'auto-assemblent *in vitro* au-dessus d'une certaine concentration critique en tubulines et peuvent croître par leurs deux extrémités, la nucléation des MTs, dans les cellules animales, se fait généralement à partir du centrosome (pour revue : (Pereira et Schiebel, 1997)). Le centrosome, ou plus généralement le MTOC, est effectivement capable d'initier et de contrôler la nucléation des MTs *in vivo*. De plus, dans beaucoup de cellules, les bouts (-) des MTs restent majoritairement ancrés dans cette structure tandis que les bouts « + » explorent la périphérie de la cellule. Cela confère au MTOC la propriété de contribuer à la géométrie globale du réseau microtubulaire.

Le centrosome est une structure complexe, composée schématiquement de deux centrioles entourés du matériel péricentriolaire, ce dernier étant responsable de la nucléation des MTs (Bornens, 2002; Gould et Borisy, 1977; Joshi, 1994).

La tubuline γ est une protéine, apparentée aux tubulines α et β , qui se localise préférentiellement au MTOC et qui joue un rôle essentiel dans la nucléation des MTs *in vivo*. En effet, l'inactivation du gène de la tubuline γ provoque l'altération de l'organisation des MTs dans divers organismes (Pereira et Schiebel, 1997). De plus, chez les mammifères, la microinjection d'anticorps dirigés contre la tubuline γ inhibe la nucléation des MTs par le centrosome (Joshi *et al.*, 1992). Par ailleurs, la tubuline γ monomérique est capable de nucléer des MTs *in vitro* (Leguy *et al.*, 2000).

Des études de tomographie par immuno-microscopie électronique ont révélé que de la tubuline γ est contenue dans des structures en forme d'anneau, appelés : γ -TuRC pour « γ -Tubulin-Ring-Complex » (pour revue : (Schiebel, 2000)). Ces structures ont la capacité de nucléer les MTs dans des extraits d'œufs de xénope (Moudjou *et al.*, 1996; Raff *et al.*, 1993; Stearns et Kirschner, 1994; Zheng *et al.*, 1995). L'observation, dans le matériel péricentriolaire, d'anneaux pouvant correspondre aux γ -TuRC a permis de suggérer que ces structures pourraient, *in vivo*, amorcer la nucléation des MTs, imposer le nombre « magique » de 13 protofilaments, et stabiliser le bout (-) des MTs en les coiffant (Pereira et Schiebel, 1997; Zheng *et al.*, 1995). A ce propos, deux modèles très différents ont été longtemps proposés concernant le mécanisme par lequel le γ -TuRC pourrait nucléer les MTs (Erickson et Stoffler, 1996; Zheng *et al.*, 1995). Des travaux récents semblent toutefois confirmer la fonction de « coiffe » du γ -TuRC et préférer le modèle selon lequel le γ -TuRC constituerait une matrice hélicoïdale (correspondant au premier tour de l'hélice) à partir de laquelle le MT serait polymérisé (Keating et Borisy, 2000; Moritz *et al.*, 2000; Wiese et Zheng, 2000).

Dans la plupart des cellules, les MTs se détachent du centrosome continuellement, que ce soit en interphase ou en mitose (Keating et Borisy, 1999). De plus, dans les cellules épithéliales polarisées et les neurones, les MTs libres non centrosomiens prédominent. Par ailleurs, l'assemblage des MTs et l'organisation de ceux-ci en asters ou en fuseau de division peuvent avoir lieu sans contribution des centrosomes (Vorobjev *et al.*, 1997; Yvon et Wadsworth, 1997).

Le mécanisme permettant le détachement des MTs des centrosomes n'est pas encore déterminé. Toutefois, il a été proposé que la katamine pourrait y jouer un rôle déterminant (McNally et Vale, 1993). Cette molécule, qui se localise au centrosome (McNally *et al.*, 1996) et sur les pôles du fuseau de division (McNally *et al.*, 2000), est effectivement capable de sectionner les MTs.

Certains MTs détachés se dépolymérisent à leur extrémité (-) tandis que d'autres restent stables suggérant qu'ils sont « coiffés » d'une ou plusieurs molécules stabilisatrices. Sa présence dans le cytoplasme fait du γ -TuRC un candidat pour une telle fonction stabilisatrice (Moudjou *et al.*, 1996; Tassin *et al.*, 1998). Néanmoins, les auteurs suggèrent l'existence d'autres molécules capables de stabiliser spécifiquement les bouts (-) des MTs (Schroer, 2001).

Les mécanismes qui permettent l'ancrage des MTs au centrosome ou sur d'autres structures sont encore peu connus. Toutefois, la dynactine ainsi que la ninéine (Mogensen *et al.*, 2000) semblent jouer un rôle prépondérant. En effet, la dynactine, dont nous parlerons dans le prochain chapitre, est requise indépendamment de la dynéine cytoplasmique pour maintenir les bouts (-) des MTs focalisés au centrosome (Quintyne *et al.*, 1999).

b) Modifications post-traductionnelles des MTs

Chez la plupart des eucaryotes, les monomères de tubulines subissent diverses sortes de modifications post-traductionnelles très conservées au cours de l'évolution. Ces modifications incluent la détyrosination, l'acétylation, la phosphorylation, la palmitoylation, la polyglutamylatation et la polyglycylation (pour revues : (Luduena, 1998; MacRae, 1997; Rosenbaum, 2000)). Toutes ces modifications, à l'exception de l'acétylation de la tubuline α , ont lieu à l'extrémité carboxy-terminale des tubulines α et β . L'extrémité carboxy-terminale des tubulines est exposée vers l'extérieur de la paroi du MT ce qui facilite très probablement le travail des enzymes de modifications. En revanche, le site d'acétylation est situé sur la surface interne du MT ce qui tend à expliquer la relative lenteur de ce processus si on le compare à la polymérisation du MT. Malgré un nombre croissant de travaux attribuant d'importants rôles biologiques à certaines de ces modifications, le sujet est toujours matière à débats.

Modifications post-traductionnelles et stabilisation des MTs

Pendant de nombreuses années, l'acétylation était considérée comme une modification stabilisant les MTs. En effet, dans les axonèmes des cils (où les MTs sont connus pour être très stables), les monomères de tubuline α sont acétylés sur le résidu lysine 40. Par ailleurs, de nombreux laboratoires ont montré que ces MTs cytoplasmiques acétylés sont les plus stables que nous puissions observer dans de nombreux types cellulaires différents. Cependant, il est maintenant établi que cette stabilité accrue n'est pas due à l'acétylation de la tubuline α (Maruta *et al.*, 1986). Les MTs sont acétylés après leur assemblage et cette modification post-traductionnelle constituerait plutôt un indicateur du temps qui s'est écoulé depuis l'assemblage du MT et qui a permis à l'acétyl-transférase d'agir.

Dans beaucoup de cellules eucaryotes, la tyrosine située à l'extrémité carboxy-terminale de la tubuline α est éliminée post-traductionnellement. Cette modification est réversible et laisse apparaître un glutamate à la nouvelle extrémité carboxy-terminale (d'où le nom de « MT-Glu »). Comme l'acétylation, la détyrosination est détectée sur des MTs plus stables que la moyenne. Cependant, là encore, cette modification est une conséquence plutôt qu'une cause de l'augmentation de la longévité de ces MTs. En effet, l'équipe de G. Borisy a montré, par exemple, que l'injection d'anticorps dirigés contre la tyrosine ligase, dans des cellules de mammifères, ne change pas la stabilité des MTs bien que la tubuline α soit à nouveau tyrosinée (Webster *et al.*, 1990).

Quelques fonctions

Les travaux de l'équipe de G. Gundersen ont permis de montrer, notamment, que la détyrosination des MTs est nécessaire à l'alignement des filaments de vimentine avec les MTs (Gurland et Gundersen, 1995; Kreitzer *et al.*, 1999). Les moteurs de type kinésine sont connus, depuis longtemps, pour être nécessaires à ce co-alignement des MTs-Glu avec les filaments intermédiaires (Gurland et Gundersen, 1995; Gyoeva et Gelfand, 1991). Venant préciser et confirmer ces données, il a été montré que les kinésines ont une plus grande affinité pour les MTs détyrosinés (Kreitzer *et al.*, 1999).

Tetrahymena est un protozoaire cilié dont les monomères de tubulines α et β sont polyglycylés à leur domaine carboxy-terminal. Récemment, il a été montré qu'un certain niveau de glycylation est nécessaire à la survie de cet organisme. Par ailleurs, la

polyglycylation de la tubuline β semble requise pour le bon fonctionnement de la dynéine, le moteur moléculaire à l'origine du battement des cils (Xia *et al.*, 2000).

L'injection, dans des cellules HeLa, d'anticorps dirigés contre les isoformes de tubulines polyglutamylées provoque une spectaculaire disparition des centrioles, organelles connues pour contenir les structures microtubulaires les plus stables de la cellule (Bobinnec *et al.*, 1998). Par ailleurs, ce même anticorps est capable d'interférer avec la motilité des axonèmes flagellaires, probablement en réduisant la capacité de la dynéine d'interagir avec certains MTs (Gagnon *et al.*, 1996).

Cette modulation de l'affinité des moteurs moléculaires pour les MTs, par certaines modifications post-traductionnelles, a probablement des implications dans d'autres processus biologiques qui nécessitent un remaniement du réseau de MTs comme la migration cellulaire et la mitose.

c) **Protéines stabilisant les MTs *in vivo***

Dans ce paragraphe, nous présentons, brièvement et à titre d'exemple, des MAPs connues pour stabiliser les MTs en affectant au moins l'un des 4 paramètres qui caractérisent l'instabilité dynamique dont nous avons parlé plus tôt (pour revues : (Hirokawa, 1994; Valiron *et al.*, 2001).

Chez les mammifères, de nombreuses MAPs promeuvent l'assemblage et stabilisent des MTs en réduisant la fréquence de catastrophe. Parmi les membres de cette famille, tau et MAP2 sont des protéines spécifiques du cerveau qui se localisent préférentiellement dans l'axone et les dendrites, respectivement, tandis que MAP4 est présente dans toutes les cellules non neuronales. Ces trois MAPs contiennent un domaine de liaison aux MTs situés dans la région carboxy-terminale et, généralement, leur phosphorylation provoque leur détachement des MTs (Exemples des MT-Affinity-Regulating Kinases (MARKs) (Drewes *et al.*, 1998)).

Dans plusieurs types cellulaires, des MTs sont résistants à de très longues expositions au froid. Cette grande stabilité vis-à-vis du froid est due essentiellement à l'association de la protéine STOP avec les MTs (pour revue : (Bosc *et al.*, 1999)). Il existe différents variants de cette MAP, générés par épissage alternatif à partir d'un unique gène. L'expression de ces différentes isoformes varie en fonction du type cellulaire et de l'étape du développement

embryonnaire considérée. Tous les variants sont capables d'interagir avec les MTs et la calmoduline. La protéine STOP semble jouer un rôle important dans les neurones puisqu'elle est presque en permanence associée aux MTs, qu'elle constitue le principal facteur responsable de la réduction du taux de renouvellement des MTs dans ces cellules et qu'elle est nécessaire à la formation des neurites (Guillaud *et al.*, 1998). En revanche, dans les cellules prolifératives, STOP n'interagit que très faiblement avec les MTs et ne semble pas affecter la dynamique de ces derniers (Denarier *et al.*, 1998). Toutefois, elle est détectée très nettement sur les MTs du fuseau mitotique, à température physiologique comme dans le froid, ce qui indique un rôle probable de cette protéine dans le remaniement du réseau de MTs à l'entrée en mitose. Récemment, des souris invalidées pour le gène *STOP* ont été produites (Andrieux *et al.*, 2002). En dépit de l'absence de défauts anatomiques majeurs dans le cerveau, ces souris présentent des dysfonctionnements synaptiques (plasticité altérée) et des troubles comportementaux importants.

D'autres MAPs ont été purifiées à partir d'extrait d'œufs de xénope, en voici une rapide description :

- XMAP230 supprime les événements de catastrophes et stimule modérément la vitesse de polymérisation de la tubuline. Cette MAP se lie aux MTs en interphase, mais s'y dissocie au début de la prophase pour finalement s'associer aux MTs du fuseau mitotique en métaphase et en anaphase (Andersen *et al.*, 1994).
- XMAP210 augmente considérablement la vitesse de polymérisation sans empêcher les événements de catastrophe (Gard et Kirschner, 1987; Vasquez *et al.*, 1994). Son activité reste inchangée au cours du cycle cellulaire.
- XMAP310 augmente la fréquence de sauvetage des MTs, mais elle ne s'associe aux MTs qu'après la rupture de l'enveloppe nucléaire (Andersen et Karsenti, 1997).
- XMAP215 augmente considérablement la vitesse de polymérisation (Vasquez *et al.*, 1994). De même que son orthologue humain TOGp (Charrasse *et al.*, 1998), XMAP215 joue un rôle déterminant dans l'assemblage du fuseau de division. Il est intéressant de noter que TOGp se lie préférentiellement aux extrémités (+) des MTs mais ne s'y limite pas contrairement à la CLIP-170 (Cf. paragraphe I.B.e) et chapitre IV). Bien que nous ne connaissions pas encore le mode d'action de XMAP215, une étude récente suggère que cette MAP pourrait contrebalancer l'activité de la kinésine XKCM1 (Cf. paragraphe suivant) (Tournebize *et al.*, 2000).

Plus récemment, des protéines capables d'interagir physiquement avec les MTs, les microfilaments d'actine et les filaments intermédiaires ont été identifiées. Les mieux caractérisées sont certainement les plakins (pour revues : (Fuchs et Karakesisoglou, 2001; Fuchs et Yang, 1999; Ruhrberg et Watt, 1997)). Des sites de liaison aux MTs ont été identifiés dans plusieurs protéines de cette famille comme BPAG1n3, une des formes de BPAG1 (Bullus Pemphigoid Antigen-1 Proteins 1) (Leung *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999). Dans des cellules transfectées, BPAG1 se lie et stabilise les MTs, rendant ceux-ci résistant à certains facteurs de dépolymérisation comme le froid. La délétion du gène *BPAG1* chez la souris provoque une dégénérescence des neurones du système nerveux périphérique, corrélée à une désorganisation des filaments intermédiaires et des MTs. Cette désorganisation du cytosquelette est associée à des défauts dans la formation des axones (Fuchs et Karakesisoglou, 2001). Par ailleurs, MACF (Microtubule Actin Cross-linking Factor), contenant un domaine de type plakin très semblable à celui de BPAG1, est connue pour interagir et stabiliser les MTs *via* son domaine carboxy-terminal. Dans des cellules transfectées, MACF interagit à la fois avec les MTs et l'actine. En outre, des mutations dans kakapo, son orthologue chez la drosophile, provoque une désorganisation des MTs dans divers types cellulaires comme certains neurones sensoriels.

Nous décrirons, dans le chapitre III, la protéine LIS1 dont certaines mutations sont à l'origine d'une malformation du cerveau humain appelée lissencéphalie. Cette protéine est une MAP capable de réduire la fréquence de catastrophe et d'augmenter la taille maximale pouvant être atteinte par les MTs *in vitro*.

d) Protéines déstabilisant les MTs *in vivo*

Principalement deux protéines capables de déstabiliser les MTs, *in vitro et in vivo*, ont été caractérisées. Il s'agit d'Op18/stathmine, une oncoprotéine, et de XKCM1, un moteur moléculaire de type kinésine de la famille KinI.

OP18/stathmine

Op18/stathmine est une petite protéine de 149 résidus aminoacides, très conservée parmi les vertébrés, et dont le taux d'expression est particulièrement élevé dans bon nombre de cellules cancéreuses (pour revue, (Cassimeris, 2002)). La concentration intracellulaire de

cette protéine varie en fonction du type cellulaire. En effet, elle est fortement exprimée dans les neurones et les cellules prolifératives, mais son expression est considérablement réduite dans les cellules différenciées. Le mécanisme d'action de la protéine Op18/stathmine est encore matière à débats. En effet, *in vitro*, cette protéine est capable, selon le pH du milieu, de séquestrer les dimères de tubulines ou d'agir directement sur les MTs en augmentant la fréquence de catastrophe (Belmont et Mitchison, 1996; Curmi *et al.*, 1997; Howell *et al.*, 1999b). Cela étant, un certain nombre d'expériences tendent à montrer qu'Op18/stathmine ne séquestrerait pas les dimères de tubulines *in vivo* (Howell *et al.*, 1999a; Larsson *et al.*, 1999).

Nous ne connaissons pas encore le mécanisme précis par lequel Op18/stathmine déstabilise directement les MTs, d'autant que peu ou pas d'Op18/stathmine co-sédimentent avec ces derniers (Belmont et Mitchison, 1996; Kuntziger *et al.*, 2001). Néanmoins, la protéine SCG10, apparentée à Op18/stathmine et spécifique des neurones, se co-purifie avec les MTs, ce qui indique qu'au moins l'un des membres de la famille peut reconnaître et se lier aux dimères de tubuline au sein de la paroi des MTs (Riederer *et al.*, 1997). De plus, Op18/stathmine ne dépolymérise pas les MTs lorsque ceux-ci ont une coiffe de tubulines associées au GMPCPP, un analogue lentement hydrolysable du GTP (Howell *et al.*, 1999b). Cela indique que le mécanisme d'action d'Op18/stathmine requiert l'hydrolyse du GTP. Plus récemment, la cristallographie de la tubuline GDP associée à RB3, une protéine apparentée à Op18/stathmine, a conduit les auteurs à suggérer un modèle selon lequel Op18/stathmine pourrait faciliter « l'épluchage » des protofilaments de tubulines (Gigant *et al.*, 2000)

Op18/stathmine est phosphorylée en réponse à de nombreux signaux incluant ceux qui stimulent la prolifération et la différenciation cellulaires (pour la liste des kinases connues, voir (Cassimeris, 2002)). Ces phosphorylations concernent 4 sérines (il existe toute une combinatoire de la phosphorylation de ces sérines) et conduisent à une inhibition plus ou moins importante de l'activité destabilisatrice de cette protéine. La phosphorylation des 4 résidus sérines est requise à la transition G2/M (entrée en mitose). Ces phosphorylations ont lieu séquentiellement ; tout d'abord les sérines 25 et 38 sont phosphorylées par CDK1 (p34^{cdc2}), puis les sérines 16 et 63 sont phosphorylées par une (ou des) kinase(s) indéterminées (voir I.C.1. pour une kinase candidate possible). L'expression de protéines Op18/stathmine mutantes, dont la phosphorylation est empêchée, provoque des défauts sévères dans l'assemblage du fuseau mitotique. De plus, des études récentes montrent qu'une activité kinase, impliquant notamment la « polo-like kinase » Plx1, associée à la chromatine, est capable d'hyperphosphoryler localement Op18/stathmine (Andersen *et al.*, 1997; Budde *et al.*, 2001). Cela suggère qu'Op18/stathmine pourrait être complètement inactivée à proximité

de la chromatine. Les auteurs ont proposé que cette inactivation locale d'Op18/stathmine pourrait contribuer à la formation du fuseau de division en facilitant l'assemblage des MTs au voisinage des chromosomes (voir aussi le paragraphe I.C.2.).

XKCM1 (la famille KinI)

Une seconde protéine déstabilisatrice a été isolée à partir d'extrait d'œufs de xénope. Il s'agit de XKCM1, un membre de la superfamille des kinésines (pour revue : (Walczak, 2000)). L'élimination d'XKCM1, par immuno-épuisement, dans un extrait d'œufs de xénope a permis de montrer que cette protéine est un facteur majeur de catastrophe dans ce système (Walczak *et al.*, 1996). De plus, une perte de fonction de XKCM1, dans un extrait d'œufs de xénope, inhibe la formation du fuseau de division et provoque l'apparition de larges asters de MTs. En outre, la protéine XKCM1 purifiée est capable de produire un événement de catastrophe sur un MT en cours de polymérisation *in vitro* (Desai *et al.*, 1999). Par ailleurs, XKIF2, un homologue de XKCM1, est aussi capable de déstabiliser les MTs, suggérant que, parmi les membres de la famille de kinésines KinI, il pourrait exister un certain nombre de facteurs de déstabilisation.

XKCM1 ne fonctionne pas comme un moteur moléculaire conventionnel. En effet, la déstabilisation, *in vitro*, des MTs par XKCM1 ne requiert pas de mécanisme de motilité (Desai *et al.*, 1999). Contrairement à Op18/stathmine, XKCM1 peut dépolymériser les MTs qui ont été au préalable polymérisés en présence de GMPCPP. Il peut s'associer aux deux extrémités des MTs et sa liaison est suffisante pour induire un changement de conformation de la paroi des MTs, qui résulte en « l'épluchage » de ces derniers. Ce changement de conformation mime celui provoqué par l'hydrolyse du GTP et induit la libération d'un grand nombre de dimères de tubuline et un petit nombre de complexes XKCM1/dimères. Cela montre que XKCM1 a la capacité de se lier aussi avec les dimères de tubuline libres. Par ailleurs, l'hydrolyse de l'ATP est nécessaire au recyclage de XKCM1 pour un nouvel événement de dépolymérisation. De plus, il a été montré que XKIF2 ne peut pas interagir avec les dimères de tubulines en présence d'ATP, ce qui laisse supposer que le mode d'action de XKCM1 et des kinésines apparentées est catalytique.

Sachant que l'activité d'Op18/stathmine est globalement inhibée en mitose, XKCM1 apparaît comme le facteur prépondérant de l'augmentation de la fréquence de catastrophe au cours de la division cellulaire (Belmont et Mitchison, 1996; Tournebize *et al.*, 2000). Cela dit, l'augmentation de la dynamique des MTs en mitose n'est probablement pas due à

l'augmentation de l'activité de XKCM1, mais plutôt à l'inhibition des MAPs par phosphorylation. A ce propos, il a été montré récemment, dans un extrait d'œufs de xénope, que l'activité de XKCM1 en interphase est contrebalancée par celle de XMAP215 (Tournebize *et al.*, 2000). Cela suggère fortement que la dynamique des MTs, au moins dans les extraits d'œufs de xénope, pourrait être régulée, au cours du cycle cellulaire, par une balance entre facteurs de stabilisation et facteurs de déstabilisation.

D'autres protéines comme la protéine Rev du virus HIV1, les protéines « heat-shock » HSP27, HSP70 et HSP90 et la protéine MINUS sont capables respectivement de dépolymériser, d'empêcher la formation et d'inhiber la nucléation des MTs. Toutefois, ces résultats sont controversés et, pour la plupart, collectés *in vitro* (pour revue : (Valiron *et al.*, 2001)).

e) Les « + End Tracking Proteins » ou +TIPs

Une autre catégorie de protéines, dont la principale caractéristique est de se localiser aux bouts (+) des MTs en cours de polymérisation, semble jouer un rôle important dans le contrôle de la dynamique des MTs. Il s'agit des +TIPs pour « + End Tracking Proteins » qui regroupent diverses sortes de protéines comme certaines CLIPs (CYtoplasmic Linker Proteins, voir chapitre IV), des oncoprotéines, la dynéine cytoplasmique et, son co-facteur, la dynactine (voir chapitre II) (pour revues : (Sawin, 2000; Schroer, 2001; Schuyler et Pellman, 2001a)). Certaines données expérimentales suggèrent que les +TIPs pourraient se co-polymériser avec les dimères de tubuline, aux bouts (+) des MTs, où elles resteraient un court moment avant de se détacher. Cette sorte de « treadmilling » permettrait la formation de courts segments de +TIPs à l'extrémité des (+) des MTs, exclusivement pendant la phase de polymérisation (Diamantopoulos *et al.*, 1999; Perez *et al.*, 1999).

Les +TIPs possèdent d'autres fonctions étroitement liées aux mécanismes de polarisation du réseau microtubulaire. En effet, des travaux récents suggèrent fortement que les +TIPs pourraient, en contrôlant localement la polymérisation des MTs, guider ceux-ci vers des régions spécialisées du cortex cellulaire. De plus, certaines +TIPs semblent posséder la capacité d'établir des liens physiques entre les MTs et des structures cellulaires bien précises comme le cortex et le kinétochore. Ces fonctions devraient contribuer à certains processus cellulaires nécessitant une polarisation très élaborée du cytosquelette, comme la mitose (assemblage et orientation du fuseau de division et ségrégation des chromosomes) et la

migration cellulaire. Par ailleurs, compte tenu de leur localisation aux bouts (+) des MTs, les +TIPs pourraient participer au chargement de vésicules membranaires (ou d'autres cargos) afin de procéder à leur transport depuis la périphérie des cellules vers le centre. Nous allons discuter, dans la suite de l'introduction, de ces différentes fonctions. A ce propos, un des grands défis actuels de la recherche, dans ce domaine, consiste à élucider les mécanismes permettant de coordonner, dans le temps et dans l'espace, toutes les fonctions des différentes +TIPs.

Les CLIPs (Cf. chapitre IV)

Le prototype des +TIPs est la CLIP-170 (Diamantopoulos *et al.*, 1999; Perez *et al.*, 1999), une protéine capable d'établir, *in vitro*, un lien statique entre les vésicules d'endocytose et les MTs (Pierre *et al.*, 1992), et qui joue un rôle déterminant dans l'établissement de la plaque métaphasique au cours de la mitose (Dujardin *et al.*, 1998). Comme nous le verrons dans le chapitre IV, les CLIPs (la CLIP-170 et les protéines apparentées) sont impliquées dans le contrôle de la dynamique des MTs (Brunner et Nurse, 2000; Komarova *et al.*, 2002) et de la polarisation du cytosquelette des cellules qui s'apprêtent à migrer ou qui se divisent.

Le couple EB1/APC

La famille EB1 est un groupe de protéines très conservées qui se localisent sur le centrosome, le fuseau de division et les bouts (+) des MTs cytoplasmiques (pour revue : (Tirnauer et Bierer, 2000)). EB1, le membre fondateur de cette famille, se localise également sur les bouts (+) des MTs du fuseau de division, à proximité des kinétochores (Juwana *et al.*, 1999). Plus généralement, EB1 s'associe préférentiellement aux bouts (+) des MTs dynamiques et n'est que très rarement détecté sur les bouts (+) des MTs détyrosinés (Infante *et al.*, 2000). Par ailleurs, il a été démontré par vidéo-microscopie qu'EB1, ainsi que d'autres membres de sa famille (EBF3 et RP1), n'interagit avec les bouts (+) des MTs qu'en phase de polymérisation, ce qui indique qu'EB1 est une +TIP au même titre que la CLIP-170 (Bu et Su, 2001; Mimori-Kiyosue *et al.*, 2000b).

EB1 est une protéine de 35 kDa identifiée, lors d'une expérience de double hybride, comme un partenaire d'APC (Adenomatus Polyposis Coli), un onco-suppresseur dont certaines mutations sont impliquées dans les phases précoces de nombreux cancers du côlon

(Su *et al.*, 1995) (et pour revue : (Mimori-Kiyosue et Tsukita, 2001)). Cette interaction permet à EB1 de recruter APC sur les bouts (+) des MTs, ce qui fait de cette dernière une autre +TIP (Askham *et al.*, 2000; Berrueta *et al.*, 1998; Morrison *et al.*, 1998). De plus, dans les cellules épithéliales A6 de xénope, ce suppresseur de tumeur est capable de se mouvoir le long des MTs pour s'accumuler, sous forme de granules, aux bouts (+) en cours de polymérisation et de s'y détacher lorsque la dépolymérisation est amorcée (Mimori-Kiyosue *et al.*, 2000a). Par ailleurs, l'interaction entre EB1 et APC est inhibée en mitose, vraisemblablement par la phosphorylation de cette dernière (Askham *et al.*, 2000; Mimori-Kiyosue *et al.*, 2000b). En conséquence, APC est globalement délocalisé des MTs pendant la mitose, alors qu'EB1 reste associé aux bouts (+).

Les premières données expérimentales indiquant qu'EB1 joue un rôle dans le contrôle de la dynamique des MTs proviennent d'études réalisées sur la levure bourgeonnante (Adames et Cooper, 2000; Tirnauer *et al.*, 1999). En effet, la délétion du gène codant Bim1p, l'orthologue d'EB1 chez *Saccharomyces cerevisiae*, provoque l'apparition de MTs plus courts qui se dépolymérisent plus lentement, qui subissent nettement moins de transitions entre les phases de polymérisation et dépolymérisation (et réciproquement) et qui adoptent des temps de pause plus long que chez la levure sauvage. En somme, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* sauvage, Bim1p augmente les fréquences de catastrophe et de sauvetage ainsi que le temps passé en phase de polymérisation, ce qui permet l'apparition de MTs, non seulement, plus long, mais aussi, plus dynamiques que chez la levure *Bim1Δ*. Ces fonctions semblent être conservées, au moins partiellement, chez les eucaryotes supérieurs puisque qu'une forte diminution du taux d'EB1, dans des cellules S2 de drosophile, réduit considérablement la dynamique des MTs (Rogers *et al.*, 2002). De plus, M. Nakamura et ses collègues ont montré qu'EB1 stimule la polymérisation des MTs, de façon APC dépendante, *in vitro* et sur des cellules NIH3T3 perméabilisées (Nakamura *et al.*, 2001). Ils ont montré aussi que la phosphorylation, qui empêche l'association d'EB1 avec APC en mitose, inhibe cette activité stimulatrice de la polymérisation des MTs que possède ce couple de protéines (Munemitsu *et al.*, 1994; Nakamura *et al.*, 2001). Aussi, APC et EB1 pourraient agir de concert dans le contrôle de la dynamique des MTs. A cet égard, les auteurs ont proposé un modèle selon lequel EB1 pourrait permettre à l'onco-suppresseur APC de réguler la dynamique des MTs en le recrutant sur les bouts (+).

Comme nous le verrons par la suite, APC et EB1 semblent aussi participer à l'établissement d'un lien physique entre les bouts (+) des MTs et, non seulement, le cortex

cellulaire (Nathke *et al.*, 1996), mais aussi, le kinétochore (Fodde *et al.*, 2001; Kaplan *et al.*, 2001). Cela suggère fortement leur implication dans la migration des cellules et la mitose.

La dynéine cytoplasmique et son co-facteur, la dynactine (Cf. chapitre II)

La dynéine cytoplasmique et la dynactine, son principal co-facteur, se localisent également aux bouts (+) des MTs polymérisant (Vaughan *et al.*, 1999; Vaughan *et al.*, 2002). Là encore, la preuve de l'implication du complexe dynéine/dynactine dans le contrôle de la dynamique des MTs provient principalement de l'étude des protéines orthologues chez des eucaryotes simples. En effet, chez *Aspergillus nidulans*, la dynéine cytoplasmique et la dynactine se localisent sur les bouts (+) des MTs en cours de polymérisation. Une mutation dans le gène codant pour l'orthologue de la DHC, la sous-unité motrice de la dynéine cytoplasmique chez ce champignon filamenteux, provoque une baisse des fréquences de catastrophe et de sauvetage ainsi qu'une diminution de la vitesse de dépolymérisation (Han *et al.*, 2001). De plus, chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'inactivation du gène codant pour l'orthologue d'Arp1, une sous-unité de la dynactine, perturbe la dynamique des MTs de façon différente selon l'étape du cycle cellulaire considérée. Par exemple, la longueur des MTs et les vitesses de polymérisation et de dépolymérisation sont anormalement élevées, à la transition G2/M, chez ces levures mutées (Adames et Cooper, 2000).

Comme nous le verrons par la suite, des travaux récents montrent que la dynéine cytoplasmique pourrait participer à certains processus cellulaires, comme la division et la migration des cellules, en interagissant, d'une part, avec le cortex cellulaire et d'autre part avec les bouts (+) des MTs par l'intermédiaire de la dynactine. Ces interactions permettraient à ce volumineux moteur moléculaire, ancré au cortex, d'exercer une force de traction sur les MTs contribuant, par exemple, au positionnement du fuseau de division en métaphase (Busson *et al.*, 1998) et à la réorientation du MTOC dans les cellules s'appêtant à migrer (Etienne-Manneville et Hall, 2001; Palazzo *et al.*, 2001a).

Les différentes +TIPs ne se localisent certainement pas de façon indépendante et isolées sur les bouts (+) des MTs. En effet, outre son interaction avec APC, EB1 peut aussi interagir avec la dynactine et la dynéine cytoplasmique (Berrueta *et al.*, 1999). Nous verrons, et c'est l'un des objets de cette thèse, que la CLIP-170 n'est probablement pas non plus sans partenaire sur les bouts (+) des MTs.

C. Dynamique des microtubules, remodelage du réseau microtubulaire et polarisation cellulaire

L'établissement et le maintien de la polarité cellulaire sont des propriétés essentielles des cellules eucaryotes. Le cytosquelette joue un rôle déterminant dans les mécanismes de polarisation cellulaire, associés à des processus aussi variés que la migration des neurones pendant le développement embryonnaire, l'établissement de la polarité apicobasolatérale des cellules épithéliales et l'orientation du fuseau de division avant le déclenchement de l'anaphase. Nous allons décrire succinctement, dans ce paragraphe, deux processus cellulaires qui illustrent l'implication des MTs dans les mécanismes de polarisation cellulaire. Il s'agit de la migration des cellules chez les mammifères et de la division cellulaire (orientation du fuseau de division et mouvements des chromosomes). A travers ces deux exemples, nous montrerons brièvement de quelles façons le cytosquelette d'actine et le réseau microtubulaire se polarisent, nous évoquerons les mécanismes moléculaires qui contrôlent cette polarisation (les petites GTPases Rho et leurs effecteurs etc...) et nous présenterons des données récentes relatives aux dispositifs permettant le guidage de l'assemblage des MTs et l'ancrage de ces derniers dans certaines structures cellulaires comme le cortex et les kinétochores. A ce propos, nous verrons, dans ce paragraphe et dans les chapitres suivants, que les +TIPs jouent un rôle important dans la polarisation du réseau microtubulaire au cours de la migration des cellules et de la mitose.

1. La migration cellulaire

Chez les métazoaires, de nombreux types de cellules comme les fibroblastes et les cellules épithéliales peuvent se polariser, spontanément ou sous l'action d'un stimulus extérieur, pour migrer dans une direction bien précise (pour revue : (Wittmann et Waterman-Storer, 2001)). Cette capacité est essentielle au fonctionnement des cellules dans leur environnement naturel. Par exemple, une blessure dans une mono-couche de cellules épithéliales induit la migration de ces dernières, ce qui permet la « réparation » de l'épithélium. La migration des fibroblastes permet, quant à elle, le remodelage de certains tissus, notamment au cours du développement embryonnaire. Par ailleurs, le développement du système nerveux central, chez les vertébrés, requiert différents types de migration cellulaires orchestrés très précisément dans le temps et dans l'espace. Un dysfonctionnement

au cours d'un de ces processus de migration peut provoquer de graves malformations du cerveau, comme la lissencéphalie, dont nous parlerons plus tard (voir chapitre III).

a) Rôle des petites GTPases Rho

Chez les vertébrés, les cellules en migration adoptent, *in vitro*, une morphologie typique caractérisée notamment par une sorte de large lamelle plate se déployant dans le sens de la migration et qui se termine par un lamellipode très dynamique, correspondant à ce que l'on nomme dans la littérature : « the leading edge ». Le cytosquelette d'actine contribue à cette morphogénèse cellulaire et fournit la force de contraction nécessaire au déplacement des cellules (Wittmann et Waterman-Storer, 2001). La polymérisation et l'organisation de l'actine sont contrôlées par les petites GTPases (Guanosine Triphosphatases) de la famille Rho, apparentées à la GTPase Ras (pour revue : (Hall, 1998)). Ces petites « protéines G » sont capables de lier et d'hydrolyser une molécule de GTP. Elles sont actives lorsqu'elles sont liées au GTP et inactives lorsqu'elles sont liées au GDP. Parmi les membres de cette famille, RhoA, Rac1 et Cdc42 semblent jouer un rôle prépondérant au cours de la migration cellulaire chez les mammifères. En effet, chez les fibroblastes 3T3, RhoA contrôle l'assemblage des filaments contractiles d'actine-myosine (appelées aussi : fibres de stress) et des complexes focaux d'adhésion ; Rac1 participe à l'assemblage et l'organisation du réseau de microfilaments d'actine responsables de la formation du lamellipode ; et Cdc42 est impliqué dans la formation de protrusions cellulaires riches en actine, appelées les filopodes. Il est intéressant de noter que, de façon analogue à RhoA, les modifications du cytosquelette d'actine, induites par Rac1 et Cdc42, sont également associées à la formation de petits complexes d'adhérence dans les fibroblastes 3T3 morphologiquement différents des premiers, mais dépendant également des intégrines. Par ailleurs, il existe un contrôle réciproque des petites GTPases entre elles. En effet, Ras et Cdc42 peuvent activer séparément Rac1 et cette dernière peut activer RhoA. Cela suggère fortement que les GTPases Rho constituent un relais entre les récepteurs membranaires et, notamment, l'organisation du cytosquelette d'actine.

Bien que les fonctions des GTPases Rho aient été davantage étudiées dans les fibroblastes, un nombre croissant de publications suggèrent que ces protéines ont des fonctions similaires dans toutes les cellules eucaryotes. Par exemple, l'extension de l'axone chez les neurones est conduite par la polymérisation de l'actine, dans le cône de croissance, contrôlée par les petites GTPases Rho. Le cône de croissance est une structure dynamique, située à l'extrémité de l'axone, qui consiste en de nombreuses protrusions, donnant naissance

à des filopodes et à des lamellipodes, guidés par des signaux externes (attractifs et répulsifs). L'activation de Rac1 et de Cdc42 dans des cellules neuronales NIE-115 (lignée issue d'un neuroblastome) induit la formation, respectivement, de lamellipodes et de filopodes le long du neurite en extension. En revanche, l'expression de mutants de Rac1 et de Cdc42 de type « dominant négatif », dans ces mêmes cellules neuronales, bloque la formation de toutes structures protrusives (Kozma *et al.*, 1997). Néanmoins, il existe certaines différences dans les réponses induites par l'activation des petites GTPases Rho selon le type cellulaire concerné. Par exemple, chez les neurones, l'activation de RhoA provoque, certes, la formation de fibres de stress, mais n'induit pas la formation de points focaux d'adhérence (Katoh *et al.*, 1996; Kozma *et al.*, 1997; Postma *et al.*, 1996; Tigyí *et al.*, 1996), comme dans le cas des macrophages (Aepfelbacher *et al.*, 1996; Allen *et al.*, 1997). Par ailleurs, les petites GTPases Rho sont impliquées dans de nombreuses autres fonctions cellulaires que le contrôle de la polymérisation et de l'organisation de l'actine et la formation de complexes focaux d'adhérence. A titre d'exemples, RhoA, Rac1 et Cdc42 sont requis pour l'assemblage de jonctions d'adhérence entre cellules épithéliales (pour revue : (Fukata *et al.*, 1999b)) et sont connus pour réguler, indirectement, la transcription de certains gènes dont le rôle est de participer au contrôle du cycle cellulaire comme la cycline D (Hill *et al.*, 1995; Westwick *et al.*, 1997).

L'activité des petites GTPases est contrôlée en amont par les GEFs (GTPase Exchange Factors) qui assurent le remplacement du GDP par le GTP, les GDIs (GDP Dissociation Inhibitors) qui inhibent la dissociation du GDP et par les GAPs (GTPase Activating Proteins) qui facilitent l'hydrolyse du GTP. Ces trois types de facteurs de régulation assurent le contrôle spatial et temporel de l'activité des petites GTPases Rho. Par exemple, les GEFs sont très probablement impliquées dans l'activation des petites GTPases Rho spécifiquement à certains sites de la membrane plasmique. Cela dit, il existe une grande variabilité de la localisation des petites GTPases Rho selon le type cellulaire. Chez les fibroblastes 3T3 et les cellules neuronales NIE-115, la localisation des petites GTPases Rho alternent entre le cytosol et plusieurs domaines membranaires selon la présence de certains facteurs dans le milieu de culture. Chez les cellules épithéliales, Rac1 et Cdc42 se co-localisent généralement, avec la E-cadhérine, au niveau des zones d'adhérence, tandis que RhoA est principalement localisée dans le cytosol. En outre, la localisation probable de certains GEFs sur les zones d'adhérence suggère une activation spécifique des petites GTPases Rho au niveau des zones de contact entre cellules (Fukata *et al.*, 1999b). Il est important de noter que l'ensemble des localisations

des formes actives des petites GTPases Rho semble cohérent avec les fonctions respectives de ces dernières vis-à-vis du cytosquelette d'actine que nous avons décrites plus haut (formation des fibres de stress des filopodes et du lamellipode). Par ailleurs, ce contrôle spatio-temporel très élaboré de l'activité des petites GTPases Rho pourrait établir un gradient de protéines Rac1, Cdc42 et RhoA actives dans les cellules et permettre, ainsi, la polarisation du cytosquelette d'actine et l'établissement d'un gradient de contraction nécessaire à la migration des fibroblastes (modèle décrit dans : (Fukata et Kaibuchi, 2001)).

Les petites GTPases Rho exercent leurs fonctions par l'intermédiaire de leurs effecteurs respectifs dont l'activité est régulée localement (pour revues : (Hall, 1998; Van Aelst et D'Souza-Schorey, 1997)). Ces effecteurs sont nombreux (une vingtaine d'effecteurs répertoriés) et vont, par exemple, de la kinase « sérine/thréonine » p160ROCK, un effecteur de RhoA impliqué dans le contrôle de l'assemblage des microfilaments d'actine, à IQGAP1, un effecteur de Rac1 et de Cdc42 capable d'interagir directement avec les microfilaments d'actine et de favoriser leur interaction croisée (Bashour *et al.*, 1997; Fukata *et al.*, 1997; Hart *et al.*, 1996; Kuroda *et al.*, 1998). La protéine IQGAP1 s'accumule préférentiellement au cortex des lamellipodes (Hart *et al.*, 1996; Kuroda *et al.*, 1996). Parallèlement, elle interagit directement avec la E-cadhérine et la β -caténine et se localise sur les sites de contact « cellule-cellule » (*zonula adherens*) (Kuroda *et al.*, 1998). Elle peut réguler négativement l'adhérence entre cellule en agissant sur le complexe E-cadhérine- β -caténine- α -caténine (Kuroda *et al.*, 1998). En effet, en interagissant avec la β -caténine, IQGAP1 provoque la dissociation de l' α -caténine (donc de l'actine) du complexe E-cadhérine- β -caténine membranaire. Par ailleurs, les petites GTPases Cdc42 et Rac1 activées régulent positivement l'adhérence entre cellule en inhibant l'interaction entre IQGAP1 et la β -caténine (Fukata *et al.*, 1999a). Partant de ces observations, les auteurs ont proposé l'existence, sur les jonctions d'adhérence, d'un équilibre dynamique entre le complexe E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine et le complexe E-cadhérine/ β -caténine/IQGAP1 (modèle décrit dans : (Fukata et Kaibuchi, 2001)). Le rapport entre ces deux complexes, modulé par Rac1 et Cdc42, pourrait ainsi contrôler la « force » d'interaction entre deux cellules et permettre ou non la migration. Nous parlerons à nouveau d'IQGAP1, dans le chapitre IV, à propos des CLIPs (Cytoplasmic Linker Proteins).

b) Rôle des microtubules

- Polarisation et implication des microtubules dans la migration cellulaire

De même que le cytosquelette d'actine, le réseau microtubulaire se polarise dans les cellules en migration. Cette polarisation des MTs se manifeste à travers deux processus : la réorientation du MTOC et la stabilisation sélective d'une sous-population de MTs (Fig. 5).

La polarisation la plus remarquable est certainement l'orientation du MTOC face au « leading edge », c'est-à-dire, dans le sens de la migration (Kupfer *et al.*, 1982) (Fig. 5). Il est intéressant de noter que l'appareil de Golgi exécute généralement le même positionnement pour se retrouver, donc, entre le noyau et le front de migration. Cependant, d'une part, toutes les cellules ne repositionnent pas le MTOC lorsqu'elle se mettent à migrer et, d'autre part, nous ne savons toujours pas si ce phénomène est une conséquence ou une cause de la polarisation de la cellule (Schliwa et Höner, 1993).

De façon concomitante à l'orientation du MTOC, les MTs se polarisent de façon à s'aligner dans la direction de la migration ; beaucoup d'entre eux, sont des MTs stabilisés et détyrosinés dont les bouts (+) s'orientent préférentiellement vers le « leading edge » (Gundersen et Bulinski, 1988) (Fig. 5). Ces MTs stabilisés sont coiffés d'une structure non encore caractérisée, mais qui contient une ATPase similaire à une kinésine, car l'ATP induit la dépolymérisation contrairement à l'AMP-PNP (remarque : il ne s'agit pas de XKCM1) (Infante *et al.*, 2000; Palazzo *et al.*, 2001b). Cette coiffe ne permet ni addition ni perte de dimère de tubuline aux bouts (+) des MTs concernés. De plus, les +TIPs telles que EB1, APC et la dynactine ne sont pas détectés sur les bouts (+) de ces MTs stabilisés.

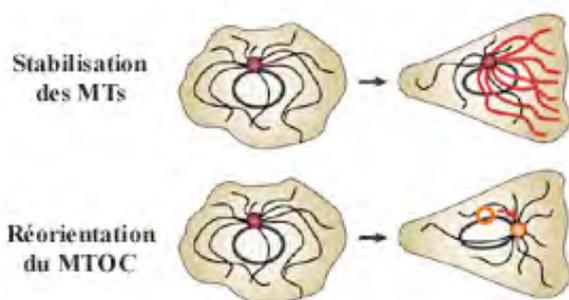


Figure 5 : Stabilisation des MTs et réorientation du MTOC dans des cellules en migration suite à une blessure expérimentale.

À la réception d'un signal induisant la migration, les cellules adoptent une morphologie polarisée caractéristique. De façon concomitante, le réseau de MTs se polarise de deux manières : par la stabilisation sélective d'une sous-population de MTs dans la direction de la migration et par la réorientation du MTOC vers une position située entre le noyau et le front de migration. D'après (Gundersen, 2002)

Les MTs semblent jouer un rôle fondamental dans l'établissement et le maintien de la polarité des cellules en migration. En effet, il est établi depuis fort longtemps que l'intégrité (Bershadsky *et al.*, 1991; Goldman, 1971; Tomasek et Hay, 1984; Vasiliev *et al.*, 1970) et la dynamique (Liao *et al.*, 1995a) des MTs sont requises pour le maintien de la polarisation et la migration des fibroblastes. De plus, chez les neurones, la croissance de l'axone et la motilité du cône de croissance sont inhibées par le nocodazole (Bamburg *et al.*, 1986; Tanaka et Kirschner, 1995), et l'activité protrusive est délocalisée suite à un traitement des cellules par de faibles doses de colcémide (Bray *et al.*, 1978). De même, le traitement des macrophages par de la colcémide annihile leur polarisation et provoque la formation de plusieurs lamellipodes par cellule, ce qui conduit à l'inhibition de la migration (Glasgow et Daniele, 1994). Cependant, il existe des exceptions. En effet, les MTs ne sont absolument pas requis pour le déplacement de certaines cellules comme les kératocytes, les neutrophiles et les lymphocytes (pour revue : (Schliwa et Höner, 1993)). Cela pose la question du rôle des MTs dans la polarisation et la migration de cellules comme les fibroblastes. A ce propos, trois hypothèses ont été avancées dans la littérature (pour revue : (Wittmann et Waterman-Storer, 2001)). Premièrement, les MTs ainsi stabilisés et orientés pourraient faciliter l'acheminement d'organelles vers le « leading edge » pour fournir les éléments nécessaires à la protrusion. Cette hypothèse est d'autant plus intéressante que l'appareil de Golgi se réoriente généralement avec le MTOC pour faire face au front de migration. La deuxième hypothèse suggère que les MTs, eux-mêmes, pourraient participer à la formation des structures protrusives comme le lamellipode. Les MTs constitueraient ainsi des éléments morphogénétiques des cellules en migration. La troisième hypothèse est fondée sur le fait que les points focaux d'adhérence sont des cibles des bouts (+) des MTs (Kaverina *et al.*, 1998) et que la dépolymérisation de ces derniers provoque une augmentation de la formation des fibres de stress et des points focaux d'adhérence (Bershadsky *et al.*, 1996). Les MTs pourraient donc contrôler localement l'adhérence et probablement la contraction des cellules. Ces trois hypothèses sont relativement incompatibles entre elles et sont matières à d'intenses débats, d'autant plus que, comme cela a été dit plus haut, certaines cellules peuvent se mouvoir sans contribution des MTs.

- Mécanismes de contrôle de l'organisation des microtubules

Les auteurs se sont longtemps interrogés sur les mécanismes qui permettent la polarisation des MTs. Bien que quelques publications récentes aient suggéré l'implication de

certaines molécules dont des moteurs moléculaires, des protéines corticales, des petites GTPases Rho et des +TIPs, le sujet fait encore l'objet de beaucoup de débats.

Stabilisation sélective des MTs vers le lamellipode (ou « leading edge ») :

Le mécanisme qui permet la stabilisation spécifique de certains MTs au voisinage du « leading edge », dans des fibroblastes 3T3 en migration, implique la GTPase RhoA, la formine mDia1 (mouse Diaphanous 1) et très probablement EB1 et APC. Ce mécanisme a été étudié en utilisant la technique de la blessure expérimentale sur des fibroblastes 3T3 en culture. Cette blessure induit, *in vitro*, la migration des fibroblastes qui permet le comblement de l'espace qu'elle a occasionné. La stabilisation d'une sous-population de MTs vers le « leading edge » dans ces fibroblastes blessés dépend du sérum ou, plus particulièrement, d'un facteur sérique nommé : le LPA (Lisophosphatidic Acid) (Cook *et al.*, 1998; Gundersen *et al.*, 1994). Le LPA induit l'activation de la GTPase RhoA ; et la GTPase RhoA activée (liée au GTP) est nécessaire et suffisante pour induire la stabilisation de MTs dans les fibroblastes traités par le LPA (Cook *et al.*, 1998; Ren *et al.*, 1999). Il est, en effet, important de souligner que Cdc42 et Rac1 ne sont absolument pas requis dans ce mécanisme (Gundersen, 2002; Palazzo *et al.*, 2001a).

Des travaux récents ont permis de montrer que mDia1 et mDia2 sont les effecteurs de RhoA-GTP dans le mécanisme de stabilisation des MTs vers le front de migration (Palazzo *et al.*, 2001b). Ces deux protéines appartiennent à la famille des DRFs (Diaphanous Related Formins), des protéines adaptatrices qui sont impliquées dans l'établissement de la polarité cellulaire grâce, notamment, à leur capacité de réguler la formation des fibres de stress (pour revue : (Sawin, 2002)). mDia1 interagit avec RhoA-GTP et mDia2 avec RhoA-GTP et Cdc42-GTP. Les fibroblastes 3T3 n'expriment que mDia1. L'activation de la protéine mDia1 endogène dans ces cellules est suffisante pour induire la stabilisation et l'orientation des MTs en absence de LPA ou de RhoA-GTP. Parallèlement, la sur-expression d'une forme activée de mDia2 (mDia1 et mDia2 présentent de très fortes similitudes) provoque aussi, en absence de LPA ou de RhoA-GTP, la stabilisation des MTs, mais une orientation moins nette de ceux-ci vers le front de migration (Palazzo *et al.*, 2001b). De plus, mDia1 et mDia2 semblent agir de concert avec la kinase Rho et sont capables d'induire la formation de la coiffe, sur les extrémités (+) des MTs, dont nous avons parlé plus haut. Somme toute, mDia1 (et probablement mDia2 dans d'autres types de cellules) apparaît comme l'effecteur de RhoA dans le mécanisme de stabilisation sélective et d'orientation des MTs chez les fibroblastes 3T3. Bien que mDia2 soit capable de s'associer aux MTs *in vitro*, nous ne connaissons pas

encore le mécanisme précis par lequel la voie LPA-RhoA-mDia permet la stabilisation et l'orientation des MTs vers le « leading edge ». Autrement dit, de quelle façon cette voie « RhoA » aboutit-elle à la formation de la coiffe stabilisatrice des MTs ? De quelle façon les MTs sont-ils guidés vers le lamellipode ? Existe-il un ancrage des MTs dans le cortex du lamellipode ?

En 1986, M. Kirschner et T. Mitchison ont proposé que l'instabilité dynamique pourrait permettre aux MTs de répondre rapidement à un changement de l'environnement de la cellule (facteurs de croissance et des cytokines). Ils ont suggéré que les bouts (+) des MTs pourraient, par leur dynamique (incessants mouvements de « va-et-vient »), balayer tout le volume de la cellule pour interagir, par hasard, avec des sites spécialisés du cortex, activés au préalable par certains signaux (modèle « recherche et capture ») (Kirschner et Mitchison, 1986). Cela permettrait la stabilisation de ces MTs et, ainsi, la polarisation du réseau microtubulaire. Aussi, par leur seule dynamique, les MTs constitueraient des cibles de certaines voies de signalisation comme celle qui déclenche la migration des cellules. Compte tenu de leur localisation aux bouts (+) des MTs polymérisant, les +TIPs pourraient participer à un tel mécanisme de « recherche et capture » en interagissant avec des protéines associées au cortex d'actine ou à d'autres sites d'ancrage des MTs de la cellule comme le kinétochore.

Par exemple, EB1 et APC pourraient être impliqués dans la capture des MTs au niveau du cortex du « leading edge » des cellules en migration. En effet, dans les cellules épithéliales MDCK, APC semble s'accumuler spécifiquement au cortex du front de migration au voisinage des bouts (+) des MTs (Nathke *et al.*, 1996). De plus, Bim1p, l'orthologue d'EB1 chez la levure bourgeonnante, est impliqué dans un mécanisme de capture des MTs au cortex du bourgeon (voir paragraphe suivant) qui requiert Bni1p, une DRF orthologue de mDia1, et les petites GTPases Rho (Lee *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 1999). Les auteurs proposent, en accord avec le modèle « recherche et capture » décrit plus haut, que les MTs pourraient s'ancrer au cortex *via* une interaction entre EB1 et APC. Cette interaction pourrait induire une stabilisation transitoire des MTs permettant à un processus de stabilisation durable (la coiffe) de prendre rapidement le relais. Venant conforter ce modèle, des données non publiées de l'équipe G. Gundersen indiquent, par ailleurs, qu'EB1 pourrait participer à la stabilisation sélective des MTs des fibroblastes 3T3 induite en amont par le LPA ou RhoA-GTP (résultats énoncés dans la revue : (Gundersen, 2002)). En somme, la voie de signalisation LPA/RhoA/mDia pourrait permettre le recrutement d'APC au cortex du lamellipode et rendre possible, ainsi, la capture de MTs *via* EB1, selon le modèle « recherche et capture » (Fig. 6). D'autres mécanismes de capture et de stabilisation des MTs semblent

exister et nous en décrivons un « prometteur » à l'occasion du chapitre concernant les CLIPs (CLIP-170-IQGAP1, chapitre IV).

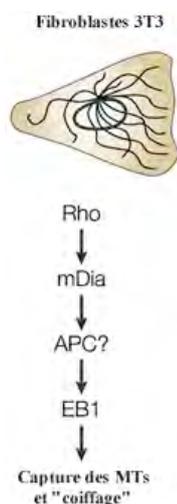


Figure 6 : Voie de signalisation impliquée dans la stabilisation sélective des MTs dans les fibroblastes 3T3 en migration.

La GTPase RhoA stimule la formine mDia1 qui, subséquemment, devrait recruter directement ou indirectement APC au cortex. En interagissant avec EB1, APC devrait ainsi permettre l'interaction de MTs dynamiques avec la région corticale du cortex. Cela conduirait à la stabilisation de ces MTs par l'ajout d'une coiffe.

D'après (Gundersen, 2002)

Réorientation du MTOC :

Deux autres études également fondées sur la technique de la blessure d'une monocouche de fibroblastes 3T3 et d'astrocytes de rat ont permis de montrer que la réorientation du MTOC est contrôlée par une voie qui implique Cdc42, la dynéine cytoplasmique et la dynactine (Etienne-Manneville et Hall, 2001; Palazzo *et al.*, 2001a). De façon analogue à la stabilisation asymétrique des MTs, le LPA est le facteur sérique principal responsable du déclenchement de la réorientation du MTOC chez les fibroblastes 3T3. Cependant, dans ce cas, le LPA active une voie régulée par Cdc42 qui implique la dynéine cytoplasmique et la dynactine. Bien que nous ne connaissions pas l'effecteur de Cdc42 responsable, dans les fibroblastes, de la réorientation du MTOC, l'équipe de A. Hall a identifié mPar-6 comme l'effecteur de Cdc42, dans ce mécanisme de réorientation du MTOC chez les astrocytes de rat en migration (Etienne-Manneville et Hall, 2001). mPar-6 est l'orthologue chez les mammifères de PAR6, une protéine impliquée dans l'établissement de la polarité de l'embryon du nématode *C. elegans* au stade une cellule. mPar6 est une protéine capable de s'associer spécifiquement à la forme active de Cdc42 ce qui lui permet d'interagir avec une protéine-kinase C atypique nommée : PKC ζ . L'interaction entre mPar6 et PKC ζ ainsi que l'activité de la PKC ζ sont nécessaires à la réorientation du MTOC dans les astrocytes *via* un processus dépendant de la dynéine cytoplasmique. De plus, les auteurs ont montré que la blessure induit, chez les astrocytes, une relocalisation de Cdc42, mPar6C et PKC ζ à la membrane plasmique du « leading edge ». Ils ont montré aussi que l'activation de ces trois

protéines dépend de l'activation des intégrines. Par ailleurs, les travaux de l'équipe de G. Gundersen ont permis de montrer que les deux voies impliquées, respectivement, dans la réorientation du MTOC et la stabilisation sélective des MTs au « leading edge » sont indépendantes. Cela implique que la réorientation du MTOC ne dépend pas de la stabilisation des MTs et réciproquement (Palazzo *et al.*, 2001a).

L'ensemble de ces données indique qu'il existe, dans les cellules en migration, une voie fonctionnelle pour la réorientation du MTOC déclenchée par le LPA et/ou les intégrines et qui implique vraisemblablement : Cdc42, mPar6, PKC ζ , et le complexe dynéine/dynactine (Fig. 7). Toutefois, nous ne savons pas si le couple mPar6/PKC ζ , contrôle directement ou indirectement le complexe moteur dynéine/dynactine. Nous ne savons pas non plus comment ce dernier fonctionne pour réorienter le MTOC, d'autant plus que les auteurs de ces deux études n'ont pas rapporté de localisation du complexe dynéine/dynactine au cortex de leurs cellules modèles. L'hypothèse la plus plausible serait un mouvement de la dynéine cytoplasmique, ancrée au cortex, vers les extrémités (-) des MTs. Ce mouvement permettrait d'exercer une force de traction sur les MTs émanant du MTOC, ce qui permettrait le déplacement de ce dernier du côté du noyau faisant face au « leading edge », où devrait se trouver la dynéine cytoplasmique. La présence du complexe dynéine/dynactine au cortex de cellules de mammifères en mitose (Busson *et al.*, 1998) et son implication dans le glissement des MTs astériens le long du cortex du bourgeon chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Adames et Cooper, 2000; Carminati et Stearns, 1997), tendent à corroborer ce modèle.

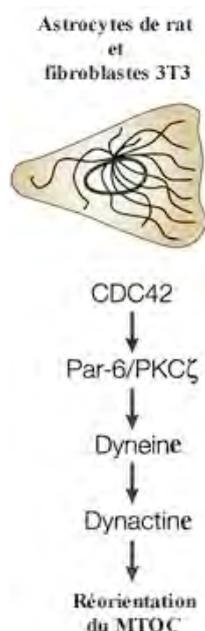


Figure 7 : Voie de signalisation impliquée dans la réorientation du MTOC dans les cellules de mammifère en migration. (Modèle issu de l'étude des fibroblastes 3T3 et des astrocytes de rat en migration *in vitro*).

Sous l'action du LPA et/ou de l'activation des intégrines, la GTPase Cdc42 est activée. Celle-ci active à son tour le couple effecteur mPar6/pKC ζ et les trois protéines sont recrutées à la membrane plasmique du front de migration. mPar6/pKC ζ régule le complexe dynéine/dynactine d'une façon encore inconnue. Le complexe moteur ainsi activé permettra la réorientation du MTOC selon un mode opératoire encore obscur.

D'après (Gundersen, 2002)

D'autres travaux tendent à montrer que, d'une façon générale, les petites GTPase Rho participent au contrôle de la dynamique et de l'organisation du réseau de MTs (pour revue : (Ridley *et al.*, 1999)). Par exemple, A. Hall et ses collaborateurs ont mis en évidence une phosphorylation spécifique de la serine 16 de l'Op18/stathmine contrôlée par les petites GTPases Rac1 et Cdc42. En effet, ces dernières sont capables d'activer la kinase p65PAK qui, à son tour, phosphoryle l'Op18/stathmine (Daub *et al.*, 2001). Ce résultat particulier laisse supposer l'existence d'un mécanisme de contrôle local de la dynamique des MTs par les petites GTPases Rho. En effet, compte tenu de la localisation de Rac1 et Cdc42 activées dans bon nombre de cellules en migration (voir plus haut), ces petites GTPases pourraient contribuer, dans ce cas, à la stabilisation de certains MTs au voisinage du lamellipode.

2. La division cellulaire

La mitose est un processus complexe qui nécessite, de façon analogue à la migration des cellules, des mécanismes de guidage de l'assemblage des MTs et des mécanismes d'ancrage de ces derniers dans des structures particulières comme le kinétochore et le cortex cellulaire. Nous verrons, dans ce paragraphe et dans les chapitres suivants, que les +TIPs prennent part à ces mécanismes, au cours de la division cellulaire.

Le fuseau de division est un échafaudage moléculaire très dynamique capable de distribuer, de façon très précise, le génome dupliqué entre deux cellules filles. Il est composé essentiellement de MTs qui sont utilisés notamment comme support pour le mouvement des chromosomes au cours de la division cellulaire. Dans le fuseau, les MTs sont globalement organisés en deux réseaux anti-parallèles, avec leurs bouts (+) situés à l'équateur et leurs bouts (-) focalisés aux pôles (pour revues : (Compton, 2000; Mitchison et Salmon, 2001; Winey et O'Toole, 2001)). Nous verrons qu'il existe aussi des MTs, émanant des pôles, dont le bout (+) est dirigé vers la périphérie de la cellule et qui participe aux mécanismes de positionnement et/ou d'orientation du fuseau de division.

a) Assemblage du fuseau de division

Rôle du centrosome :

Dans la plupart des cellules animales, la duplication et la séparation des centrosomes permettent l'assemblage d'un fuseau dont la bipolarité est essentielle à la ségrégation des

chromosomes (Mazia, 1987; Sluder et Rieder, 1985; Zhang et Nicklas, 1995a; Zhang et Nicklas, 1995b). Toutefois, il existe des types cellulaires, chez lesquels le matériel de nucléation n'est pas concentré autour des centrioles. Par exemple, dans les œufs de xénope et pendant la méiose femelle de la drosophile, la formation du fuseau suit un processus particulier, selon lequel les MTs apparaissent autour de la chromatine avant d'être organisés en une structure bipolaire (Gard, 1991; Theurkauf et Hawley, 1992). Il a été proposé que les γ -TuRCs ne seraient plus associés à des centrosomes dans ces cellules, mais seraient dispersés dans tout le volume cellulaire (Karsenti *et al.*, 1996). Les γ -TuRCs assureraient donc la nucléation des MTs et des moteurs moléculaires permettraient leur organisation en un fuseau bipolaire (Karsenti *et al.*, 1996; Merdes et Cleveland, 1997).

L'essentiel de nos connaissances concernant le mécanisme d'assemblage du fuseau de division provient d'études réalisées sur des extraits d'œufs de xénope non fécondés (pour revue : (Karsenti et Vernos, 2001)) ou sur des extraits mitotiques de cellules HeLa (Gaglio *et al.*, 1997; Gaglio *et al.*, 1996; Gaglio *et al.*, 1995). Toutefois, il existe des différences notables, d'une espèce à l'autre et d'un type cellulaire à l'autre, qui font que les données, collectées à partir des expériences réalisées sur des extraits d'œufs de xénope ou de cellules HeLa, ne sont pas systématiquement généralisables.

Contribution du contrôle de la dynamique des MTs :

La formation du fuseau de division est un exemple éloquent de la capacité que possèdent les cellules à réorganiser leur réseau microtubulaire en modifiant les paramètres de l'instabilité dynamique. En effet, l'assemblage du fuseau de division et le positionnement des chromosomes sur la plaque équatoriale requièrent un contrôle très précis de la taille et de l'orientation des MTs. Cela implique une régulation très élaborée de la dynamique des MTs, à la fois globalement dans le cytoplasme et localement au voisinage des chromosomes :

- Au cours de la division cellulaire, la dynamique des MTs est globalement augmentée. Cette modification de la dynamique des MTs est principalement due à une augmentation importante de la fréquence de catastrophe. Elle est contrôlée en amont par la kinase p34^{cdc2} qui provoque directement ou indirectement la phosphorylation de nombreuses protéines (pour revue : (Andersen, 2000)). Parmi ces protéines phosphorylées en mitose, nous pouvons citer MAP4 (voir plus haut), dont la phosphorylation par p34^{cdc2} inhibe sa capacité de promouvoir l'assemblage des MTs. Par ailleurs, certaines phosphatases comme PP1 et

PP2A semblent intervenir aussi dans l'augmentation de la dynamique des MTs en stimulant l'activité de certains facteurs de déstabilisation (Tournebize *et al.*, 1997).

- Parallèlement, il semble exister localement des mécanismes permettant de favoriser et de guider l'assemblage des MTs. En effet, comme cela a été évoqué plus haut, une activité kinase associée aux chromosomes peut stabiliser les MTs localement. Il s'agit de Plx1 qui semble capable d'inactiver localement Op18/Stathmine en l'hyperphosphorylant (Andersen *et al.*, 1997; Budde *et al.*, 2001). Cette capacité qu'ont les chromosomes de faciliter l'assemblage (et même la nucléation) des MTs localement semble aussi contrôlée par la petite GTPase Ran (Kahana et Cleveland, 1999) ; et l'un des effecteur de cette protéine G dans ce processus est TPX2 (Gruss *et al.*, 2001; Gruss *et al.*, 2002).

Rôles des moteurs moléculaires :

Les moteurs moléculaires MTs dépendants semblent également jouer un rôle important dans l'assemblage du fuseau de division. A ce propos, des études réalisées sur des extraits d'œufs de xénope, ont permis d'établir un modèle visant à expliquer de quelle façon des moteurs moléculaires coordonnent leur activité pour assembler un fuseau de division en absence de centrosome et de kinétochore (Heald *et al.*, 1996; Walczak *et al.*, 1998). Ce modèle est fondé sur l'action de trois moteurs très différents par leur structure, leur localisation et leurs fonctions (pour revues : (Brunet et Vernos, 2001; Heald, 2000; Karsenti et Vernos, 2001)) : la kinésine homo-tétramérique Eg5 génère des faisceaux de MTs organisés de façon anti-parallèle, en établissant des interactions croisées (Sawin *et al.*, 1992; Sharp *et al.*, 1999) ; la kinésine associée au bras des chromosomes, Xklp1, capture les MTs et, en se déplaçant vers les bouts (+), permet l'éloignement des bouts (-) de la chromatine (Vernos *et al.*, 1995); et la dynéine cytoplasmique focalise les bouts (-) des MTs pour former les pôles du fuseau de division (Heald *et al.*, 1997) (voir aussi le chapitre II). Ces trois activités motrices, associées à quelques autres protéines, semblent suffisantes pour assembler des MTs en un fuseau de division bipolaire, dans des extraits de xénope, autour de billes recouvertes d'ADN. Il reste cependant à établir le caractère transposable de ces données à des systèmes qui possèdent des centrosomes et des kinétochores.

Dans les cellules possédant des centrosomes (ou SPB pour « Spinde Pole Body » chez la levure), il existe différentes catégories de MTs dans le fuseau de division : les MTs astériens qui émanent de chacun des pôles et qui se déploient vers la périphérie de la cellule ; les MTs kinétochoriens qui connectent chacun des pôles aux kinétochores ; et un nombre

variable de MTs qui prennent naissance aux pôles du fuseau, qui se chevauchent d'une façon anti-parallèle et qui entrent en contact avec les bras des chromosomes. Chacune de ces 3 catégories de MTs possède des propriétés particulières (dynamique différente selon le type de MTs...) et remplissent des fonctions spécifiques aux différentes étapes de la mitose.

Alors que les MTs qui se connectent aux kinétochores ou aux chromosomes jouent un rôle capital dans le mouvement et donc la ségrégation des chromosomes, les MTs astériens participent activement à une étape essentielle de la mitose dans divers types de cellules : le positionnement (et/ou l'orientation) du fuseau de division. Cette étape constitue un modèle très intéressant pour l'étude de la polarisation du réseau microtubulaire, puisqu'elle implique notamment un « dialogue » entre les bouts (+) des MTs et le cortex cellulaire, coordonné dans le temps et dans l'espace et pouvant être suivi en vidéo-microscopie.

b) Mécanismes de l'orientation et du positionnement du fuseau de division

Une localisation correcte du sillon de clivage est essentielle pour achever avec succès une division cellulaire, qu'il s'agisse d'une mitose ou d'une méiose. Lors d'une mitose classique, le sillon de clivage est placé au centre de la cellule ce qui permet un partage équitable, entre les deux cellules filles, des organelles et des composants moléculaires (division symétrique). Dans le cas précis d'une mono-couche de cellules épithéliales, le sillon de clivage se place perpendiculairement au plan de la mono-couche, ce qui permet de maintenir les deux cellules filles dans la même couche de cellules. Au cours du développement embryonnaire, une mitose asymétrique (fuseau excentré), corrélée à une localisation particulière de certains déterminants moléculaires, permet d'engendrer deux cellules filles différentes par leurs tailles et leurs contenus, qui auront de ce fait des devenir différents (pour revues : (Gonczy, 2002; Schuyler et Pellman, 2001b; Segal et Bloom, 2001). Bien qu'il ait été montré que la position du sillon de clivage dépend de la position du fuseau de division (pour revues : (Field *et al.*, 1999; Fishkind et Wang, 1995; Hales *et al.*, 1999)), peu de choses sont connues sur les mécanismes qui permettent de positionner et d'orienter le fuseau lui-même.

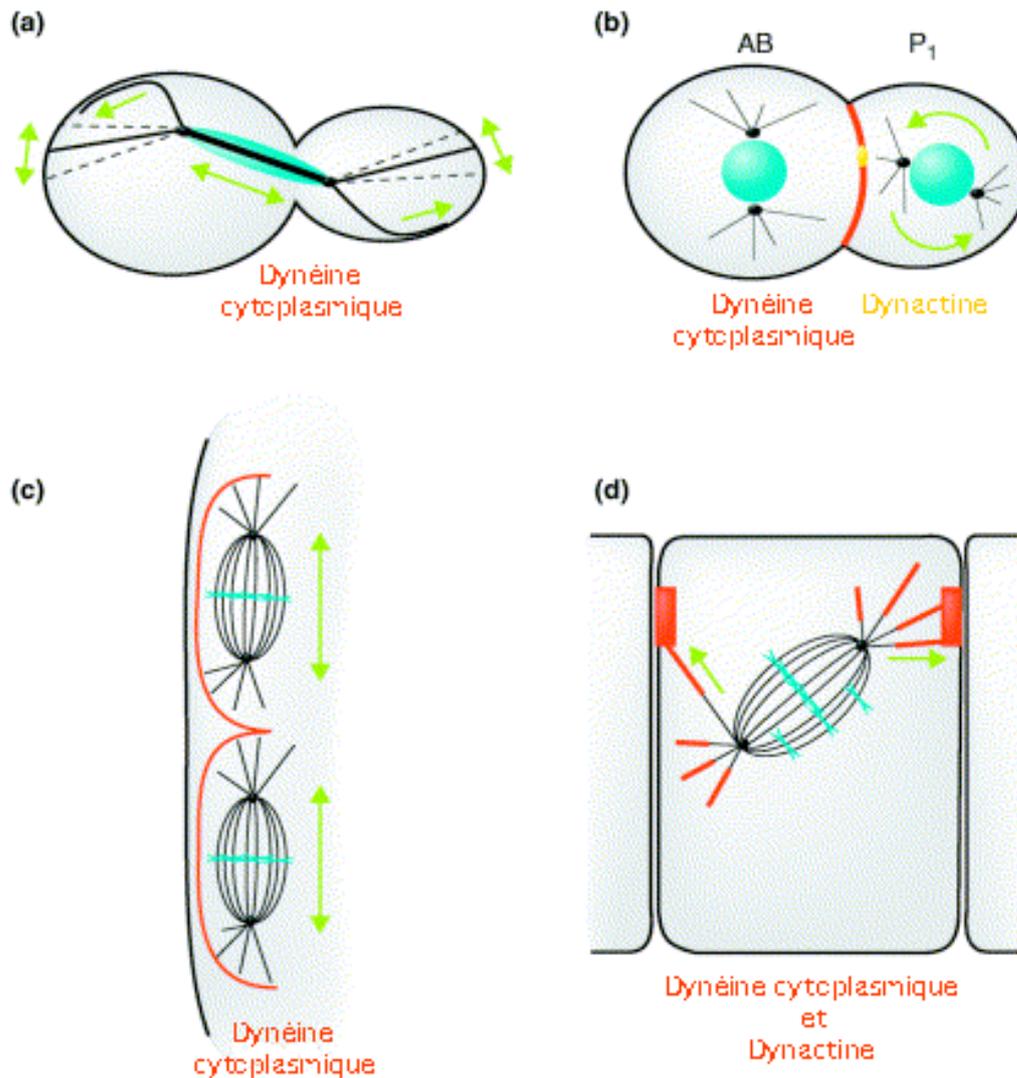


Figure 8 : Modèles d'étude du positionnement et de l'orientation du fuseau de division.

Les mouvements des MTs (lignes noires pleines et hachurées), du noyau et du fuseau de division sont illustrés ici à travers 4 exemples dans lesquels la dynéine cytoplasmique est impliquée. **(a)** Chez *S. cerevisiae*, le positionnement du noyau est dépendant d'interactions entre les MTs et le cortex du bourgeon de type « end-on » et par glissement. Ces deux types d'interaction impliquent des +TIPs différentes (voir le texte) **(b)** Chez *C. elegans*, le complexe noyau-centrosome du blastomère P1 s'oriente de façon à placer le fuseau selon l'axe antéro-postérieur. Cette orientation dépend de la dynéine cytoplasmique et de la dynactine. Dans ce cas, la dynéine cytoplasmique (en rouge) et la dynactine (en jaune) ont été détectées au cortex séparant les blastomères AB et P1. **(c)** Chez l'embryon de drosophile, la dynéine cytoplasmique et la dynactine sont requises pour la séparation des centrosomes au cours de la prophase et lors des phases ultérieures de la mitose. La dynéine cytoplasmique (en rouge) est localisée sur des coiffes d'actine entourant chaque domaine nucléaire. **(d)** Dans des cellules MDCK, la dynéine cytoplasmique et la dynactine (toutes les deux en rouge) se localisent sur les MTs astériens et au cortex cellulaire sous les jonctions serrées, formant une sorte de ceinture sous la *zonula occludens*. En métaphase, le fuseau s'oriente de façon à aligner son axe dans le plan de l'épithélium, au même niveau que la ceinture de dynéine et de dynactine. Les hypothétiques forces de traction permettant la réorientation du fuseau sont indiquées en vert. D'après (Dujardin et Vallee, 2002).

Les premières données relatives aux mécanismes de positionnement et d'orientation du fuseau proviennent d'études faites chez les invertébrés (Fig. 8 a, b et c). Elles montrent que l'interaction entre les MTs astériens et le cortex cellulaire joue un rôle essentiel dans ces processus. Ces interactions semblent permettre le déplacement du fuseau de division en couplant la dépolymérisation des MTs et le mouvement, ou bien en exerçant une force de traction sur les MTs par l'intermédiaire d'un moteur rétrograde ancré au cortex. Illustrant nos propos, les travaux tout d'abord de J.L. Carminati et de T. Stearns, puis de N.R. Adames et de J.A. Cooper, chez *Saccharomyces cerevisiae*, ont permis d'identifier deux étapes distinctes dans le processus de positionnement et d'orientation du fuseau de division chez la levure bourgeonnante (Fig. 8a) (Adames et Cooper, 2000; Carminati et Stearns, 1997) :

La première étape consiste en un déplacement du fuseau de division vers l'encolure du bourgeon en formation, grâce à la capture puis à la dépolymérisation des MTs cytoplasmiques au cortex du bourgeon. Des études récentes, ont révélé que Bim1p, l'orthologue d'EB1, participe à cette étape, probablement en augmentant la dynamique des MTs (modèle recherche et capture), mais surtout en interagissant avec Kar9p, une protéine corticale apparaissant sous forme de points au cortex du bourgeon (Miller et Rose, 1998). Ainsi, la +TIP Bim1p établit un lien physique, de type « end-on » entre les MTs et le cortex du bourgeon. Cette interaction « end-on » conduit à la dépolymérisation des MTs et, subséquemment, au déplacement du noyau vers le bourgeon (Korinek *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000). Bien qu'EB1 soit conservé dans un grand nombre d'organismes, depuis la levure jusque chez l'humain, nous ne connaissons pas l'orthologue de Kar9p chez les eucaryotes supérieurs. Toutefois, compte tenu de l'interaction entre EB1 et APC et de la localisation subcellulaire d'APC (voir plus haut), cette dernière pourrait bien être l'équivalent fonctionnel de Kar9p chez les organismes pluricellulaires. Si cette hypothèse s'avère, le couple APC-EB1 pourrait être impliqué dans des mécanismes qualifiés d'« ancrage-dépolymérisation » à différents sites de la cellule.

Lors de la deuxième étape du processus de positionnement du fuseau mitotique, des MTs cytoplasmiques interagissent latéralement avec le cortex du bourgeon et glissent le long de celui-ci, ce qui permet le déplacement du noyau dans l'encolure du bourgeon. Cette étape, absolument requise pour la répartition égale des chromosomes entre la cellule mère et la cellule fille, requiert la dynéine cytoplasmique. Cependant, ce moteur moléculaire n'a pas été détecté, jusqu'à aujourd'hui, au cortex du bourgeon et son mécanisme d'action reste, de ce fait, obscur. Néanmoins la démonstration, *in vitro*, d'une interaction entre la dynéine cytoplasmique et la protéine corticale Num1p (Farkasovsky et Kuntzel, 2001) laisse entrevoir

la possibilité d'un glissement des MTs au cortex du bourgeon généré par ce moteur moléculaire, d'autant plus que la délétion de *Num1* abolit ces glissements (Heil-Chapdelaine *et al.*, 2000).

Le positionnement et l'orientation du fuseau de division peuvent se résumer au repositionnement des MTOCs et pourraient impliquer, de ce fait, la même voie de signalisation que nous avons décrite dans le paragraphe traitant de la migration des cellules, c'est-à-dire la voie qui implique en amont la petite GTPase Cdc42. A ce propos, l'exemple du positionnement du fuseau de division dans l'embryon du nématode *Cerorhabditis elegans* au stade une cellule est éloquent.

Chez cet embryon de *C. elegans* au stade 1 cellule, des études récentes ont démontré qu'un déséquilibre de forces permet de positionner asymétriquement le fuseau de division sur l'axe antéro-postérieur. Chez ce nématode, la fertilisation engendre l'établissement d'une polarité caractérisée par la localisation asymétrique des protéines PAR (« PARtioning-defective »), de la petite GTPase Cdc42 et de la protéine kinase C atypique : PKC-3. En réponse à ces déterminants de la polarité, le fuseau de division est déplacé vers le pôle postérieur de l'embryon. En conséquence, la première division donne naissance à un volumineux blastomère antérieur (AB : « Anterior Blastomere ») et à un plus petit blastomère postérieur (P1). Chez la plupart des mutants *par*, la polarité est altérée, le déplacement du fuseau vers le pôle postérieur n'a pas lieu et la première division est symétrique.

Des expériences consistant à sectionner le fuseau ont révélé l'existence de forces de traction générées au cortex des deux pôles de l'embryon, agissant sur les pôles du fuseau de division (Grill *et al.*, 2001). La force générée au pôle postérieur de l'embryon apparaît nettement supérieure à celle générée au pôle antérieur, ce qui tend à expliquer le caractère asymétrique de la première division.

Les divisions suivantes du blastomère P1 restent confinées au pôle postérieur de l'embryon et le fuseau de division s'oriente toujours selon l'axe antéropostérieur. L'inactivation de la dynéine cytoplasmique ou de la dynactine par la technique de l'ARN interférent, empêche la rotation du complexe centrosome-noyau, ce qui suggère là aussi un rôle pour la dynéine cytoplasmique dans l'orientation et probablement le positionnement du fuseau de division (Fig. 8b) (Gonczy *et al.*, 1999; Skop et White, 1998). Cela dit, le mécanisme d'action de ce moteur n'est pas encore connu dans ce système. Toutefois, la dynactine se localise à un site correspondant au « midbody » de la division précédente (en jaune fig. 8b) et la dynéine cytoplasmique est détectée sur la région corticale séparant le

blastomère P1 du blastomère AB (en rouge fig. 8b). Les auteurs ont proposé que ce moteur moléculaire pourrait, là aussi, servir de point d'ancrage des MTs au cortex, permettant l'orientation du complexe centrosome-noyau.

Des résultats analogues ont été obtenus chez l'ovocyte de drosophile suggérant l'implication de la dynéine cytoplasmique dans l'établissement de la polarité de l'ovocyte et dans le positionnement du noyau (McGrail *et al.*, 1995; McGrail et Hays, 1997; Swan *et al.*, 1999) (et voir chapitre III concernant LIS1). De plus, dans l'embryon de drosophile avant la cellularisation, les mouvements des pôles du fuseau de division dépendent de trois moteurs distincts : deux kinésines (ncd et KLP61F) et la dynéine cytoplasmique. Dans ces cellules, la dynéine cytoplasmique a été détectée sur des sortes de « coiffes » riches en actine dans lesquelles la mitose a lieu (Fig. 8c) et la perturbation de ce moteur moléculaire empêche la séparation des pôles (Robinson *et al.*, 1999; Sharp *et al.*, 2000a).

Que savons-nous de l'orientation et/ou du positionnement du fuseau de division, chez les mammifères ?

La dynéine cytoplasmique ainsi que son co-facteur, la dynactine, se localisent sur les MTs astériens et s'accumulent sur la *zonula adherens*, sous les jonctions serrées, formant une ceinture tout autour des cellules MDCK à la hauteur de l'axe du fuseau de division (Busson *et al.*, 1998) (Fig. 8d). Le recrutement cortical de ce complexe moteur apparaît plus prononcé à la transition prémétaphase-métaphase, étape à laquelle s'oriente le fuseau de division parallèlement au plan de la mono-couche de cellules épithéliales. Ces accumulations corticales, appelées sites corticaux, semblent connecter les MTs astériens. Cela laisse supposer que la dynéine cytoplasmique pourrait exercer une force de traction sur les MTs astériens depuis le cortex, permettant d'orienter le fuseau de division (Fig. 8d).

Une preuve indirecte du rôle de la dynéine cytoplasmique et des MTs astériens dans l'orientation du fuseau de division provient d'une étude réalisée par l'équipe de Yu-Li Wang sur des cellules NRK en culture. Dans ces cellules, le fuseau de division se positionne naturellement au barycentre. Lorsqu'une distorsion est affligée mécaniquement aux cellules NRK, le fuseau mitotique est en mesure de trouver le nouveau barycentre (O'Connell et Wang, 2000). Cette capacité est abolie lorsque la dynéine cytoplasmique est inactivée par micro-injection d'anticorps, ou quand les MTs astériens sont affectés lors d'un traitement des cellules par une faible dose de nocodazole. Cependant la dynéine cytoplasmique n'a pas été détectée au cortex dans ces cellules. Aussi, nous ne savons pas si la dynéine cytoplasmique

participe au positionnement du fuseau dans les cellules NRK en exerçant une force de traction sur les MTs astériens ou bien si son rôle est moins direct (contrôle de la dynamique des MTs).

Par ailleurs, des observations concordantes ont été faites dans des fibroblastes V79 d'hamster (Schultz et Onfelt, 2001).

Nous verrons, dans le chapitre traitant de LIS1, qu'une autre étude a permis d'établir un lien entre la localisation corticale de la dynéine cytoplasmique et l'orientation du fuseau de division (Faulkner *et al.*, 2000).

Un lien pourrait exister entre le mécanisme de réorientation du MTOC dans les cellules en migration et l'orientation des pôles du fuseau de division dans les cellules de mammifères. En effet, ces deux processus requièrent la dynéine cytoplasmique, qui pourrait être contrôlée en amont par la même cascade d'événements moléculaires impliquant la petite GTPase Cdc42 (Etienne-Manneville et Hall, 2001; Palazzo *et al.*, 2001a). Certaines hypothèses concernant les mécanismes de recrutement de la dynéine cytoplasmique au cortex cellulaire seront présentées dans les chapitres suivants.

c) Rôles du kinétochore dans le processus mitotique

Comme cela a été évoqué à maintes reprises dans les paragraphes précédents, le kinétochore constitue un point d'ancrage et un lieu de stabilisation des MTs. Les +TIPs comme EB1, APC mais aussi la dynéine cytoplasmique et la CLIP-170 semblent y jouer un rôle important au cours de la division cellulaire.

Structure et organisation du kinétochore :

Chez les vertébrés, les kinétochores jouent plusieurs rôles essentiels au cours de la mitose, notamment lors de la congression et de la ségrégation des chromosomes (pour revue : (Rieder et Salmon, 1994)). La structure du kinétochore mature, dont le diamètre varie selon le type cellulaire ($\approx 0,4$ à $0,6 \mu\text{m}$), présente trois plaques distinctes visibles en microscopie électronique. La plaque la plus interne (20 à 40 nm d'épaisseur) et la plus externe (30 à 40 nm d'épaisseur) sont denses aux électrons, alors que la plaque centrale (15 à 35 nm d'épaisseur) apparaît « translucide ». De plus, un matériel fibrillaire, dénommé corona, qui s'étend jusqu'à 250 nm au-delà de la plaque externe, est visible en l'absence de MTs (pour revue : (Rieder, 1982)).

La composition exacte du kinétochore est mal connue, à l'exception notamment de protéines initialement identifiées comme des auto-antigènes humains appelées "Centromere-associated Proteins" ou CENP. La répartition des principaux composants connus du kinétochore est résumée dans la figure 9.

L'hétérochromatine centromérique, riche en ADN satellite α , lie la protéine CENP-B (Cooke *et al.*, 1990; Masumoto *et al.*, 1989). Le moteur MCAK (Wordeman et Mitchison, 1995), ainsi que la protéine INCENP ("InnCentromere Protein" (Earnshaw et Cooke, 1991)), se localisent également dans cette région. INCENP est une protéine dont la localisation centromérique est nécessaire à la congression des chromosomes en prémétaphase, et à la cytokinèse (Mackay *et al.*, 1998). Alors que son rôle en prémétaphase est encore inconnu, il a été proposé que son association aux centromères pourrait lui permettre de se localiser sur le futur axe du sillon de clivage de la cellule en métaphase. Sa relocalisation dans la partie centrale du fuseau à la transition métaphase-anaphase lui permettrait de contribuer à la cytokinèse (Eckley *et al.*, 1997; Mackay *et al.*, 1998).

La plaque interne repose sur la région centromérique et contient de l'ADN (Cooke *et al.*, 1993). La protéine CENP-C, essentielle à l'assemblage du kinétochore (Saitoh *et al.*, 1992; Tomkiel *et al.*, 1994) en fait également partie. La plaque centrale contient le phosphoépitope 3F3/2 impliqué dans le point de contrôle de la transition métaphase-anaphase dont nous parlerons plus tard (Campbell et Gorbsky, 1995). La plaque externe contient la protéine CENP-F (Liao *et al.*, 1995b; Rattner *et al.*, 1993) dont le rôle est encore inconnu.

CENP-E (Cooke *et al.*, 1997; Yao *et al.*, 1997), et la dynéine cytoplasmique (Wordeman *et al.*, 1991), dont l'adressage aux kinétochores dépend du complexe dynactine et de la protéine ZW10 (Echeverri *et al.*, 1996; Starr *et al.*, 1998), sont deux moteurs moléculaires présents essentiellement sur la corona.

La micro-injection d'anticorps reconnaissant plusieurs CENP provoque l'assemblage de kinétochores ayant une structure anormale (Bernat *et al.*, 1991). Le fait que ces cellules soient incapables de faire congresser leurs chromosomes sur la plaque métaphasique (Bernat *et al.*, 1990) souligne l'importance des kinétochores dans le mouvement des chromosomes.

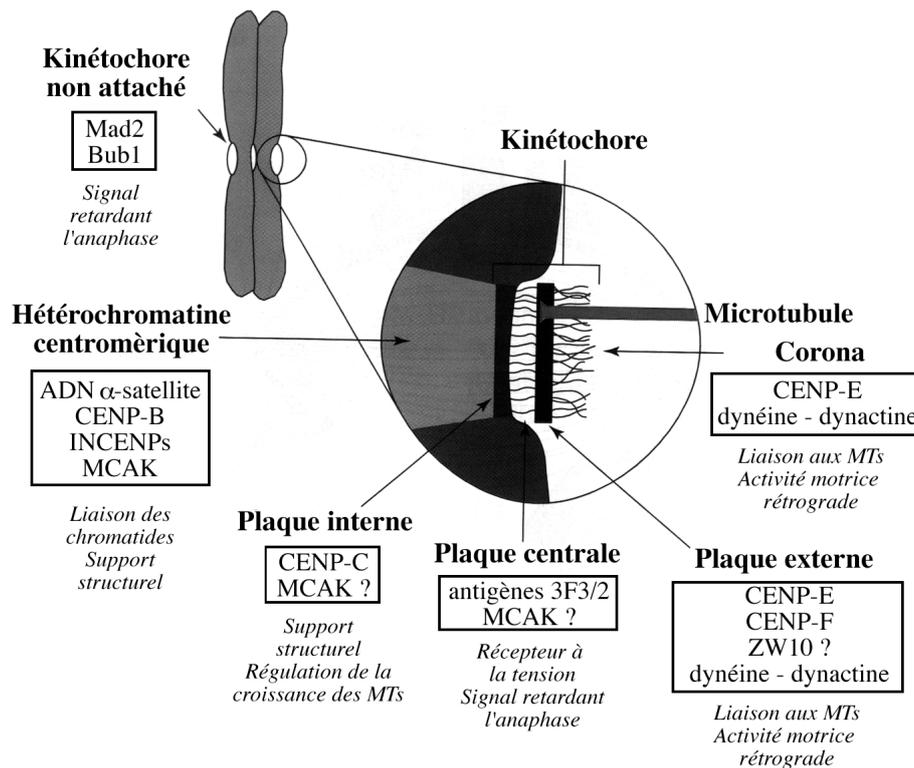


Figure 9 : Localisation des principaux constituants des kinétochores. Les fonctions présumées de différents domaines de la région kinétochorienne sont indiquées en italique sous leur composition. *D'après (Rieder et Salmon, 1998).*

Cinétique du mouvement des kinétochores :

Les mouvements des kinétochores pendant la mitose ont été intensément étudiés en vidéomicroscopie par plusieurs groupes (Fig. 10, et pour revue : (Rieder et Salmon, 1994)).

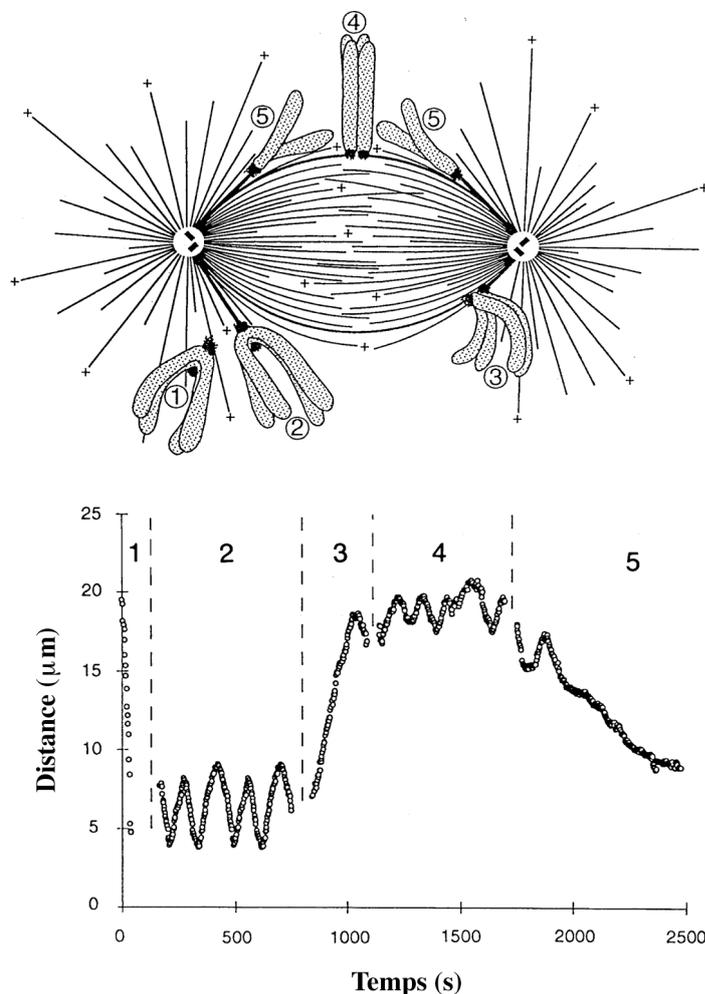


Figure 10 :
Représentation schématique des différents mouvements des kinétochores enregistrés pendant la mitose.

La distance qui sépare un kinétochore de son pôle est rapportée sur le graphique pour chaque étape, à savoir la capture initiale d'un MT (1), la mono-orientation (2), la congression (3), les oscillations sur la plaque métaphasique (4), et l'anaphase (5) (voir texte pour détails). D'après (Rieder et Salmon, 1994)

A la rupture de l'enveloppe nucléaire, les chromosomes localisés en position centrale par rapport aux deux pôles sont, en général, bi-orientés rapidement. Autrement dit, les deux kinétochores frères sont attachés par des MTs provenant des pôles opposés. Si un chromosome se trouve décentré, il n'acquiert généralement pas immédiatement cette bi-orientation, mais se trouve mono-orienté vers le pôle le plus proche. Cette mono-orientation peut se faire par l'intermédiaire d'un glissement rapide du kinétochore vers le pôle (25-50 $\mu\text{m}/\text{min}$) le long d'un seul MT (Fig.10 phase 1) (Hayden *et al.*, 1990; Merdes et De Mey, 1990; Rieder et Alexander, 1990). Alors que le chromosome mono-orienté s'approche du pôle, des MTs s'insèrent progressivement dans le kinétochore. Bien que de nombreuses études démontrent que ces MTs se terminent dans la plaque externe du kinétochore (Rieder,

1982), des cas minoritaires de MTs se terminant dans les plaques centrales et internes ont été rapportés dans des fibroblastes de muntjac (Rattner et Bazett-Jones, 1989). Le faisceau de MTs ainsi formé et ancré dans le kinétochore (pouvant varier de 4 à plus de 40 MTs selon les cellules) constitue la fibre kinétochorienne. Les MTs qui composent cette fibre kinétochorienne sont beaucoup plus stables que les autres MTs du fuseau (Rieder, 1982). Cette stabilité est due au kinétochore, car la fibre se désassemble rapidement après son détachement ou si elle est sectionnée (Nicklas et Kubai, 1985; Spurck *et al.*, 1990). En outre, la stabilisation semble être stimulée lorsque la fibre subit une tension appliquée sur la région centromérique (Nicklas et Koch, 1969).

Le kinétochore attaché d'un chromosome mono-orienté subit une série d'oscillations appelée instabilité directionnelle, alternant des mouvements persistants vers le pôle (P) et s'éloignant du pôle (AP) (Fig.10 phase 2) (Bajer *et al.*, 1982; Rieder *et al.*, 1986). Contrairement au mouvement rapide initial, ces oscillations, plus lentes (1-3 $\mu\text{m}/\text{min}$), doivent être étroitement corrélées à la polymérisation et à la dépolymérisation des MTs insérés dans le kinétochore. Quand le kinétochore frère encore libre capture un MT, le chromosome se déplace vers la partie centrale du fuseau, processus appelé congression, qui implique un déplacement P du kinétochore nouvellement attaché, et un déplacement AP de l'autre kinétochore (Fig.10 phase 3). Bien que les kinétochores soient également capables de changer de direction pendant la congression et l'anaphase, les chromosomes se déplacent car chaque kinétochore passe plus de temps à évoluer dans un sens donné (Skibbens *et al.*, 1993). Les kinétochores des chromosomes répartis sur la plaque métaphasique continuent alors d'osciller (Fig.10 phase 4) jusqu'au déclenchement de l'anaphase (Fig.10 phase 5).

Rôles possibles des +TIPs dans le guidage et l'ancrage des MTs dans le kinétochore :

Concernant la rencontre d'un microtubule avec un kinétochore, le modèle communément admis est de nouveau celui dit de « recherche et capture » (Kirschner et Mitchison, 1986). Parmi les +TIPs susceptibles de jouer un rôle dans ce mécanisme, la dynéine cytoplasmique ainsi que la dynactine, son principal co-facteur, pourraient être impliquées dans la première interaction latérale entre un MT et un kinétochore, conduisant au déplacement rapide de ce dernier vers le pôle d'où provient le MT (Fig.10, phase 1 et voir chapitre II). Par ailleurs, nous verrons dans le chapitre IV, que la CLIP-170 pourrait participer à la capture de ce MT et faciliter ainsi la prise en charge du kinétochore par la dynéine cytoplasmique.

Deux études récentes semblent impliquer le couple EB1/APC dans le mécanisme de guidage et d'ancrage des MTs dans la plaque externe des kinétochores (Fodde *et al.*, 2001; Kaplan *et al.*, 2001). En effet, APC se localise aux bouts (+) des MTs ancrés dans le kinétochore de cellules HeLa et PtK. De plus, l'inactivation d'APC dans des cellules ES (Embryonic Stem) perturbe considérablement la ségrégation des chromosomes, ce qui aboutit à une aneuploïdie importante (Fodde *et al.*, 2001; Kaplan *et al.*, 2001). Cette localisation kinétochorienne d'APC est observée depuis la rupture de l'enveloppe nucléaire et persiste pendant la métaphase. De plus, elle dépend des MTs, puisqu'un traitement des cellule au nocodazole abolit le signal correspondant à APC.

Rôle de la dynamique des MTs dans le mouvement des chromosomes :

Des études fondées sur l'utilisation de tubuline marquée (Mitchison *et al.*, 1986; Sheldon et Wadsworth, 1992) ou dont la fluorescence peut être localement activée (Mitchison, 1989; Mitchison et Salmon, 1992) ou éteinte (Cassimeris et Salmon, 1991; Centonze et Borisy, 1991; Gorbsky *et al.*, 1987), ont révélé que les kinétochores sont les principaux sites de polymérisation et de dépolymérisation des fibres kinétochoriennes. En fait, un mouvement lent des fibres kinétochoriennes vers les pôles (0,5 $\mu\text{m}/\text{min}$) a été enregistré, et pourrait contribuer pour 25% au déplacement rétrograde des chromosomes ((Mitchison et Salmon, 1992) et pour revue : (Waters et Salmon, 1996)). De plus, la destruction par un laser de l'un des 2 kinétochores d'une paire de chromosomes bi-orientés provoque le déplacement de ces derniers vers le pôle auquel ils sont encore attachés (Hays et Salmon, 1990; McNeill et Berns, 1981; Rieder *et al.*, 1986).

Ces résultats identifient clairement le kinétochore comme la source principale de l'activité motrice des chromosomes. Cependant, ces chromosomes artificiellement mono-orientés, ainsi que les chromosomes naturellement mono-orientés (cas des fuseaux monopolaires) (Cassimeris *et al.*, 1994), ne migrent pas jusqu'au pôle, mais oscillent autour d'une position intermédiaire entre la plaque métaphasique et le pôle. Cela suggère l'existence d'une force qui tend à éloigner les chromosomes des pôles. Corroborant cette hypothèse, des fragments de chromosomes produits par coupure au laser, ne possédant pas de kinétochores, sont éloignés des pôles à une vitesse d'environ 2 $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ (Rieder *et al.*, 1986). Ces mêmes auteurs ont montré que des fragments de chromosomes, de tailles plus réduites, adoptent une position plus proche du pôle. Cela suggère donc que les « forces d'éjection polaire » ainsi mises en évidence sont proportionnelles à la taille des chromosomes et indépendantes des kinétochores.

Mouvement des chromosomes et moteurs moléculaires :

La présence de moteurs moléculaires sur les chromosomes (kinétochores et bras des chromosomes) est probablement responsable d'une grande partie des mouvements observés au cours d'une division cellulaire (pour revue : (Brunet et Vernos, 2001)). *In vitro*, les kinétochores peuvent déplacer des MTs dans les deux directions, ce qui indique l'existence sur ces structures d'au moins deux activités motrices opposées (antérograde et rétrograde) pouvant être, en outre, régulées par phosphorylation (Hyman et Mitchison, 1991). Jusqu'à présent, trois types de moteurs ont été localisés sur les kinétochores ou à proximité (Fig. 9). La dynéine cytoplasmique, moteur rétrograde, et CENP-E, moteur vraisemblablement antérograde apparenté à la kinésine conventionnelle, sont présents sur la corona. MCAK, qui est l'orthologue de XKCM1 (famille KinI) dont nous avons parlé plus haut, serait un facteur de contrôle de la dynamique des MTs, sans réelle activité motrice. Il est présent dans la région centromérique et probablement kinétochorienne pendant toute la mitose.

La contribution spécifique de chacun de ces moteurs moléculaires aux divers déplacements et la coordination de leur activité n'est pas encore totalement élucidée. La dynéine cytoplasmique pourrait intervenir dans le transport rapide conduisant à la mono-orientation des chromosomes (voir chapitre II). CENP-E pourrait maintenir l'attachement des kinétochores aux MTs pendant que ceux-ci se dépolymérisent à leur bout (+). Il participerait ainsi au mouvement des chromosomes vers les pôles. MCAK pourrait, quant à lui, déclencher aux moments opportuns la dépolymérisation des MTs (pour revues : (Brunet et Vernos, 2001; Heald, 2000)).

Concernant les « forces d'éjection polaire », il a été longtemps suggéré que les impacts des bouts (+) des MTs sur les bras des chromosomes pourraient constituer la cause de ce phénomène (Rieder et Salmon, 1994). Cependant, l'instabilité dynamique accrue des MTs en mitose et le caractère élastique de la chromatine rendent peu probable cette première hypothèse (Houchmandzadeh *et al.*, 1997). Depuis, un autre modèle, fondé sur la présence de moteurs de la famille des chromokinésines sur les bras des chromosomes, a été proposé. Ces moteurs pourraient effectivement déplacer les chromosomes le long des MTs vers l'extrémité (+), et ainsi éloigner ceux-ci des pôles (pour revues : (Brunet et Vernos, 2001; Vernos et Karsenti, 1996)). Xkid apparaît comme le meilleur candidat pour contribuer aux forces d'éjection polaire. Il s'agit de l'orthologue de Kid, un moteur de type kinésine associé aux chromosomes durant la mitose chez l'humain (Tokai *et al.*, 1996). L'étude de ce moteur, dans des extraits d'œufs de xénope, a révélé qu'il n'est pas nécessaire à l'assemblage du fuseau de

division, mais qu'il est absolument requis pour l'alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale. Corroborant son implication dans les forces d'éjection polaire, sa dégradation par la voie de l'ubiquitine ligase APC/C (élément central du point de contrôle métaphase-anaphase, voir plus loin) est nécessaire à la ségrégation des chromosomes.

Les autres moteurs présents sur les bras des chromosomes, comme Xklp1 chez le xénope et Nod chez la drosophile, ne semblent pas participer aux forces d'éjections polaires. Xklp1 serait plutôt impliqué dans l'ancrage et la stabilisation des MTs sur la chromatine (ainsi que l'assemblage du fuseau, voir plus haut) (Vernos *et al.*, 1995; Walczak *et al.*, 1998), tandis que Nod œuvrerait contre la perte de chromosomes pendant la méiose (Afshar *et al.*, 1995; Theurkauf et Hawley, 1992).

Le kinétochore est le chef d'orchestre du point de contrôle métaphase-anaphase :

La présence de « points de contrôle » permet aux cellules d'interrompre la progression dans le cycle cellulaire tant que certaines conditions ne sont pas remplies. Par exemple, la présence d'ADN endommagé empêche le déclenchement de sa réplication tant que la réparation n'a pas été effectuée. De même, la cellule n'entrera pas en mitose si l'ADN n'est pas répliqué complètement.

Les cellules possèdent généralement un point de contrôle qui leur permet de retarder le déclenchement de l'anaphase tant que les chromosomes ne sont pas alignés sur la plaque métaphasique (pour revues : (Rieder et Salmon, 1998; Shah et Cleveland, 2000)). Ce point de contrôle permet de réduire les risques d'aneuploïdie, la progression tumorale et la mort cellulaire (Wassmann et Benezra, 2001).

Dans les cellules PtK1, le déclenchement de l'anaphase ne se fait pas tant que persiste un seul kinétochore non connecté par des MTs (Rieder et Salmon, 1994). Ces auteurs montrent qu'à partir du moment où le dernier kinétochore est connecté, il s'écoule un intervalle de temps relativement constant de 23 min avant l'anaphase. Une preuve de l'origine kinétochorienne du signal bloquant la progression de la mitose a été fournie par l'observation de cellules entrant en anaphase 20 min après la destruction spécifique par un laser du dernier kinétochore non encore connecté (Rieder *et al.*, 1995).

Des cellules traitées par de faibles doses de drogues perturbant la dynamique des MTs, comme le taxol ou la vinblastine, sont retardées en métaphase alors que les chromosomes sont alignés (Jordan *et al.*, 1993; Wendell *et al.*, 1993). Ces données ont permis de supposer que le point de contrôle métaphase-anaphase surveille le nombre de MTs insérés dans le kinétochore (attachement), et/ou à la tension qui est appliquée à ces structures après connexion.

Le rôle prépondérant de la tension appliquée aux kinétochores a été mis en évidence dans le cas particulier des spermatocytes de Mante religieuse (Li et Nicklas, 1995). Pendant la méiose I de ces cellules, deux chromosomes X et un chromosome Y sont associés en trivalents. Parfois, un des chromosomes X ne s'apparie pas, ce qui retarde la division en métaphase I. Le fait d'appliquer une force étirant le kinétochore du chromosome X non apparié est suffisant pour déclencher l'anaphase. Aussi, chaque kinétochore semble « émettre » un signal, inhibant le déclenchement de l'anaphase, qui est interrompu quand une tension lui est appliquée. Les éléments permettant de détecter la tension ne sont pas encore identifiés, cependant ce mécanisme implique très probablement la modification de l'état de phosphorylation de protéines du kinétochore. En effet, un anticorps monoclonal (3F3/2) dirigé contre un phosphoépitope reconnaît spécifiquement les kinétochores non attachés au fuseau mitotique (Campbell et Gorbsky, 1995; Gorbsky et Ricketts, 1993). La micro-injection de cet anticorps maintient le phosphoépitope sur les kinétochores et retarde le déclenchement de l'anaphase (Campbell et Gorbsky, 1995). De plus, dans des spermatocytes de sauterelle, les kinétochores ne subissant pas de tension sont fortement décorés par cet anticorps (Nicklas *et al.*, 1995). Cependant, si une tension est appliquée à l'aide d'une micro-aiguille, l'intensité du signal diminue.

Des cribles génétiques chez la levure bourgeonnante ont permis d'identifier des gènes capables de retarder l'anaphase en présence de drogues dépolymérisant les MTs. Ainsi, les gènes *BUB1*, 2 et 3 (pour « Budding Uninhibited by Benzimidazole » (Hoyt *et al.*, 1991) et *MAD1*, 2 et 3 (pour « Mitotic Arrest Deficient » (Li et Murray, 1991) ont été isolés. Ce sont, des composants du point de contrôle métaphase-anaphase dont nous connaissons maintenant partiellement tous les orthologues chez les eucaryotes supérieurs : Mad1, Mad2, Bub1, BubR1 (orthologue de la protéine MAD3 de la levure) et Bub3 (pour revues : (Rieder et Salmon, 1998; Shah et Cleveland, 2000)(Hoyt 2001)). Ces composants se localisent sur le kinétochore ainsi que le phospho-antigène 3F3/2 et d'autres protéines qui semblent participer au contrôle de cette transition métaphase-anaphase, comme CENP-E (Yao *et al.*, 2000), ZW10 (Williams *et al.*, 1992) et Rod (Karess et Glover, 1989).

Chez les mammifères, la protéine Mad2 est essentielle pour le fonctionnement du point de contrôle métaphase-anaphase (Canman *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 1996; Dobles *et al.*, 2000; Gorbsky *et al.*, 1998; Li et Benezra, 1996; Waters *et al.*, 1998). Sa demi-vie sur le kinétochore est d'environ 25 secondes, ce qui signifie qu'elle est rapidement échangée entre le kinétochore et le cytoplasme (Howell *et al.*, 2000). Cet échange rapide tend à expliquer la raison pour laquelle un seul kinétochore non attaché est capable d'empêcher l'entrée en

anaphase et a permis aux auteurs de proposer un modèle de fonctionnement de ce point de contrôle métaphase-anaphase. Selon ce modèle, le kinétochore non attaché (et donc pas sous tension) pourrait catalyser rapidement la formation de complexes Mad2-Cdc20, puis relâcher ceux-ci dans le cytoplasme où ils pourront inhiber le complexe APC/C (Anaphase Promoting Complexe/Cyclosome) (Howell *et al.*, 2000; Kallio *et al.*, 1998; Shah et Cleveland, 2000). APC/C est une ubiquitine ligase (E3) dont l'activité est nécessaire à la dégradation de la cycline B (permettant l'inactivation de p34^{cdc2}) et de protéines devant être dégradées pour permettre la séparation des chromatides sœurs comme les sécurines et Xkid (voir plus haut et pour revue : (Shah et Cleveland, 2000)). BubR1 est aussi capable d'inhiber APC/C en s'associant à son activateur, Cdc20 (Sudakin *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2001). Les autres composant du point de contrôle métaphase-anaphase localisés sur les kinétochores sont supposés favoriser la formation des complexes entre Cdc20 et Mad2 ou BubR1 (Hoyt, 2001; Shah et Cleveland, 2000; Skoufias *et al.*, 2001; Sudakin *et al.*, 2001)

Le mécanisme moléculaire permettant d'inactiver le point de contrôle métaphase-anaphase est peu compris. Toutefois, il est corrélé à la déphosphorylation de l'antigène 3F3/3, rendant compte de la tension générée par les MTs sur le kinétochore, et à la délocalisation de Mad2 du kinétochore qui témoignent de l'attachement de celui-ci au MTs du fuseau de division (pour revue :(Shah et Cleveland, 2000)). Nous verrons dans le chapitre II que la dynéine cytoplasmique participe à la levée d'inhibition de la transition métaphase-anaphase (Howell *et al.*, 2001; Wojcik *et al.*, 2001).

II. Le complexe moteur dynéine cytoplasmique/dynactine

La dynéine a été découverte à l'origine dans les axonèmes où son activité ATPasique joue un rôle essentiel dans le battement des cils et des flagelles (Gibbons et Rowe, 1965). Depuis, une forme cytoplasmique a été identifiée (Lye *et al.*, 1987; Paschal et Vallee, 1987). La dynéine cytoplasmique est impliquée dans le transport de différentes structures vers les bouts (-) des MTs (transport rétrograde), en interphase et en mitose, à une vitesse bien supérieure à celle des kinésines ($> 6\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) (pour revues : (Hirokawa *et al.*, 1998; Holzbaur et Vallee, 1994; King, 2000; Schroer, 1994b; Vallee et Sheetz, 1996)). Elle requiert, dans la plupart de ses fonctions, la contribution de facteurs supplémentaires comme la dynactine.

A. Structure de la dynéine cytoplasmique

La dynéine cytoplasmique est un large complexe multiprotéique d'environ 1,2 MDa (Vallee *et al.*, 1988), qui sédimente à 20 S (Lye *et al.*, 1987; Paschal *et al.*, 1987). Sa structure générale, visualisée par microscopie électronique, est similaire à celle de la dynéine axonémale. Elle est constituée de deux grosses têtes globulaires (contre, parfois, trois pour la dynéine axonémale) de 10 à 14 nm de diamètre, connectées à une base commune par deux tiges minces, le tout mesurant environ 50 nm de la base au sommet des têtes (Vallee *et al.*, 1988). Comme cela avait été observé pour la dynéine axonémale (Goodenough et Heuser, 1984), chaque tête globulaire de la dynéine cytoplasmique dispose d'une tige d'environ 12 nm qui se termine par un petit domaine globulaire d'environ 6 nm de diamètre (Gee *et al.*, 1997) (Fig. 11).

La dynéine cytoplasmique est composée de deux chaînes lourdes (≈ 530 kDa), de trois chaînes intermédiaires (≈ 74 kDa), de deux familles de chaînes légères intermédiaires (≈ 55 kDa), ainsi que de quelques chaînes légères (≤ 29 kDa). A l'exception des chaînes intermédiaires légères, toutes les sous-unités de la dynéine cytoplasmique sont très semblables à celles de la dynéine axonémale. Par ailleurs, l'organisation de toutes ces sous-unités dans le complexe moteur n'est pas encore complètement élucidée.

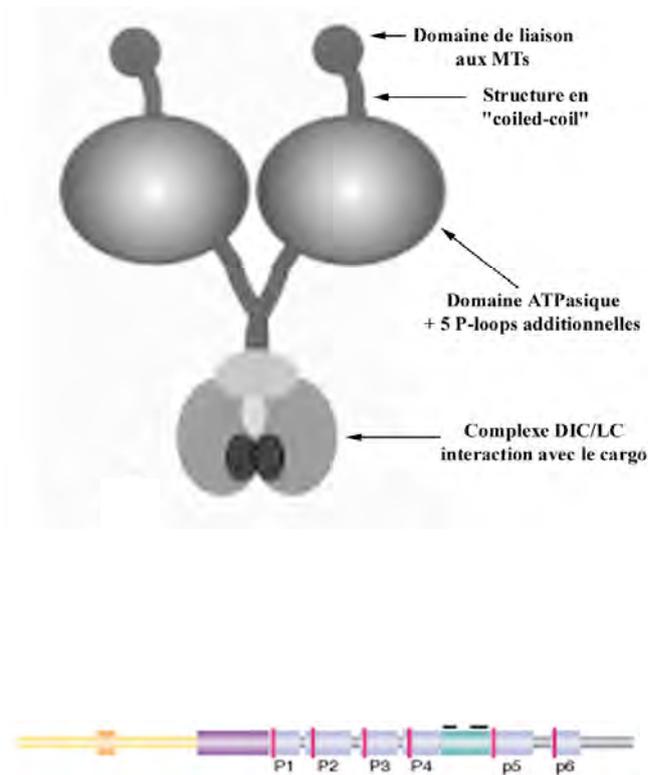


Figure 11 : Architecture de la dynéine et organisation générale d'une DHC

En haut : Architecture grossière de la dynéine cytoplasmique. D'après (King, 2000)

En bas : organisation de la séquence d'une DHC

Les 6 modules AAA (de liaison à l'ATP) apparaissent en bleu. Les barres rouges figurent les motifs « P-loop ». En vert, apparaît le motif de liaison aux MTs avec les deux petits segments noirs représentant les 2 « coiled-coil » qui forment la tige. La queue amino-terminale apparaît en jaune avec une boîte orange correspondant au domaine d'homodimérisation contenant aussi le site d'interaction avec les DICs et les LICs, d'autres sous-unités de la dynéine cytoplasmique.

D'après (Asai et Koonce, 2001)

1. Les chaînes lourdes (HC ou DHC pour « Dynein Heavy Chain »)

Les DHCs sont responsables de l'activité motrice des dynéines cytoplasmique et axonémale (Mazumdar *et al.*, 1996). La structure générale des DHCs est assez conservée (King, 2000). Chaque molécule de DHC dispose d'une partie amino-terminale d'environ 160 kDa qui forme la queue de la molécule. Celle-ci est impliquée dans l'homodimérisation de la DHC et dans des interactions avec d'autres sous-unités de la dynéine (Habura *et al.*, 1999; Tynan *et al.*, 2000a). La partie carboxy-terminale forme, quant à elle, la tête globulaire motrice d'environ 350 kDa. Elle présente, dans sa région centrale, 4 domaines consensuels AAA (« ATPases Associated diverse cellular Activities ») contenant chacun un motif « P-loop » (Mocz et Gibbons, 2001; Neuwald *et al.*, 1999) (Fig.11). Le premier domaine AAA (P1) est le plus conservé des quatre. Il apparaît comme le seul permettant l'hydrolyse de l'ATP et, par conséquent, le mouvement (Gibbons *et al.*, 1987). La relative conservation des 3 autres (P2, P3 et P4) suggère qu'ils sont capables de lier l'ATP et qu'ils sont nécessaires au fonctionnement de la dynéine, mais leur rôle est encore inconnu (Mocz et Gibbons, 1996). Il existe au moins deux autres domaines AAA (P5 et P6), dans la région carboxy-terminale, contenant chacun un motif « p-loop », mais dont la capacité de lier un nucléotide est incertaine (Myster *et al.*, 1999; Neuwald *et al.*, 1999). Les domaines AAA sont supposés

participer activement à la structure de la tête globulaire et un modèle de cette dernière a récemment été publié (Mocz et Gibbons, 2001). Cette structure prédite apparaît sous forme d'une roue divisée en six quartiers (ou secteurs) et dont chacun des quartiers est constitué d'un module AAA. La DHC dispose également, dans son domaine carboxy-terminal, d'un site d'interaction avec les MTs situé au milieu de deux domaines en hélice α (« coiled-coil »), entre les 4 premiers modules AAA (P1, P2, P3 et P4) et les 2 derniers (P5 et P6) (Fig.11). Ces deux domaines « coiled-coil » paraissent responsables de la formation de la tige saillante des domaines globulaires dont nous avons parlé plus haut (Gee *et al.*, 1997; Gibbons *et al.*, 1991; Koonce, 1997) (Fig.11). Les auteurs ont proposé que cette structure pourrait être impliquée dans la transmission de la force entre la portion globulaire du domaine moteur et la surface des MTs.

Initialement, un seul gène codant pour les deux DHCs de la dynéine cytoplasmique avait été recensé dans de nombreux organismes (Holzbaur et Vallee, 1994), comme, par exemple, chez *S. cerevisiae* (Eshel *et al.*, 1993; Stearns, 1997) et *A. nidulans* (Xiang *et al.*, 1994). Cependant, d'autres gènes ont été identifiés dans des organismes plus complexes : trois gènes ont été trouvés chez le rat (CyDn, DLP4 et DLP12) (Tanaka *et al.*, 1995), chez l'Oursin (DHC1a, DHC1b et DHC7c) (Gibbons *et al.*, 1994) et dans les cellules HeLa (DHC1, DHC2 et DHC3) (Vaisberg *et al.*, 1996), et deux gènes ont été identifiés chez la souris (DNCHC1 et DNCHC2) (Vaughan *et al.*, 1996). De plus, deux transcrits de tailles différentes ont été observés pour la DHC1 (Vaisberg *et al.*, 1996) et la DLP4 (Tanaka *et al.*, 1995), indiquant une possibilité d'épissage alternatif.

- Les chaînes lourdes CyDn, DHC1a, DNCHC1 et DHC1 sont orthologues et sont contenues dans la dynéine cytoplasmique conventionnelle initialement caractérisée (ou dynéine cytoplasmique 1) (Holzbaur et Vallee, 1994).
- Les chaînes lourdes DLP4, DHC1b, DNCHC2 et DHC2 apparaissent également orthologues et pourraient être impliquées dans l'organisation et le fonctionnement de l'appareil de Golgi (Vaisberg *et al.*, 1996). De plus, la dynéine cytoplasmique 2 participe au transport rétrograde des particules IFT (Intraflagellar Transport) vers la base du flagelle chez divers organismes eucaryotes (Pazour *et al.*, 1999; Porter *et al.*, 1999). La structure de la DHC2 du rat a été récemment caractérisée (Mikami *et al.*, 2002). Elle apparaît très similaire à celle de la DHC1 dans la région motrice, mais très différente dans la région amino-terminale, à l'exception du domaine impliqué dans la liaison d'autres sous-unités de la dynéine cytoplasmique.

- La DHC3 est l'homologue de la DHC7c de l'oursin et de la DLP12 du rat (Gibbons *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1995). Compte tenu de leur séquence en acides aminés, ces trois protéines avaient été classées initialement parmi les dynéines axonémales. Cependant, le fait que la DHC3 a été isolée à partir de cellules ne possédant pas de cil ou de flagelle, ainsi que sa localisation intracellulaire, ont conduit les auteurs à l'associer à une forme cytoplasmique de dynéine, dont la fonction est encore inconnue (Vaisberg *et al.*, 1996).

La répartition intracellulaire de ces différentes DHCs, ainsi que la taille des complexes moteurs les incluant, sont différentes (Criswell *et al.*, 1996; Vaisberg *et al.*, 1996). Il est donc fort probable que les dynéines cytoplasmiques soient composées de deux exemplaires de DHC provenant d'un même gène (Mikami *et al.*, 1993; Neely *et al.*, 1990). Les différents complexes moteurs, formés avec les différentes DHCs, sont donc probablement impliqués dans des fonctions différentes.

Remarque : *Nous parlerons par la suite principalement de la dynéine cytoplasmique conventionnelle (ou de dynéine cytoplasmique 1) en référence au moteur cytosolique caractérisé originellement et contenant la chaîne lourde humaine DHC1 ou son orthologue chez les différents organismes eucaryotes.*

2. Les chaînes intermédiaires (IC : « Intermediate Chain » ou DIC : « Dynein Intermediate Chain »)

Les DICs ont été localisées par microscopie électronique à la base du complexe moteur (Steffen *et al.*, 1996). Le site d'interaction de la DHC avec les DICs se situe dans son domaine amino-terminal, plus précisément dans la région responsable de l'homodimérisation de la DHC (Habura *et al.*, 1999; Tynan *et al.*, 2000a) (Fig. 11). Compte tenu de cette localisation dans le complexe moteur, les DICs sont supposées permettre l'adressage du moteur vers les organites à transporter (Paschal *et al.*, 1992). Un rôle analogue avait déjà été attribué aux DICs de la dynéine axonémale (Vallee et Sheetz, 1996), et des travaux plus récents semblent confirmer cette hypothèse. En effet, la présence d'anticorps dirigés contre les DICs empêchent le chargement *in vitro* de la dynéine cytoplasmique sur des organelles membranaires, dans des extraits d'ovocytes de Xénope (Steffen *et al.*, 1997).

Les parties carboxy-terminales des DICs de dynéines axonémales et cytoplasmiques sont conservées (Paschal *et al.*, 1992; Vaughan et Vallee, 1995) et pourraient être impliquées dans l'interaction avec les DHCs. En revanche, les parties amino-terminales divergent

fortement. Elles pourraient donc être responsables d'interactions avec des éléments spécifiques des axonèmes ou du transport cytoplasmique.

L'analyse biochimique des DICs de la dynéine cytoplasmique a révélé jusqu'à six mobilités électrophorétiques différentes (Dillman et Pfister, 1994; Vaughan et Vallee, 1995). Au moins 5 ADNc ont été identifiés, résultant de l'épissage alternatif de deux gènes différents (Paschal *et al.*, 1992; Vaughan et Vallee, 1995). Alors que les ARNm issus du gène IC-2 semblent ubiquitaires dans les tissus de rat, les ARNm issus du gène IC-1 apparaissent spécifiques des testicules. La justification fonctionnelle de la multiplicité des isoformes de DICs est encore inconnue.

3. Les chaînes légères intermédiaires (LIC : « Light Intermediate Chain »)

La dynéine cytoplasmique conventionnelle est également composée de différentes chaînes légères intermédiaires dont la mobilité électrophorétique varie entre 53 et 59 kDa chez le bœuf (Paschal et Vallee, 1987), et entre 52 et 61 kDa chez la poule (Gill *et al.*, 1994). Les LICs interagissent avec le domaine amino-terminal de la DHC, sur un site chevauchant celui qui est responsable du recrutement des DICs (Tynan *et al.*, 2000a).

Les LICs sont issues de l'expression d'au moins deux gènes permettant la synthèse de deux familles : DLC-A (ou LIC-1) et DLC-B (ou LIC-2) (Gill *et al.*, 1994; Hughes *et al.*, 1995). La complexité de la migration électrophorétique des LICs est, au moins en partie, due à la phosphorylation des produits de ces deux gènes. En effet, un traitement par la phosphatase alcaline de ces LICs réduit le nombre de bandes observées en électrophorèse « SDS-PAGE » (Gill *et al.*, 1994; Hughes *et al.*, 1995).

Les LICs sont probablement des protéines globulaires, si on se réfère à leur séquence polypeptidique. Elles disposent de nombreuses séquences consensuelles de phosphorylation, et d'une séquence consensuelle de liaison aux nucléotides située dans leur partie amino-terminale. Les fonctions de ces LICs au sein de la dynéine cytoplasmique sont encore inconnues, mais la présence d'un site « P-loop » dans leur séquence laisse supposer qu'il s'agit d'ATPases, probablement impliquées dans la motricité ou dans la régulation du fonctionnement du complexe moteur. Cela étant, une étude récente a permis de montrer que la péricentrine, une protéine centrosomale, interagit directement avec LIC1 et non LIC2 (Tynan *et al.*, 2000b). De plus, la présence de LIC1 et celle de LIC2 dans le complexe de la dynéine cytoplasmique sont mutuellement exclusives, ce qui suggère l'existence d'au moins deux

sous-populations de dynéines cytoplasmiques dont les LICs spécifieraient la localisation et donc les fonctions.

Récemment, une LIC spécifique de la dynéine cytoplasmique 2 (contenant la DHC2) a été identifiée. Il s'agit de la LIC3 qui, en dépit d'une certaine divergence par rapport aux LIC1 et LIC2, contient une « P-loop » dans son domaine amino-terminal et présente, dans la région environnant le motif « P-loop », certaines similitudes avec des ATPases connues (Mikami *et al.*, 2002).

4. Les chaînes légères (LC : « Light Chain »)

Les LCs se localisent à la base du complexe moteur et semblent interagir directement avec les DICs (King *et al.*, 2002; Makokha *et al.*, 2002). Certaines LCs dont la LC8, Tctex1 et roadblock/LC7, sont partagées par la dynéine cytoplasmique et la dynéine axonémale (pour revue : (King, 2000)).

Des études biochimiques ont révélés que des dimères de la LC8, originellement identifiée dans une dynéine flagellaire de *Chlamidomonas* (King et Patel-King, 1995), s'associent à la dynéine cytoplasmique et à la myosine V (Benashski *et al.*, 1997; King *et al.*, 1996a). Cette petite protéine de 8 kDa très conservée (depuis le nématodes jusqu'aux mammifères en passant par les plantes) est également impliquée dans l'inhibition d'une enzyme neuronale, appelée : « nitric oxide synthase » (Jaffrey et Snyder, 1996). Sachant, de plus, qu'elle est présente dans de nombreux systèmes enzymatiques, il est possible qu'elle participe à des mécanismes généraux de régulation de différentes catégories d'enzymes. La mutation de *nudG*, l'orthologue du gène de la LC8 chez *Aspergillus nidulans*, provoque de nombreux défauts dans des processus liés au fonctionnement de la dynéine cytoplasmique comme une inhibition de la migration des noyaux dans l'hyphe, conduisant à des problèmes de sporulation (Beckwith *et al.*, 1998). Chez la drosophile, le gène *LC8* est essentiel et une perte de fonction partielle de ses allèles provoque notamment des défauts de croissance et de guidage des axones au cours du développement embryonnaire (Dick *et al.*, 1996; Phillis *et al.*, 1996). Ces défauts phénotypiques ne sont pas seulement liés à un dysfonctionnement de la dynéine cytoplasmique. Ils seraient aussi causés pas un dérèglement d'activités enzymatiques auxquelles la LC8 est associée. En outre, une publication récente indique l'existence, chez

certaines espèces, de trois LC8 différentes (LC8a, LC8b et LC8c) dont l'expression semble être tissu spécifique (Wilson *et al.*, 2001).

Tctex1 est une protéine de 14 kDa, commune à une dynéine axonémale et à la dynéine cytoplasmique, identifiée chez la souris (Harrison *et al.*, 1998; King *et al.*, 1996b). L'analyse des banques de données a révélé l'existence de plusieurs autres protéines apparentées à Tctex1, comme rp3. Cette dernière, qui peut être aussi un composant de la dynéine cytoplasmique (King *et al.*, 1998), a été identifiée par ailleurs comme une protéine dont certaines mutations seraient impliquées dans une *retinitis pigmentosa* liée au chromosome X (Roux *et al.*, 1994).

L'expression des LCs Tctex1 et rp3 varie au cours du développement embryonnaire et en fonction des tissus. Par exemple, la transcription du gène Tctex1 est considérablement augmentée dans le cerveau embryonnaire et se trouve inhibée dans le cerveau adulte (Kai *et al.*, 1997). La LC rp3 suit, quant à elle, le patron d'expression opposé à celui de Tctex1 dans le cerveau (Roux *et al.*, 1994). Ces données suggèrent que les différentes LCs de la famille Tctex1 jouent un rôle dans le recrutement de cargos spécifiques. Corroborant cette hypothèse, des expériences d'immuno-localisation, de co-immunoprécipitation et de fractionnement cellulaire ont révélé que des populations de dynéines cytoplasmiques, distinctes par leurs fonctions cellulaires respectives, contiennent des LCs de la famille Tctex1 différentes (Chuang *et al.*, 2001; King *et al.*, 1998; Tai *et al.*, 1998). De plus, des expériences de sur-expression dans des cellules de mammifères, ont révélé l'existence d'une compétition entre Tctex1 et rp3 pour leur interaction avec la DIC, et des fonctions différentes pour la dynéine cytoplasmique selon la présence de l'une ou l'autre des deux LCs (Tai *et al.*, 2001).

La p29 est une LC dont la phosphorylation dépend de seconds messagers comme l'AMPc et le Ca^{2+} , et contrôle la vitesse de glissement des MTs par la dynéine axonémale 22S. Cette protéine permet donc de réguler la vitesse de déplacement d'organismes comme *Paramecium* (Barkalow *et al.*, 1994; Hamasaki *et al.*, 1991). De la p29 marquée immunoprécipite avec la dynéine cytoplasmique de *Paramecium* et de rat (Wang et Satir, 1998). Cette observation suggère que la p29, ou une protéine homologue chez le rat, pourrait également avoir un rôle de régulation dans l'activité motrice de la dynéine cytoplasmique.

Les LCs de la famille *Roadblock/LC7* ont été identifiées dans la dynéine flagellaire de *Chlamydomonas* et dans la dynéine cytoplasmique conventionnelle des mammifères

(Bowman *et al.*, 1999). Des mutations dans une protéine apparentée à LC7 chez la drosophile, appelée *Roadblock*, provoquent des défauts dans le transport axonal et la mitose. Cela suggère que cette famille de LCs joue un rôle essentiel dans le fonctionnement de la dynéine cytoplasmique.

5. Régulation de la dynéine cytoplasmique par phosphorylation

Presque toutes les sous-unités de la dynéine cytoplasmique peuvent être phosphorylées (Dillman et Pfister, 1994). Ceci offre donc de multiples possibilités de régulation de sa motricité ou de son adressage. Par exemple, les DHCs de la dynéine cytoplasmique présentes sur des organelles transportées vers le bout (+) des MTs axonaux sont moins phosphorylées que les DHCs cellulaires (Dillman et Pfister, 1994). La dynéine n'intervenant pas dans le transport antérograde, cette différence de phosphorylation pourrait permettre d'inactiver le moteur aux moments opportuns. De plus, il a été montré que pendant la mitose, la dynéine cytoplasmique est 7 fois moins associée aux membranes que pendant l'interphase. Cette différence de localisation est corrélée à une augmentation de la phosphorylation des LICs d'environ 12 fois pendant la mitose (Niclas *et al.*, 1996). A ce propos, l'observation par chromatographie d'affinité d'une association (directe ou indirecte) des DICs avec la caséine kinase II (CKII) de rat (Karki *et al.*, 1997) est de ce point de vue très intéressante. En effet, cette sérine/thréonine kinase est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, dans la division cellulaire, et la transduction de signaux (Litchfield et Luscher, 1993; Pepperkok *et al.*, 1994). Par ailleurs, une étude plus récente indique que la phosphorylation de la sérine 84 de la DIC (isoforme IC-2C, purifiée à partir du foie de rat) inhibe son interaction avec la p150^{Glued}, une sous-unité de la dynactine, le principal co-facteur de la dynéine cytoplasmique (voir le paragraphe B. qui suit) (Vaughan *et al.*, 2001). Cela constitue probablement un moyen très efficace de contrôler l'activité de la dynéine cytoplasmique puisque la dynactine est absolument requise pour le fonctionnement de ce moteur moléculaire dans de nombreux processus cellulaires (voir plus loin). Confirmant cette dernière hypothèse, la sur-expression d'une forme d'IC-2C dont la sérine 84 a été remplacée par une alanine provoque un dysfonctionnement notable dans le transport de vésicules golgiennes par la dynéine cytoplasmique, tandis que la sur-expression d'une forme d'IC-2C dont la sérine 84 a été remplacée par un aspartate (mimant la phosphorylation) n'a aucun effet visible (Vaughan *et al.*, 2001).

B. La dynactine

La dynéine cytoplasmique conventionnelle (nommée dynéine par la suite) nécessite la contribution de facteurs supplémentaires pour induire le mouvement des organites.

De la dynéine partiellement purifiée sur un gradient de saccharose (dynéine 20 S), et immobilisée sur une surface anionique inerte, possède une activité motrice qui permet le glissement lent ($0,5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) de MTs stabilisés par le taxol (Lye *et al.*, 1987; Paschal et Vallee, 1987; Schroer *et al.*, 1989). Cette activité est conservée même après une purification plus intense de la dynéine par chromatographie échangeuse d'ions (Schroer et Sheetz, 1991). Cependant l'absence d'organite susceptible d'être transporté par la dynéine dans ces expériences, ne permet pas de conclure sur le mode de fonctionnement de la dynéine dans les cellules.

Un essai *in vitro* mesurant la motilité le long de MTs de vésicules extraites par de hautes concentrations salines, a été mis au point à la fin des années « quatre-vingts » pour permettre d'identifier les fractions solubles responsables de l'activité motrice (Schroer *et al.*, 1988; Schroer *et al.*, 1989). Alors que la dynéine peut elle-même induire la liaison de vésicules purifiées aux MTs, le déplacement effectif de ces vésicules semble dépendre de la présence d'au moins deux facteurs supplémentaires (Schroer et Sheetz, 1991). Le premier de ces facteurs est encore inconnu. Il sédimente à 9 S et augmente la fréquence et la vitesse du transport des vésicules. Le second facteur, appelé maintenant dynactine (pour revues : (Allan, 1996; Allan, 2000; Holleran *et al.*, 1998; Schroer, 1996)), permet d'augmenter la fréquence du transport, à une vitesse relativement faible ($0,6 \mu\text{m/s}$), qui n'avait pas lieu avec la seule dynéine.

Ces données préliminaires laissaient supposer que la dynactine pourrait favoriser la liaison de la dynéine à la surface des vésicules, permettant ainsi un niveau basal de déplacement qui pourrait être stimulé ensuite par d'autres facteurs. Cependant, la dynéine est, par elle-même, capable de lier les vésicules sur les MTs. Cela suggère fortement que la dynactine a un rôle bien plus complexe que celui d'un simple récepteur du moteur moléculaire sur les organites à transporter.

1) Structure de la dynactine

La dynactine est un complexe multiprotéique d'environ 1,2 mDa sédimentant à 20 S. Bien que majoritairement soluble (Gill *et al.*, 1991; Paschal *et al.*, 1993), on retrouve de la

dynactine associée à des fractions enrichies en membranes golgiennes (Fath *et al.*, 1994). Ce co-facteur de la dynéine consiste en 11 sous-unités polypeptidiques distinctes (Fig.12) qui ont toutes été clonées et séquencées dans diverses espèces (Allan, 2000; Eckley *et al.*, 1999). Il s'agit de : p150^{Glued}, p62, p50, Arp1 (45 kDa), l'actine conventionnelle, Arp11 (43 kDa), p37, p32, p27, p25 et p24.

L'imagerie par microscopie électronique de complexes individuels de dynactine a permis de visualiser la structure générale du complexe, et de localiser quelques-uns de ses constituants par l'utilisation d'anticorps spécifiques (Schafer *et al.*, 1994a). Plus récemment, certaines précisions concernant la localisation des différentes sous-unités ont été apportées par des techniques biochimiques couplées à une analyse ultra structurale de sous-complexes de dynactine (Eckley *et al.*, 1999). Globalement, la dynactine se présente comme un filament de 37 nm de long (ou l'épine dorsale de la dynactine), ressemblant à un court filament d'actine, et d'une projection latérale (ou bras latéral) divisible en 2 domaines : le domaine proximal, au contact de l'épine dorsale, est variable en taille et en orientation, ce qui reflète probablement une certaine flexibilité de la molécule à cet endroit ; le domaine distal est, quant à lui, constitué d'un filament de 24 nm de long terminé par deux petites régions globulaires de 4 à 6 nm de diamètre. La répartition, connues ou supposées (voir plus loin), des divers constituants du complexe dynactine est illustrée dans la figure 12.

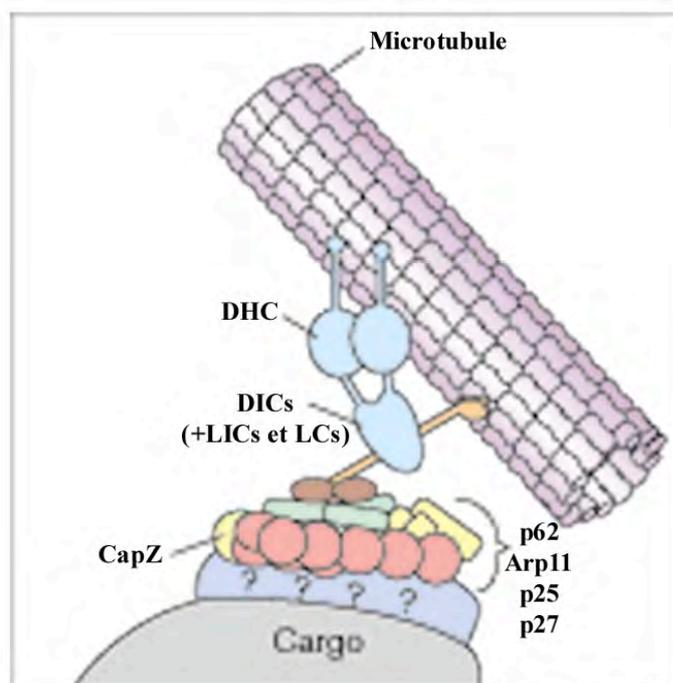


Figure 12 : Modèle du complexe dynactine et de ses interactions avec les MTs et la dynéine cytoplasmique (en bleu).

La dynactine contient 8 ou 9 molécules d'Arp1 (en rose), 4 ou 5 molécules de p50 (en vert), 2 molécules de p150^{Glued} (en orange), 2 molécules de p24 (en marron), un exemplaire de chaque isoforme de p62, possiblement une molécule d'actine G, Arp11, CapZ, p27 et p25 (en jaune).
D'après (Allan, 2000).

a) Le filament Arp1

Le filament de 37 nm est majoritairement constitué de la protéine Arp1 (« Actin Related Protein 1 »), à raison de 8 ou 9 molécules par filament et dont la masse moléculaire est d'environ 45 kDa (Schafer *et al.*, 1994a). Au moins deux isoformes d'Arp1 différentes ont été trouvées dans la dynactine, avec environ 94% d'Arp1 α et 6% d'Arp1 β (Clark *et al.*, 1994).

Initialement appelée « actine RPV » pour « Actin Related Protein from Vertebrates » chez l'homme (Lees-Miller *et al.*, 1992), ou contractine pour son orthologue canin (Clark et Meyer, 1992; Schroer, 1994a), Arp1 présente environ 60% d'identité avec l'actine conventionnelle (Schroer, 1996). Les séquences les mieux conservées par rapport à l'actine correspondent aux sites de liaison des nucléotides ou aux cations divalents. Les régions impliquées dans la polymérisation de l'actine, ou dans son interaction avec d'autres protéines sont, quant à elles, nettement moins conservées (Clark *et al.*, 1994; Lees-Miller *et al.*, 1992).

Contrairement à l'actine, la protéine Arp1 n'est pas détectée sous sa forme monomérique dans le cytosol, mais uniquement assemblée dans une structure sédimentant à 20 S (Paschal *et al.*, 1993). Aussi, la dynactine est, à ce jour, le seul complexe multiprotéique connu contenant Arp1 (Schroer, 1996). La sur-expression *in vivo* d'Arp1 provoque la formation de structures filamenteuses de tailles variables (Holleran *et al.*, 1996). Ceci suggère que la taille fixe du filament Arp1 au sein de la dynactine n'est pas une caractéristique intrinsèque de la protéine Arp1, mais plutôt une propriété imposée par son interaction avec d'autres protéines. A ce propos, le filament Arp1 est flanqué d'un côté de deux protéines de 37 et 32 kDa connues pour s'associer à l'actine, et de l'autre d'un complexe composé des protéines : p62, p25, p27 et Arp11 (Eckley *et al.*, 1999; Garces *et al.*, 1999; Schafer *et al.*, 1994a). Aussi, l'apparente stabilité et l'uniformité de la taille du filament Arp1 pourraient être dues à la liaison, à ses deux extrémités, de ces protéines dont voici une brève description :

- Les deux polypeptides de 37 et 32 kDa ont été identifiés, sur la base de leur migration électrophorétique et par l'emploi d'anticorps spécifiques, comme étant les sous unités α (Hughes *et al.*, 1995) et β 2 (Schafer *et al.*, 1994b) d'une protéine s'associant à l'extrémité (+) (ou barbée) de l'actine, dénommée CapZ dans le muscle squelettique (Casella *et al.*, 1987).
- La p62, dont il existe deux isoformes, s'associe à l'extrémité (-) (pointue) du filament Arp1. Elles pourraient aussi permettre à la dynactine, et probablement à la dynéine,

d'interagir avec l'actine du cortex cellulaire (Eckley *et al.*, 1999; Garces *et al.*, 1999; Karki *et al.*, 2000).

- Les protéines de 25 et 27 kDa semblent aussi se localiser à l'extrémité (-) du filament Arp1 avec la p62. L'analyse de leur séquence a révélé la présence de motifs consensuels susceptibles de permettre leur interaction avec différents organites (Eckley *et al.*, 1999).
- Enfin, une autre protéine de 43 kDa est présente dans le complexe composé de la p62, la p25 et la p27, localisé au bout (-) du filament d'Arp1. Il s'agit d'une autre « Actine Related Protein » nommée Arp11 (Eckley *et al.*, 1999), dont la séquence suggère un rôle dans la stabilisation du filament d'Arp1, de façon analogue à CapZ à l'autre extrémité.

Le complexe composé de p62, p25, p27, et Arp11 forme, au bout (-) ou pointu du filament d'Arp1, une structure ronde de 8 nm de diamètre, ressemblant au complexe Arp2/3 qui est connu pour réguler localement l'assemblage de l'actine (Mullins *et al.*, 1998; Mullins *et al.*, 1997).

La présence d'une molécule d'actine conventionnelle au sein du complexe dynactine (Schafer *et al.*, 1994a) est toujours controversée, et sa localisation dans le complexe reste inconnue. Il a été rapporté qu'*in vitro*, Arp1 pourrait co-polymériser avec l'actine (Melki *et al.*, 1993). Cependant, les filaments formés après sur-expression d'Arp1 ne se co-localisent pas avec les microfilaments d'actine, et ont des propriétés pharmacologiques différentes (Holleran *et al.*, 1996). Si on écarte l'hypothèse d'une intégration de la molécule d'actine dans le filament Arp1, une possibilité serait son association avec la protéine CapZ présente dans le complexe dynactine. Cependant l'actine semble absente des immunoprécipitats de dynactine et des préparations de dynactine purifiée par affinité (Eckley *et al.*, 1999; Holleran *et al.*, 1996). Ces données suggèrent que l'actine n'est pas un élément à part entière du complexe dynactine, mais elle pourrait y être associée, par exemple, lors d'interactions avec d'autres polypeptides.

b) Le bras latéral et la p150^{Glued}

La partie distale du bras latéral de la dynactine contient deux molécules de p150^{Glued} (Schafer *et al.*, 1994a). Initialement cloné chez la poule (Gill *et al.*, 1991) et le rat (Holzbaur *et al.*, 1991; Holzbaur *et al.*, 1992), la séquence de cette protéine présentait de fortes similitudes avec celle de la protéine Glued essentielle au développement précoce de la drosophile (Swaroop *et al.*, 1987). Les études qui ont suivi ont révélé que la protéine Glued

fait partie du complexe dynactine chez la drosophile et constitue l'orthologue fonctionnel de la p150^{Glued} des vertébrés (McGrail *et al.*, 1995; Waterman-Storer et Holzbaur, 1996).

La p150^{Glued} semble être codée par un seul gène chez les vertébrés (Gill *et al.*, 1991) (Holzbaur *et al.*, 1991; Holzbaur et Tokito, 1996), et chez la Drosophile (Swaroop *et al.*, 1986). Cependant, l'épissage alternatif du transcrite semble permettre de coder au moins 3 isoformes de la protéine, ayant des mobilités électrophorétiques différentes, selon les espèces et les tissus. Trois isoformes migrant entre 160 et 150 kDa ont été découvertes chez la poule (Gill *et al.*, 1991), et deux isoformes migrant à 150 et 135 kDa sont détectées dans des extraits de cerveau de rat et de veau (Paschal *et al.*, 1993) et dans les neurones humains (Tokito *et al.*, 1996). Ces derniers auteurs montrent que l'isoforme de 135 kDa, apparemment spécifique du cerveau, est dépourvue du site de liaison aux MTs (voir plus bas). Les isoformes de 150 et 135 kDa apparaissant associées à des complexes dynactines différents, ce qui suggère un rôle spécifique dans le cerveau d'un complexe dynactine incapable d'interagir directement avec les MTs.

De façon analogue aux vertébrés, on trouve trois isoformes de 160, 145, et 135 kDa chez la drosophile (McGrail *et al.*, 1995), bien que dans ce cas un seul transcrite soit détecté. La séquence de la p150^{Glued} permet de prédire l'existence de deux domaines en hélice α qui a été confirmée en spectroscopie par dichroïsme circulaire (Schroer, 1996), laissant supposer une homodimérisation des deux molécules de p150^{Glued} au sein de chaque complexe.

La p150^{Glued} dispose de plusieurs domaines d'interaction avec des partenaires différents (Fig.13) :

- La p150^{Glued} de rat peut interagir directement avec la protéine Arp1 par un domaine contenu dans ses 1286 résidus acides aminés carboxy-terminaux (Waterman-Storer *et al.*, 1995). Ces auteurs montrent en outre que cette interaction dépend du motif chargé « KKEK », situé dans la partie carboxy-terminale de la p150^{Glued}, et qui est très conservé dans de nombreuses espèces. Ce motif est connu, par ailleurs, pour être impliqué dans la liaison de la villine à l'actine (Friederich *et al.*, 1992).
- *In vitro*, la p150^{Glued} peut interagir directement avec les chaînes intermédiaires de la dynéine (Karki et Holzbaur, 1995; Vaughan et Vallee, 1995). Cette interaction semble se faire par l'intermédiaire d'un domaine situé entre les acides aminés 150 à 811 de la p150^{Glued} de rat, et un domaine localisé entre les acides aminés 1 à 123 de la chaîne intermédiaire IC-2A de la dynéine (Vaughan et Vallee, 1995).
- Le domaine amino-terminal de la p150^{Glued} contient un motif de type CAP-GLY (Li *et al.*, 2002; Riehemann et Sorg, 1993) permettant la liaison aux MTs, et que l'on retrouve

dans d'autres protéines comme la CLIP-170 et les protéines apparentées dont nous parlerons dans le chapitre IV. Le motif CAP-GLY de la p150^{Glued} est compris entre les acides aminés 39 et 150 de la protéine de rat ; il est absolument requis pour la liaison aux MTs (Waterman-Storer *et al.*, 1995). Autrement dit, il n'existe pas d'autre domaine, dans la p150^{Glued}, permettant l'interaction avec les MTs.

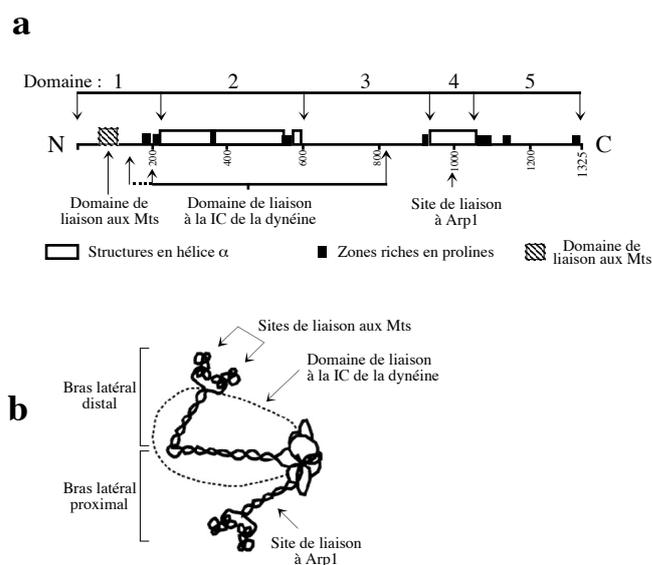


Figure 13: Structure prédite de la p150^{Glued}. (a) Principaux domaines et localisation des sites d'interaction avec d'autres protéines. (b) Modèle de structure d'un homodimère de p150^{Glued}. La région délimitée par des pointillés entoure la zone prédite d'interaction avec la IC de la dynéine.

D'après (Schroer, 1996).

c) Les autres protéines du complexe dynactine

Nous ne connaissons pas les fonctions de la p24 au sein du complexe dynactine. Néanmoins, une étude biochimique a permis de localiser cette protéine dans la région du bras latéral proximal, probablement associée physiquement à la p150^{Glued} (Eckley *et al.*, 1999).

La p50, ou dynamitine, est un polypeptide de 50 kDa présent à raison de 4 ou 5 copies par complexe dynactine (Eckley *et al.*, 1999; Paschal *et al.*, 1993; Schafer *et al.*, 1994a). Sa séquence protéique ne révèle pas de similitude significative avec d'autres protéines connues. Cependant, sa structure générale est comparable au produit du gène *JNMI*, protéine nécessaire à la migration nucléaire et à l'orientation du fuseau mitotique chez *S. cerevisiae* (McMillan et Tatchell, 1994). Sa séquence suggère la formation de trois domaines en hélice α répartis le long de la molécule, susceptibles de permettre sa multimérisation et/ou son association avec d'autres sous-unités de la dynactine (Echeverri *et al.*, 1996). La localisation précise de la dynamitine dans le complexe est inconnue. Toutefois, un excès de p50 dans un essai *in vitro* ou la sur-expression de la p50 dans des cellules de mammifères provoque la

dissociation de la dynactine en deux sous-complexes. Le premier sous-complexe contient la p150^{Glued}, la p24 et la p50 suivant un rapport : 2 :2 :4, et le second sous-complexe contient Arp1, la p62, CapZ, l'actine conventionnelle et de la p50 dans des proportions comparables à celles que l'on a constatées dans le complexe entier (Eckley *et al.*, 1999). Somme toute, chacun des 2 sous-complexes contient environ 4 exemplaires de p50. La p50 jouerait donc un rôle dans l'interaction entre le filament d'Arp1 et le bras latéral contenant la p150^{Glued} et pourrait donc se localiser dans le domaine proximal du bras latéral de la dynactine (Fig.12).

2) La dynactine interagit avec la dynéine

La presque totalité des données publiées concernant la dynactine incite à lui attribuer un rôle associé à la dynéine dans de multiples organismes. En effet, la dynactine a été d'abord identifiée par sa capacité d'activer le transport de vésicules *in vitro* par la dynéine (Schroer et Sheetz, 1991). De plus, la dynéine et la dynactine ont des distributions similaires en interphase (Schroer, 1996), et en mitose (Echeverri *et al.*, 1996). Par ailleurs, un certain nombre d'arguments indiquent des fonctions communes, *in vivo*, pour la dynéine et la dynactine, dont voici quelques exemples :

Chez la *Drosophila*, la p150^{Glued} et la dynéine se co-distribuent pendant l'ovogenèse et ce dans divers contextes génétiques (McGrail *et al.*, 1995). La mutation *Gl^l*, du gène codant pour la p150^{Glued}, provoque la synthèse d'une protéine ne s'associant plus à la dynactine. Le phénotype de cette mutation est caractérisé, chez les hétérozygotes, par une altération de l'organisation rétinienne et des autres tissus des yeux composés, aboutissant à une réduction de la taille et un aspect rugueux (Meyerowitz et Kankel, 1978). Des gènes suppresseurs ou des gènes aggravant ce phénotype ont été découverts parmi ceux qui codent les sous-unités de la dynéine comme *Dhc64C*, le gène codant la chaîne lourde (McGrail *et al.*, 1995). Ces données suggèrent une implication de la dynéine et de la dynactine dans des processus cellulaires communs chez la drosophile.

Chez *Neurospora crassa*, des mutations dans les orthologues de la chaîne lourde de dynéine, de la p150^{Glued} et d'Arp1 (gènes *ro-1 ro-3* et *ro-4* respectivement) altèrent de façon identique la distribution nucléaire pendant l'élongation de l'hyphe (Bruno *et al.*, 1996; Plamann *et al.*, 1994; Tinsley *et al.*, 1996). Des résultats analogues ont été obtenus chez *Aspergillus nidulans* (Morris, 2000).

L'inactivation du gène codant pour l'orthologue de la protéine Arp1 chez *Saccharomyces cerevisiae* provoque une altération de la migration nucléaire et de

l'orientation du fuseau (Clark *et al.*, 1994; Muhua *et al.*, 1994) similaire à celles observées lorsque la dynéine est inactivée (Eshel *et al.*, 1993). Par ailleurs, l'existence d'un complexe dynactine comportant au moins les homologues des protéines Arp1, dynamitine, et p150^{Glued} a pu être mise en évidence chez la levure (Kahana *et al.*, 1998).

La p150^{Glued} peut interagir directement avec les chaînes intermédiaires (protéines de mammifères) de la dynéine *in vitro* (Karki et Holzbaur, 1995; Vaughan et Vallee, 1995). Cette interaction est inhibée par la phosphorylation de la DIC sur la sérine 84 (Vaughan *et al.*, 2001) (voir plus haut). De plus l'altération *in vivo* du complexe dynactine, après la sur-expression de sa sous-unité dynamitine p50, provoque une altération de la répartition d'organites membranaires similaire à celle observée après inactivation de la dynéine (Burkhardt *et al.*, 1997). De même, la sur-expression de la dynamitine provoque une délocalisation de la dynéine des kinétochores (Echeverri *et al.*, 1996). En outre, la présence d'anticorps, dirigés contre la chaîne intermédiaire de la dynéine, réduit l'efficacité avec laquelle la dynactine s'associe au MTs d'asters assemblés *in vitro*, et réduit son association aux pôles des fuseaux mitotiques *in vivo* (Gaglio *et al.*, 1997). Cela suggère une association coopérative des deux complexes avec les MTs.

Il existe donc de multiples arguments en faveur d'une association entre la dynéine et la dynactine. Cependant les immunoprécipitations faites sur quelques constituants des deux complexes n'a jamais permis, jusqu'à maintenant, de les co-précipiter directement, dans des conditions physiologiques (Clark *et al.*, 1994; Paschal *et al.*, 1993; Vaughan et Vallee, 1995). En fait, l'immunoprécipitation des constituants de la dynactine par un anticorps dirigé contre la chaîne intermédiaire de la dynéine n'a été rendue possible qu'après avoir ajouter aux extraits cellulaires des chaînes intermédiaires purifiées (Vaughan et Vallee, 1995). Cela suggère que l'association entre dynéine et dynactine doit faire l'objet d'une régulation très élaborée *in vivo*. La phosphorylation de la DIC joue certainement un rôle important (Vaughan *et al.*, 2001), mais n'exclut pas l'intervention de tierces protéines.

3) Association de la dynactine avec d'autres protéines

Chez le xénope, l'immunoprécipitation de la protéine NuMa a montré que celle-ci forme un complexe avec la dynéine et la dynactine qui est nécessaire à l'assemblage de fuseaux mitotiques *in vitro* (Merdes *et al.*, 1996).

Une recherche par « double hybride » de protéines humaines pouvant interagir avec le moteur apparenté à la kinésine Eg5, a mis en évidence la sous-unité p150^{Glued} de la dynactine (Blangy *et al.*, 1997). Ces auteurs ont montré que cette association a lieu également *in vitro* entre des complexes purifiés, et qu'elle peut être stimulée par la phosphorylation de Eg5 par la protéine kinase p34^{cdc2}. Ces derniers résultats suggèrent que l'association entre ces différents complexes doit être étroitement contrôlée pour être fonctionnelle. A ce propos, il a été montré que la phosphorylation de la p150^{Glued} *in vivo*, sur des résidus sérines, est corrélée avec un accroissement du transport vésiculaire interphasique dans des cellules de mammifères (Farshori et Holzbaur, 1997). De plus, une kinase associée à la dynactine pourrait être nécessaire *in vitro* au déplacement de phagosomes généré par la dynéine (Blocker *et al.*, 1997).

Plus récemment il a été montré, par des approches biochimiques que la p150^{Glued}, la p50 ainsi que la DIC interagissent avec EB1. Ces interactions sont indépendantes d'APC et des MTs (Berrueta *et al.*, 1999). Cette interaction semble nécessaire au recrutement de la p150^{Glued} et de tubuline γ au centrosome ainsi qu'au maintien du déploiement radiaire de MTs au centrosome (focalisation des bouts (-) et ancrage des MTs) (Askham *et al.*, 2002).

La dynactine interagit également avec la petite GTPase Rab6 qui semble contrôler ainsi le recrutement du complexe moteur sur les membranes golgiennes (Short *et al.*, 2002).

4) Fonctions de la dynactine vis-à-vis de la dynéine

a) La dynactine n'est probablement pas un activateur de l'activité ATPasique de la dynéine

La dynactine est nécessaire à la dynéine pour engendrer un déplacement de vésicules lors de tests de motilité réalisés *in vitro* (Schroer et Sheetz, 1991). Cela semble se confirmer *in vivo*, car l'inactivation de la dynactine, par la sur-expression de la dynamitine dans des cellules interphasiques de mammifères, provoque effectivement une altération du transport de différents organites membranaires (Burkhardt *et al.*, 1997; Presley *et al.*, 1997).

Il a été proposé que la dynactine pourrait stimuler l'activité ATPasique de la dynéine. Si cela était vrai, la dynactine devrait contribuer à augmenter la vitesse du déplacement des vésicules. Cependant, la présence de dynactine ne permet seulement que d'augmenter la fréquence des événements de transport *in vitro*, à une vitesse relativement faible dans les conditions de l'expérience. En outre, la dynéine seule est toujours capable de provoquer le

glissement de microtubules *in vitro*, ce qui indique qu'elle est à même de générer un déplacement sans dynactine. Enfin, aucune expérience décrivant une différence d'activité ATPasique de la dynéine induite par la dynactine n'a été rapportée jusqu'à présent (King et Schroer, 2000).

b) La dynactine se comporte comme un récepteur de la dynéine sur les organites

Le niveau basal de déplacement permis par la dynactine *in vitro* indique plutôt que ce complexe serait responsable du chargement du moteur sur l'organite à déplacer (Schroer et Sheetz, 1991). Corroborant cette hypothèse, il a été montré que des anticorps bloquant l'association entre dynéine et dynactine empêchent le chargement de la dynéine sur des vésicules d'axone de calamar (Waterman-Storer *et al.*, 1997) et sur des membranes extraites d'ovocytes de Xénopes (Steffen *et al.*, 1997).

La présence d'isoformes de spectrine et d'ankyrine associées à l'appareil de Golgi (Beck *et al.*, 1994; Beck *et al.*, 1997; Devarajan *et al.*, 1997; Devarajan *et al.*, 1996) a permis de suggérer l'existence d'un squelette attaché aux organelles (Vallee et Sheetz, 1996). A ce propos, il a été montré récemment que la protéine Arp1 interagit directement avec l'isoforme β III de la spectrine associée à l'appareil de Golgi (Holleran *et al.*, 2001; Holleran *et al.*, 1996). Les auteurs ont montré également que la dynéine, la dynactine et la spectrine β III se co-purifient avec des vésicules cytosoliques isolées à partir d'extrait de cerveau de rat. De plus, la spectrine β III se co-immunoprécipite avec la dynactine à partir d'extrait de cerveau de rat. *In vivo*, la dynactine et la spectrine β III se co-localisent sur des vésicules cytoplasmiques au voisinage du noyau. Aussi, les auteurs ont émis l'hypothèse selon laquelle la dynactine pourrait, en interagissant avec la spectrine β III, recruter la dynéine sur les vésicules golgiennes et peut-être sur d'autres organites membranaires (Fig.14). Par ailleurs, l'équipe de N. Galjart a découvert une interaction directe entre la dynamitine et BICD2, l'orthologue chez les mammifères de Bicaudal-D, une protéine impliquée dans la distribution de facteurs de polarité dans l'ovocyte de drosophile (Hoogenraad *et al.*, 2001). BICD2 se localise sur l'appareil de Golgi et pourrait constituer un élément du matériel recouvrant les membranes de cet organite. Cette étude révèle aussi que BICD2 pourrait participer au recrutement de la dynactine sur l'appareil de Golgi (Hoogenraad *et al.*, 2001). En outre, chez *Neurospora crassa*, cette interaction entre des vésicules membranaires et la dynactine semble être contrôlée par le domaine carboxy-terminal de la p150^{Glued} (Kumar *et al.*, 2001).

En mitose, il semble que la dynactine soit responsable du chargement de la dynéine sur les kinétochores (Fig.14). En effet, la sur-expression de la dynamitine provoque non seulement la délocalisation des éléments de la dynactine des kinétochores, mais aussi celle de la dynéine (Echeverri *et al.*, 1996). De plus, l'équipe de M.L. Goldberg a montré l'implication de la protéine ZW10 dans le chargement de la dynactine et de la dynéine sur les kinétochores de drosophile (Starr *et al.*, 1998). Ces auteurs ont démontré également, par une approche « double hybride », que la liaison à la protéine ZW10 se fait par l'intermédiaire de la dynamitine.

Bien que la dynactine soit impliquée dans le recrutement de la dynéine sur de nombreuses organelles, certaines études suggèrent que la dynéine pourrait interagir électrostatiquement avec les membranes (Lacey et Haimo, 1992; Lacey et Haimo, 1994). A cet égard, la présence d'une région riche en acides aminés chargés (lysines) à l'extrémité N-terminale des DICs font de ces sous-unités de la dynéine des candidats possibles pour cette interaction (Paschal *et al.*, 1992). Par ailleurs, l'inhibition des fonctions de la kinectine, une protéine membranaire impliquée dans la liaison de la kinésine aux vésicules, perturbe le transport généré aussi bien par la dynéine que par la kinésine (Blocker *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1992). La kinectine semble donc être un élément commun au fonctionnement des deux moteurs, elle pourrait participer au recrutement et à la coordination de ces derniers (Vallee et Sheetz, 1996).

c) La dynactine est un facteur de processivité de la dynéine

Le rôle de la dynactine ne se limite probablement pas au chargement de la dynéine sur les organites, car de la dynéine purifiée est elle même capable de lier des vésicules sur les MTs *in vitro* (Schroer et Sheetz, 1991) sans pouvoir les déplacer. Elle pourrait, en plus de diriger la dynéine vers des cibles particulières, permettre au complexe moteur de rester attaché aux MTs pendant le cycle ATPasique de la dynéine, par l'intermédiaire du site de liaison aux MTs de la p150^{Glued}. Cette hypothèse est soutenue par des observations *in vitro* du groupe de T. Schroer, montrant que la présence de dynactine permet d'augmenter le temps pendant lequel des billes de latex restent associées aux MTs au cours de leur transport, sans modifier la vélocité du moteur ou son activité ATPasique (King et Schroer, 2000). Cette activité de facteur de processivité dépend directement de la capacité de la dynactine de

s'associer aux MTs. Cela suggère une coordination très précise des activités de liaison aux MTs entre la dynéine et la dynactine qui reste à explorer.

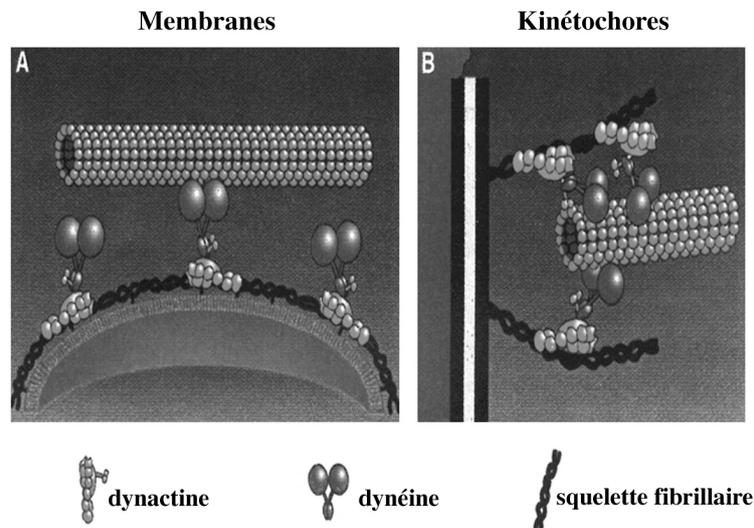


Figure 14: Représentation très schématique de l'organisation possible de la dynéine et de la dynactine sur la membrane d'une organelle (A) ou sur un kinétochore (B). L'adressage de la dynéine se fait par l'intermédiaire du complexe dynactine. Le matériel fibrillaire à la surface de la vésicule (A) pourrait être constitué de spectrine. Concernant le kinétochore, la nature du matériel fibrillaire constituant la corona est encore indéterminée. D'après (Vallee et Sheetz, 1996).

La dynactine pourrait aussi posséder des fonctions propres, indépendantes de la dynéine, comme probablement l'ancrage des MTs au centrosome en interphase (Quintyne *et al.*, 1999).

Il est intéressant de noter que l'inactivation de la dynactine par la sur-expression de la dynamitine ne semble pas perturber la distribution du réticulum endoplasmique, ni des mitochondries et des péroxysomes, bien que ces organelles soient supposés interagir avec la dynéine (Burkhardt *et al.*, 1997; Presley *et al.*, 1997). Il existe donc probablement d'autres protéines impliquées dans les fonctions de la dynéine.

C. Fonctions du complexe dynéine cytoplasmique/dynactine

La dynéine cytoplasmique conventionnelle est impliquée dans un large éventail de fonctions cellulaires que ce soit en interphase ou en mitose. Dresser une liste exhaustive des fonctions de ce moteur moléculaire serait une tâche bien difficile. Nous pouvons toutefois en

évoquer quelques-unes. Etant donné que la dynactine est nécessaire au fonctionnement de la dynéine cytoplasmique conventionnelle, nous parlerons par la suite de complexe dynéine/dynactine (ou D/D).

1. En interphase :

La dynéine cytoplasmique (appelée dynéine par la suite) a été purifiée originellement à partir d'extrait de cerveau. Dans les axones, la dynéine est impliquée dans le transport rétrograde rapide d'organelles (Hirokawa *et al.*, 1990; Vallee *et al.*, 1988). Des études plus récentes ont même révélé que le complexe D/D est impliqué dans certaines maladies neurodégénératives (LaMonte *et al.*, 2002) comme probablement la maladie de Huntington (Engelender *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998). Des tests de motilité *in vitro* ont permis de supposer que le complexe D/D joue un rôle analogue dans d'autres cellules que les neurones. En effet, le complexe D/D se localise sur diverses structures membranaires comme les endosomes et les lysosomes (Lin et Collins, 1992) et intervient dans le transport vésiculaire (ou tubulo-vésiculaire) entre les endosomes précoces et les endosomes tardifs (Aniento *et al.*, 1993; Valetti *et al.*, 1999). Cependant, il ne semble pas intervenir dans le mécanisme d'endocytose.

le complexe D/D est également impliqué dans le maintien de l'intégrité et de la localisation de l'appareil de Golgi et des membranes endosomales au voisinage du noyau (Burkhardt *et al.*, 1997; Harada *et al.*, 1998). Son activité est requise dans le transport des vésicules pré-golgiennes depuis le réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi (Presley *et al.*, 1997). Son association avec les vésicules synaptiques (Lacey et Haimo, 1992) et avec le réticulum endoplasmique (Allan, 1995; Allan et Vale, 1994) a aussi été décrite.

Le complexe D/D joue un rôle capital dans la migration des noyaux, non seulement, chez les eucaryotes simples comme *Aspergillus nidulans* (Morris, 2000), *Neurospora crassa* (Plamann *et al.*, 1994) et *Saccharomyces cerevisiae* (Eshel *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1993), mais aussi, chez les eucaryotes supérieurs (Reinsch et Gonczy, 1998; Reinsch et Karsenti, 1997). La localisation de la dynéine au cortex de l'extrémité de l'hyphe chez *A. nidulans* (Xiang *et al.*, 1995b), a conduit les auteurs à proposer un modèle selon lequel le complexe D/D, ancré au cortex, exercerait une force de traction sur les MTs astériens émanant du SPB (Spindle Pole Body), conduisant au déplacement du noyau (pour revue : (Karki et Holzbaur, 1999)). Nous verrons que cela peut avoir un lien avec la migration des neurones au cours du développement embryonnaire (voir chapitre III).

D'autres organelles sont aussi concernées par ce moteur moléculaire comme cela a été montré pour le transport des phagosomes (Blocker *et al.*, 1997) et l'agrégation de granules pigmentaires dans les mélanophores (Nilsson *et al.*, 1996; Nilsson et Wallin, 1997). De plus, le complexe D/D semble participer au transport de structure non membranaires comme les MTs dans l'axone (Ahmad *et al.*, 1998; Dillman 3rd *et al.*, 1996). Ces déplacements de MTs, générés par le complexe D/D, ont même été observés avant le déclenchement de la mitose (vers le noyau) et en métaphase (vers le fuseau de division) (Rusan *et al.*, 2002).

2. En mitose :

Le complexe moteur D/D joue des rôles essentiels aux cours de la mitose, depuis la rupture de l'enveloppe nucléaire jusqu'à la cytokinèse en passant par le point de contrôle de la transition métaphase-anaphase (point de contrôle de l'assemblage du fuseau de division, voir chapitre I.C.2).

a) Rupture de l'enveloppe nucléaire :

Chez les eucaryotes supérieurs, le complexe D/D est recruté sur l'enveloppe nucléaire à la fin de la phase G2 (Busson *et al.*, 1998; Salina *et al.*, 2002). Les MTs sont connus pour participer à la rupture de l'enveloppe nucléaire, mais ils ne semblent pas perforer cette dernière (Salina *et al.*, 2002).

Au début de la prophase, deux invaginations, contenant chacune un centrosome, se forment dans l'enveloppe nucléaire (Salina *et al.*, 2002). En fin de prophase, le complexe D/D s'accumule dans ces invaginations au voisinage des centrosomes, et la rupture de l'enveloppe nucléaire est amorcée à des endroits éloignés des invaginations (pour ne pas dire : opposés). Cela suggère un rôle indirect de ce moteur moléculaire dans la rupture de l'enveloppe nucléaire. Corroborant cette hypothèse, la perturbation du complexe D/D réduit la formation des invaginations et retarde l'entrée en prémétaphase. Aussi, les auteurs ont proposé un modèle selon lequel la dynéine participerait à la formation des invaginations en exerçant une force de traction depuis l'enveloppe nucléaire sur les MTs astériens, permettant le déplacement des centrosomes vers le noyau, puis au contact des membranes nucléaires. Cette force pourrait, localement, déformer suffisamment l'enveloppe nucléaire, pour provoquer une rupture à l'opposé de l'invagination (voir le modèle dans la publication de l'équipe de Brian Burke : (Salina *et al.*, 2002)).

b) Assemblage et orientation du fuseau de division (voir aussi chapitre I.C.2) :

Chez les eucaryotes supérieurs, des données collectées *in vivo* et lors de tests réalisés *in vitro* ont clairement montré que le complexe D/D joue un rôle capital dans l'assemblage du fuseau de division. En effet, une inactivation de la dynéine par micro-injection d'anticorps dirigés contre les chaînes lourdes ou par d'autres approches comme la sur-expression de la dynamitine, provoque une altération très importante du fuseau de division (Echeverri *et al.*, 1996; Gaglio *et al.*, 1997; Vaisberg *et al.*, 1993). Des expériences réalisées sur des extraits d'œufs de xénope (Heald *et al.*, 1997; Merdes *et al.*, 1996) et de cellules HeLa (Gaglio *et al.*, 1997; Gaglio *et al.*, 1996), ont permis de montrer que le complexe D/D joue un rôle dans la focalisation des bouts (-) des MTs aux pôles du fuseau mitotique. Les auteurs ont proposé un modèle selon lequel le complexe D/D générerait un glissement des MTs les uns par rapport aux autres permettant le regroupement des extrémités (-). Cette activité du complexe D/D semble contrebalancée par celle d'un autre moteur de la famille des kinésines, Eg5. Cette balance entre ces deux activités motrices opposées serait le fondement de l'organisation du fuseau de division (pour revue : (Heald, 2000)). Par ailleurs, la péricentrine interagit directement avec les LICs et cette interaction semble requise pour l'assemblage, l'organisation ainsi que le fonctionnement des centrosomes et des pôles du fuseau de division (Purohit *et al.*, 1999).

La localisation au cortex cellulaire et sur l'enveloppe nucléaire en fin de phase G2, dans des cellules épithéliales (Busson *et al.*, 1998), ainsi que son interaction avec la β -caténine (Ligon *et al.*, 2001) font aussi de la dynéine un bon candidat pour assurer la séparation des pôles et le maintien des pôles séparés pendant la mitose.

La dynéine intervient aussi dans le positionnement et l'orientation du fuseau de division chez divers organismes et dans divers types de cellules (voir chapitre I.C.2.) (Adames et Cooper, 2000; Carminati et Stearns, 1997; Gonczy *et al.*, 1999; O'Connell et Wang, 2000; Sharp *et al.*, 2000a; Skop et White, 1998).

c) Fonctions au kinétochore :

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre I, le complexe D/D se localise sur la corona des kinétochores dans divers organismes (Echeverri *et al.*, 1996; Pfarr *et al.*, 1990; Starr *et al.*, 1998; Steuer *et al.*, 1990; Wordeman *et al.*, 1991). Cette localisation a initialement fait supposer que le complexe D/D pourrait être responsable du transport rétrograde des chromosomes. Cela dit, la multiplicité des fonctions du complexe D/D au cours de la mitose

a, pendant très longtemps, rendu difficile toute investigation *in vivo* visant à élucider les fonctions précises de ce moteur aux kinétochores. En effet, toute perturbation du complexe D/D dans des cellules mitotiques engendrent des dysfonctionnements importants de la formation et de la séparation des pôles, de l'assemblage et de l'orientation du fuseau et du point de contrôle métaphase-anaphase qui pourraient masquer un effet éventuel sur les mouvements des chromosomes.

Dans les cellules de mammifères, le complexe D/D n'est détectée sur les kinétochores que pendant la prémétaphase (Echeverri *et al.*, 1996; Pfarr *et al.*, 1990; Steuer *et al.*, 1990), suggérant que ce moteur n'est pas impliqué dans les phases suivantes du transport des chromosomes. De plus, les expériences d'inactivation de la dynéine avant l'anaphase, par micro-injection d'anticorps dans des cellules de mammifères, suggèrent que la dynéine n'est pas nécessaire à la ségrégation des chromosomes, ou que son action est redondante avec celle d'autres moteurs dans ces cellules (Vaisberg *et al.*, 1993).

Soulignant, par ailleurs, l'importance de ce moteur dans les phases précoces de la mitose, l'inactivation de la dynactine par la sur-expression de la dynamitine, provoque un arrêt des cellules en prémétaphase (Echeverri *et al.*, 1996). Cependant, il n'est pas certain que ce phénotype soit dû à l'altération du mouvement des chromosomes. Il pourrait résulter d'effets pléiotropiques dont l'altération des pôles du fuseau de division. Ceci est d'autant plus envisageable que ces cellules disposent toujours de chromosomes intégrés dans le fuseau.

En prémétaphase, le premier contact entre un kinétochore et un MT se fait latéralement et permet un glissement rapide du chromosome vers le pôle d'où provient le MT (voir chapitre I). La vitesse de ce déplacement est comparable à celle des vésicules transportées par la dynéine le long des MTs en interphase (Merdes et De Mey, 1990; Rieder et Alexander, 1990). Aussi, compte tenu de sa localisation sur les kinétochores uniquement en prémétaphase, le complexe D/D pourrait être à l'origine de ces mouvements rapides.

Concernant la drosophile, deux publications récentes indiquent que la dynéine pourrait contribuer directement aux mouvements des chromosomes, non seulement, au cours de la prémétaphase, mais aussi, pendant l'anaphase (Savoian *et al.*, 2000; Sharp *et al.*, 2000b). L'une de ces études consistait à empêcher le recrutement du complexe D/D spécifiquement sur les kinétochores en invalidant ZW10. Cela a provoqué une réduction importante des mouvements des chromosomes. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure un effet de l'absence de la dynéine des kinétochores sur le point de contrôle métaphase-anaphase (voir

plus loin), conduisant à des défauts d'attachement et donc de mouvements des chromosomes dans ces expériences (Banks et Heald, 2001).

Le complexe D/D participe aussi au fonctionnement du point de contrôle métaphase-anaphase. En effet, il permet de lever l'inhibition exercée par les molécules constitutives du point de contrôle métaphase-anaphase en transportant certaines (Mad2, BubR1, Rod, l'antigène 3F3/2 et CENP-E), le moment opportun, depuis le kinétochore vers les pôles le long des MTs kinétochoriens (Howell *et al.*, 2001; Wojcik *et al.*, 2001). Par exemple, la perturbation de la dynéine cytoplasmique par la micro-injection d'anticorps ou en sur-exprimant la dynamitine dans des cellules de mammifères en prémétaphase, provoque effectivement l'accumulation de protéines Mad2 au kinétochore et empêche le déclenchement de l'anaphase (Howell *et al.*, 2001).

d) Cytokinèse :

Plusieurs études ont permis de montrer la localisation du complexe D/D sur le sillon de clivage et au cortex faisant face à ce dernier en fin de mitose (Campbell *et al.*, 1998; Karki *et al.*, 1998; Tai *et al.*, 1998). Cela suggère l'existence d'un dialogue entre le cortex et le fuseau de division de façon à placer correctement le plan de clivage. En outre et de façon non exclusive, la dynéine pourrait participer directement au clivage de la cellule par son activité motrice.

3. Les composants de la dynactine et la dynéine cytoplasmique sont des +TIPs (« + End-Tracking Proteins »)

La p150^{Glued}, Arp1, la p62 et la p50 se co-localisent, dans des cellules de mammifères, aux bouts (+) des MTs avec la CLIP-170, le prototype des +TIPs (voir chapitre I.B.2.e.) (Garces *et al.*, 1999; Valetti *et al.*, 1999; Vaughan *et al.*, 1999). Concernant la p150^{Glued}, cette localisation n'est constatée que sur les MTs en polymérisation et rend compte d'avantage d'un recrutement de la protéine depuis le cytoplasme plutôt que d'un transport le long des MTs comme cela a été montré pour APC (voir chapitre I.B.2.e.) (Vaughan *et al.*, 2002).

L'accumulation de la p150^{Glued} aux bouts (+) des MTs dépend de son domaine amino-terminal (330 premiers résidus aminoacides) contenant le motif CAP-GLY. De plus, il a été montré récemment que la phosphorylation de la p150^{Glued} par la protéine kinase A (pKA), sur son résidu sérine 19 (situé juste en amont du domaine CAP-GLY), inhibe son recrutement sur les bouts (+) des MTs. Cette régulation semble jouer un rôle important dans l'association de structures membranaires golgiennes avec les bouts (+) des MTs, et dans le transport centripète

subséquent de ces dernières. Cela semble indiquer un rôle pour la dynactine et la dynéine, localisées aux bouts (+) des MTs, dans la prise en charge d'organites situés à la périphérie de la cellule pour procéder à leur transport vers les bouts (-) des MTs. Les auteurs soulignent également le caractère stochastique de la rencontre entre les MTs et les structures membranaires golgiennes, ce qui tend à confirmer le modèle « recherche et capture » pensé par M. Kirschner et T. Mitchison 16 années auparavant.

La sur-expression de la dynamitine provoque une délocalisation d'Arp1 des bouts (+) des MTs, mais n'affecte pas la localisation de la p150^{Glued} et de la CLIP-170 (Vaughan *et al.*, 1999). En revanche, le recrutement de la p150^{Glued} sur les bouts (+) des MTs dépend du domaine carboxy-terminal de la CLIP-170 (voir chapitre IV) (Hoogenraad *et al.*, 2002; Valetti *et al.*, 1999). Récemment, l'équipe de K. Vaughan a tenté de démentir ce dernier résultat, en se fondant sur l'observation de différences entre le signal « GFP » de la chimère GFP-p150^{Glued} et des signaux correspondant à la CLIP-170 et à EB1 endogènes (Vaughan *et al.*, 2002). Nous verrons, dans la discussion, que ces observations sont critiquables à plusieurs titres.

La dynéine cytoplasmique se localise aussi sur les bouts (+) des MTs, mais cette localisation n'est détectée en immunofluorescence que si l'on place les cellules à la température de la pièce avant de procéder à la fixation (Vaughan *et al.*, 1999). Cela laisse supposer que le recrutement de la dynéine sur les extrémités (+) des MTs est très sensible à la dynamique des MTs. Cela étant, nous ne connaissons pas le mécanisme de recrutement de ce moteur moléculaire sur les bouts (+) des MTs. Par ailleurs, le recrutement de certaines sous-unités de la dynéine cytoplasmique sur les bouts (+) des MTs a été confirmé chez certains organismes eucaryotes simples, comme *Aspergillus nidulans* (Xiang *et al.*, 2000).

Chez ce champignon filamenteux, le recrutement de la dynéine cytoplasmique semble dépendre de la dynactine (Xiang *et al.*, 2000), mais cela n'a pas été confirmé, jusqu'à maintenant, chez les eucaryotes supérieurs. Le recrutement NUDA, l'orthologue de la DHC chez *A. nidulans*, sur les bout (+) dépend de NUDI, l'orthologue de la DIC, et réciproquement (Zhang *et al.*, 2002a). De plus, la dynéine cytoplasmique semble contrôler la dynamique des MTs, puisqu'une mutation dans NUDA, provoque une baisse des fréquences de catastrophe et de sauvetage ainsi qu'une diminution de la vitesse de dépolymérisation (Han *et al.*, 2001). L'étude de ces propriétés chez les mammifères sera difficile compte tenu de la faiblesse des signaux, aux bouts (+) des MTs, correspondant aux sous-unités de la dynéine (Vaughan *et al.*,

1999). L'ensemble de ces données laissent supposer que le recrutement, sur les bouts (+) des MTs, de la dynéine est étroitement contrôlé et furtif.

Compte tenu de l'interaction existant entre le complexe D/D et EB1, il pourrait exister, aux bouts (+) des MTs, un dialogue entre ces différentes +TIPs, pouvant contribuer par exemple au contrôle de la dynamique et de la polarisation des MTs.

III. **LIS1**

LIS1 est l'un des gènes ayant un rôle essentiel au cours du développement du cortex cérébral. En effet, des mutations dans l'un des deux allèles de *LIS1* provoquent une malformation importante du cerveau connue sous le nom de lissencéphalie (« Smooth brain »). Les patients atteints de cette maladie sont mentalement retardés, épileptiques et meurent très jeunes. Les cerveaux lissencéphaliques présentent des défauts de migration des neurones au cours du développement, ce qui a pour conséquence une mauvaise organisation du néocortex.

A. **La Lissencéphalie**

1. **Le développement du néocortex**

Chez les mammifères, le néocortex contribue à augmenter la complexité fonctionnelle du cerveau. Le développement du néocortex a fait l'objet de beaucoup de recherches jusqu'à aujourd'hui car, d'une part, il constitue un excellent modèle pour l'étude des mécanismes qui régissent la migration des neurones et, d'autre part, des accidents au cours de son développement aboutissent à des maladies humaines très graves comme la lissencéphalie (Gupta *et al.*, 2002; Lambert de Rouvroit et Goffinet, 1998).

Le néocortex consiste en six couches de neurones bien distinctes par leur morphologie et leurs fonctions. Son développement implique la migration tangentielle et radiale de nombreux neurones. La lissencéphalie semble affecter uniquement la migration radiale des neurones, comme de nombreuses autres maladies humaines connues pour perturber le développement du cortex cérébral. Par ailleurs, la position définitive d'un neurone dans l'une des 6 couches du néocortex est due essentiellement à la composante radiale de la migration neuronale.

La souris constitue un excellent modèle pour l'étude des mécanismes de migration des neurones et du développement du néocortex. La formation des 6 couches de neurones du néocortex, chez la souris, a lieu entre le onzième et le dix-huitième jours du développement embryonnaire (E11 à E18) (Bayer et Altman, 1991; Bayer *et al.*, 1991). A E11, le néocortex consiste en une couche de cellules prolifératives précurseurs nommée : la zone ventriculaire. Entre E11 et E13, des neurones post-mitotiques sortent de la zone ventriculaire pour migrer,

d'une façon radiale, vers la surface du cerveau (surface pie-mérienne). Cette première vague de neurones forme une nouvelle couche appelée la pré-plaque. A E13, une deuxième vague de neurones migrent, de la même façon que la première, depuis la zone ventriculaire pour former la plaque corticale et diviser la pré-plaque en deux nouvelles couches : la zone marginale superficielle et la plaque sous corticale (Fig. 15). Entre E14 et E18, des vagues successives de neurones post-mitotiques, provenant de la zone ventriculaire, vont migrer dans une direction radiale, traverser la plaque sous corticale et former les différentes couches de la plaque corticale. Il est intéressant de noter que la formation des couches de la plaque corticale a lieu de l'intérieur vers l'extérieur. Autrement dit, les neurones les plus précoces composent les couches les plus profondes. Cela implique, qu'en migrant depuis la zone ventriculaire, les neurones post-mitotiques traversent les couches de neurones plus anciens pour former une nouvelle couche plus externe. Après que la plaque corticale a été correctement formée, la plaque sous corticale dégénère laissant les six couches du néocortex qui persisteront tout au long de la vie adulte de l'animal.

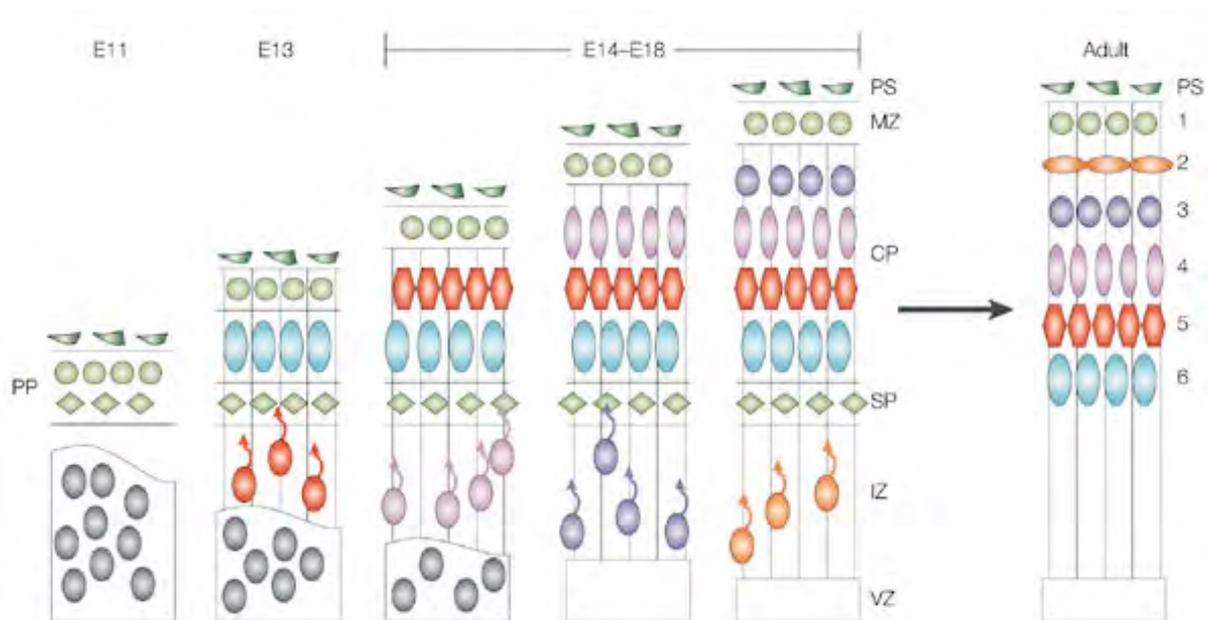


Figure 15 : Modèle de la formation du néocortex chez la souris.

D'après (Gupta *et al.*, 2002).

PP : preplate (pré-plaque), PS : pial surface (surface piemérienne), MZ : marginal zone (zone marginale superficielle), SP : subplate (plaque sous-corticale), IZ : intermediate zone (zone intermédiaire), VZ : ventricular zone (zone ventriculaire).

La migration radiale peut opérer de plusieurs façons très différentes (Lambert de Rouvroit et Goffinet, 2001). Au cours de la locomotion (ou migration gliophile), les neurones migrent le long des excroissances des cellules gliales (Edmondson et Hatten, 1987; O'Rourke *et al.*, 1992; Rakic, 1971a; Rakic, 1971b; Rakic, 1972). Ces dernières sont connues sous le nom de fibres gliales radiales et fournissent aux neurones un vaste réseau de supports qui permet de guider leur migration radiale. En effet, les auteurs ont observé, d'une part, des neurones attachés aux fibres gliales au cours du développement du système nerveux central et, d'autre part, des neurones capables de glisser le long de ces fibres *in vitro* (Anton *et al.*, 1999; Dulabon *et al.*, 2000; Rakic, 1971b). Des études réalisées *in vitro* sur des cellules granuleuses du cervelet ont révélé que les neurones adoptent, pendant la locomotion, une morphologie particulière caractérisée par une structure protrusive (« leading process »), se terminant par de courts filipodes (Rivas et Hatten, 1995). Le déplacement des neurones sur les cellules gliales s'effectue notamment grâce à la formation de jonctions d'adhérence le long du soma et des filipodes. Le cytosquelette joue un rôle important au cours de la locomotion puisque le traitement des neurones par des drogues affectant l'intégrité ou la dynamique des MTs ou de l'actine bloque leur migration gliophile (voir aussi chapitre I.C.1.). Pendant le déplacement du neurone, certains MTs sont projetés dans le « leading process » où ils acheminent des vésicules, tandis que d'autres MTs forment une « cage » autour du noyau permettant de maintenir celui-ci en position caudale (pour revue : (Hatten, 2002)). Ce mode de migration radiale, qui est certainement le plus fréquent au cours du développement du cortex cérébral, n'induit pas de changement de taille des neurones, car le « leading process » et le soma se déplacent en même temps le long des fibres gliales.

Il existe d'autres modes de migration radiale, indépendante des fibres gliales, comme la translocation nucléaire. Ce processus a été observé dans diverses structures et notamment dans le système nerveux central incluant le cortex cérébral. Dans ce mode de migration, le neurone projette une excroissance cellulaire (« leading process ») vers la surface piamérienne, jusqu'à sa destination finale et d'une façon indépendante des cellules gliales. Cela conduit à l'élongation du neurone. Le corps cellulaire (soma), incluant le noyau, migre ensuite dans la même direction ce qui résulte en un raccourcissement du neurone (Brittis *et al.*, 1995; Morest, 1970). Ce mode de migration est connu pour jouer un rôle important au cours du développement embryonnaire du cerveau chez la souris, entre E12 et E13, notamment lors de la formation puis de la division de la pré-plaque.

Des études génétiques ont permis de mieux comprendre les mécanismes qui régissent le développement du cortex cérébral et qui contrôlent plus particulièrement la formation des six couches du néocortex. Par exemple, des mutations responsables de graves dysplasies corticales humaines ont permis de découvrir des gènes essentiels pour la migration neuronale. Ces études ont permis, par ailleurs, de découvrir certaines voies de signalisation qui contrôlent le développement du cortex. Celles-ci sont actuellement analysées en détail au moyen de modèles animaux.

2. La lissencéphalie

Il existe différents types de dysplasies corticales humaines associées à des défauts de migration neuronale. La lissencéphalie est certainement la dysplasie corticale la mieux caractérisée (Leventer *et al.*, 2001; Leventer *et al.*, 2000). Les principales caractéristiques cliniques de cette malformation sont : un cortex anormalement épais, une réduction de la profondeur des scissures, une absence de circonvolution (agyri, Cf. Fig.16), une mauvaise répartition des neurones du néocortex et des hétérotopies neuronales (groupes de cellules dont la localisation est anormale). Tous ces défauts semblent résulter d'un dysfonctionnement de la migration neuronale radiale (Alvarez *et al.*, 1986). La lissencéphalie de type I (ou lissencéphalie classique) apparaît dans deux maladies bien distinctes : l'ILS (« Isolated Lissencephaly Sequence ») et le MDS (« Miller-Dieker Syndrome »). Au cours de l'ILS, les patients présentent une lissencéphalie plus ou moins prononcée sans aucune autre malformation importante. Les patients atteints du MDS présentent une lissencéphalie plus sévère que dans le cas le l'ILS et des anomalies crano-faciales caractéristiques de cette maladie. Dans les deux cas, les patients sont sévèrement attardés, souffrent d'épilepsie et meurent très tôt au cours de leur enfance.



Figure 16 : (a) Cerveau d'un homme sain. (b) Cerveau d'un patient atteint de lissencéphalie

Deux gènes dont certaines mutations provoquent la lissencéphalie de type I ont été clonés. Il s'agit de *DCX*, le gène de la doublecortine (Gleeson, 2000), et de *LIS1* (lissencephaly 1). *LIS1* est connu aussi sous le nom ambigu de « Miller-Dieker syndrome Chromosome Region » (MDCR) (Dobyns *et al.*, 1993; Reiner *et al.*, 1993).

L'ensemble des patients atteints de MDS et environ 40 % des patients atteints d'ILS présentent une mutation dans l'un des deux allèles du gène *LIS1*. Ces mutations hétérozygotes sont très fréquemment des délétions ou des micro-délétions qui aboutissent probablement à une perte de fonction (haploinsuffisance) (Cardoso *et al.*, 2002). Cependant, des études cytogénétiques ont permis de montrer qu'une haploinsuffisance de *LIS1* n'est pas responsable des malformations crano-faciales associées au MDS (Chong *et al.*, 1997; Lo Nigro *et al.*, 1997). En effet, il semblerait que d'autres gènes, adjacents à *LIS1* sur le chromosome 17, soient mutés également dans le cas du MDS et provoquent ces anomalies crano-faciales (Chong *et al.*, 1997). L'ensemble de ces gènes, incluant *LIS1*, correspond certainement à ce qu'on nomme, dans la littérature, la MDCR.

Des mutations dans le gène *DCX* sont responsables de la lissencéphalie liée au chromosome X. Ce type de lissencéphalie concerne davantage le lobe frontal, tandis que la lissencéphalie liée au gène *LIS1* affecte presque exclusivement les lobes pariétaux et occipitaux. Seuls les hommes peuvent être concernés par l'ILS liée au chromosome X. Les femmes, ayant une mutation dans *DCX*, présentent un phénotype mosaïque en raison de l'inactivation du chromosome X et développent, en lieu et place de la lissencéphalie, une hétérotopie subcorticale (« Subcortical Band Heterotopia » (SBH)).

Il existe certainement d'autres gènes dont certaines mutations causeraient l'ILS. En effet, les mutations dans *LIS1* et *DCX* rendent compte seulement de 76 % des cas d'ILS connus. L'identification de ces gènes permettrait de mieux comprendre les mécanismes de la migration neuronale ainsi que les voies de signalisation impliquées.

B. La protéine LIS1 humaine et ses orthologues

LIS1 est une protéine de 410 résidus aminoacides (environ 45 kDa) qui présente deux principaux domaines structuraux (Chong *et al.*, 1996; Reiner *et al.*, 1993). Une région amino-terminale (94 résidus aminoacides), contenant une petite structure en « coiled-coil » de 28 résidus aminoacides, et une région carboxy-terminale plus vaste (316 résidus aminoacides), contenant 7 domaines WD (tryptophane, aspartate) qui sont certainement impliqués dans des interactions avec d'autres protéines (Fig. 17). La région amino-terminale est impliquée dans

l'homodimérisation de LIS1 (Cahana *et al.*, 2001), mais une publication récente montre que la structure en « coiled-coil » n'est pas nécessaire à cette homodimérisation (Tai *et al.*, 2002).

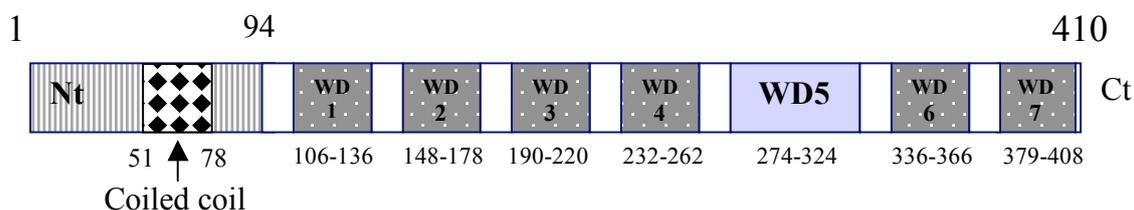


Figure 17 : Organisation du gène humain LIS1

Tous les membres de la famille des protéines à domaines WD répétés présentent de forts pourcentages d'identité et de similitude dans leur région contenant les domaines WD. LIS1 n'échappe pas à cette règle. La seule structure disponible, caractérisée expérimentalement, d'une protéine à domaines WD est celle de la sous-unité β des protéines G trimériques (Lambright *et al.*, 1996; Wall *et al.*, 1995). Cette structure apparaît circulaire, comparable à une hélice, et comprend 7 feuilletts β (ou lames). Chacun de ces feuilletts β contient 4 brins β à l'exception du dernier qui n'en contient que 3. Dans chaque lame, les brins β sont connectés les uns à la suite des autres par de petits fragments courbes (« turns »). Les lames sont, quant à elles, séparées par des boucles (« D-A loops »). Des données biochimiques et biophysiques suggèrent fortement que la plupart des membres de la famille des protéines à domaines WD répétés adoptent globalement la même structure circulaire en hélice que la sous-unité β des protéines G trimériques ($G\beta$) (Garcia-Higuera *et al.*, 1996). L'alignement des séquences des domaines WD de LIS1 avec ceux de $G\beta$ a révélé une grande similitude globale avec cependant une différence notable (Sapir *et al.*, 1999b). En effet, les auteurs ont mis en évidence l'existence d'un insert de 19 résidus aminoacides dans le domaine WD5 de LIS1 (résidus 288 à 306). Cet insert se trouve entre les deux premiers brins β de ce domaine WD. Des études bio-informatiques ont permis de modéliser les domaines WD2 à 6 de LIS1 à partir du domaine WD4 de $G\beta$, et le domaine WD7 de LIS1 à partir du domaine WD7 de $G\beta$. Un modèle structural général de la partie carboxy-terminale de LIS1 (à partir de l'isoleucine 95) a été ainsi réalisé (Sapir *et al.*, 1999b). Celui-ci fait donc abstraction de l'insert des 19 résidus aminoacides du domaine WD5 et apparaît figure 18. A titre d'exemple, il est intéressant de noter qu'une délétion des résidus aminoacides 301 à 334 a été mise en évidence chez un patient atteint de lissencéphalie. Cette délétion a conduit à l'élimination

essentiellement des trois derniers brins du domaine WD5, recouvrant une partie de l'insert, et devait probablement provoquer un mauvais repliement de la protéine entière (Sapir *et al.*, 1999b).

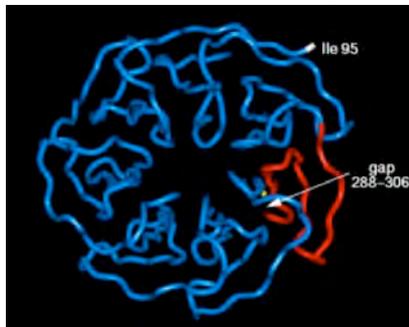


Figure 18 : Structure du domaine WD de LIS1.

D'après (Sapir *et al.*, 1999b)

En rouge, la délétion des résidus 301 à 334 découverte chez un patient.

La prédiction de la structure secondaire du domaine amino-terminal par informatique a suggéré un enchaînement d'hélices connectées les unes aux autres par des boucles (Sapir *et al.*, 1999b).

La protéine LIS1 est très conservée au cours de l'évolution. En effet, des orthologues de la protéine humaine ont été clonés notamment chez *Saccharomyces cerevisiae* (Geiser *et al.*, 1997), *Aspergillus nidulans* (Xiang *et al.*, 1995a), *Caenorabditis elegans* (Dawe *et al.*, 2001), *Drosophila melanogaster* (Lei et Warrior, 2000; Liu *et al.*, 1999; Swan *et al.*, 1999) et *Mus musculus* (Reiner *et al.*, 1995). De plus, la protéine humaine LIS1 est virtuellement identique à la protéine Lis1 de la souris si on se réfère à la séquence des ADN génomiques. Elle présente 70 % d'identité avec DLis-1, son orthologue chez la drosophile, 42 % d'identité avec NUDF, son orthologue chez *Aspergillus nidulans*, et 33 % d'identité avec PAC1p, son orthologue chez *Saccharomyces cerevisiae*.

LIS1 est une phosphoprotéine dont l'état de phosphorylation change au cours du développement embryonnaire du cerveau chez la souris (Sapir *et al.*, 1999a). En effet, il existe au moins 4 formes électrophorétiques différentes qui s'ajoutent à la forme conventionnelle de 45 kDa. Ces dernières n'apparaissent que dans une fraction enrichie en MAPs et ne sont détectables, par « immuno-blotting », qu'à E10 dans un extrait de cerveau embryonnaire de souris. Cela suggère que ces modifications post-traductionnelles de LIS1 sont très précisément contrôlées au cours du développement. Ces variantes électrophorétiques doivent leur existence à la phosphorylation de LIS1 sur des résidus sérines par des kinases encore

inconnues. Toutefois, les auteurs ont détecté, dans un extrait de cerveau embryonnaire murin fractionné, une kinase de 50 kDA, associée aux MTs, capable de phosphoryler LIS1 *in vitro*. Par ailleurs, d'autres expériences de phosphorylation *in vitro* ont révélé que, parmi un certain nombre de kinases connues (pKC, GSKII, DAP-kinase, CAK, cdc2 et CKII), seule la caséine kinase II (CKII) est capable de phosphoryler LIS1 *in vitro*. L'existence dans la séquence de LIS1 de six sites potentiels de phosphorylation par CKII suggère que celle-ci pourrait effectivement phosphoryler LIS1 *in vivo*. Cela étant, des expériences additionnelles seront nécessaires, d'une part, pour confirmer que CKII et la kinase de 50 kDa associée aux MTs sont capables de phosphoryler LIS1 *in vivo* et, d'autre part, pour comprendre les fonctions précises de ces phosphorylations.

C. LIS1 est une sous-unité du PFAH

Le PAF (« Platelet-Activating Factor »), ou facteur d'activation des plaquettes, est un des plus importants messagers lipidiques. Il est impliqué dans un grand nombre de processus physiologiques (pour revue : (Arai *et al.*, 2002)). Le groupe acétyl en position 2 sur la molécule de glycérol est absolument requis pour l'activité biologique du PAF. La déacétylation du PAF est conduite par une enzyme nommée PAF-acétylhydrolase (PAF-AH) (Fig. 19).

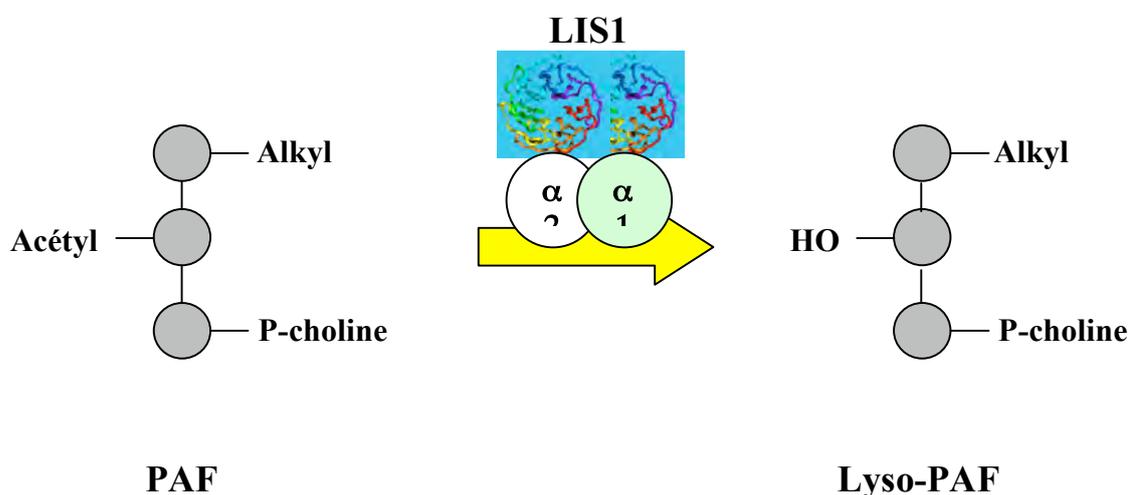


Figure 19 : Mode d'action du PFAH(I)

Il existe un PAF-AH plasmatique et deux PAF-AHs cytosoliques : le PAF-AH(I) et le PAF-AH(II). Le PAF-AH(II) est un monomère qui présente de grandes similitudes avec le

PAF-AH plasmatique et le PAF-AH(I) est une enzyme trimérique composée des sous-unités α_1 , α_2 et β dont les masses moléculaires respectives sont : 30, 29 et 45 kDa. Ces sous-unités ont été appelées ainsi en raison de la grande ressemblance entre le PAF-AH(I) et les protéines G trimériques. Les sous-unités α_1 et α_2 sont catalytiques, tandis que la sous-unité β est régulatrice. En outre, le gène de la sous-unité β est identique au gène humain *LIS1*.

On peut rencontrer *in vivo* les 3 combinaisons possibles des sous-unités α_1 et α_2 ($\alpha_1\alpha_1$, $\alpha_1\alpha_2$ et $\alpha_2\alpha_2$) et la sous-unité β est capable de s'associer aux 3, mais n'aura pas les mêmes effets d'une combinaison à une autre. En effet, la sous-unité β réduit l'activité de l'homodimère $\alpha_1\alpha_1$, augmente l'activité de $\alpha_2\alpha_2$ et n'a pratiquement aucun effet sur l'activité de l'hétérodimère (Manya *et al.*, 1999). Cette variation de composition du PAF-AH(I) constitue probablement un moyen de contrôler son activité *in vivo*.

Un certain nombre de données expérimentales suggèrent l'implication du PAF-AH(I) dans la migration des neurones au cours du développement du cortex cérébral. Par exemple, l'expression de la sous-unité catalytique α_1 est restreinte aux cellules neuronales en migration contrairement aux autres sous-unités (Manya *et al.*, 1998). En effet, au cours du développement embryonnaire du cerveau, la composition du PAF-AH(I) évolue depuis l'hétérodimère $\alpha_1\alpha_2$ vers l'homodimère $\alpha_2\alpha_2$. De plus, la mutation de la sous-unité α_1 est connue pour provoquer des désordres cérébraux importants, comme un retard mental, des ataxies et une atrophie du cerveau (Nothwang *et al.*, 2001). Ces données laissent supposer que la sous-unité catalytique α_1 joue un rôle capital pendant le développement du cerveau et probablement dans la migration des neurones. Il reste à identifier précisément la nature de ce rôle et, sachant que *LIS1* est une MAP (voir plus loin), d'établir les éventuelles relations pouvant exister entre le PAF-AH(I) et les MTs.

D. NUDC, NUDE et leurs orthologues

La remarquable conservation de *LIS1* au cours de l'évolution a permis de caractériser certaines interactions importantes pour les fonctions de cette protéine. *NudF*, l'orthologue de *LIS1* chez *Aspergillus nidulans*, a été identifié dans un crible visant à isoler des mutants dont la migration du noyau est déficiente (*nud*, « Nuclear Distribution ») (Xiang *et al.*, 1995a). Ces mutants croissent plus lentement et présentent une incapacité à développer des spores asexuées (conidies). Chez les mammifères, d'autres orthologues de protéines impliquées dans cette même voie fonctionnelle sont connus pour interagir directement avec *LIS1*. Tel est le cas de *NudC*, l'orthologue chez les mammifères de *NUDC* (Morris *et al.*, 1998b; Morris *et al.*,

1997). NUDC est une protéine d'environ 22 kDa très conservée depuis *Aspergillus nidulans* jusqu'à l'homme (Matsumoto et Ledbetter, 1999; Osmani *et al.*, 1990). Elle est connue pour contrôler le taux intracellulaire de NUDF chez *Aspergillus nidulans* (Xiang *et al.*, 1995a). En effet, les champignons portant la mutation *nudC3* ont significativement moins de protéines NUDF et présentent des problèmes de migration des noyaux et de croissance similaires à ceux des mutants *nudF6* et *nudF7*. A ce propos, il est intéressant à noter que les mutations *nudF6* et *nudF7* conduisent à une diminution importante du taux de NUDF. Par ailleurs, la transformation des mutants *nudC3* par des copies additionnelles de *nudF* restaure la migration nucléaire (Xiang *et al.*, 1995a). Ce phénotype n'est pas sans rappeler l'effet de l'haploinsuffisance du gène *Lis1* chez la souris et suggère fortement une similitude des deux mécanismes impliqués, respectivement, dans la migration du noyau chez *Aspergillus nidulans* et dans la migration des neurones du cortex cérébral chez les mammifères (Cf. III.G.2.) (Hirotsune *et al.*, 1998; Morris *et al.*, 1998a). En outre, les séquences de *NudC* du rat (Morris *et al.*, 1997), de *Caenorhabditis elegans* (Dawe *et al.*, 2001) et de la drosophile (Cunniff *et al.*, 1997) sont chacune capables de compléter la mutation *nudC3* chez *Aspergillus nidulans*, suggérant fortement que le couple NUDF-NUDC, chez *Aspergillus nidulans*, et le couple LIS1-NudC, chez les eucaryotes supérieurs, ont des fonctions similaires.

La protéine NUDE a été identifiée dans un crible dont le but était d'isoler des supresseurs multi-copies de la mutation *nudF7* (Efimov et Morris, 2000). Sa délétion du génome d'*Aspergillus nidulans* produit des effets comparables, quoique moins sévères, à ceux qui sont engendrés par la délétion de *nudF*. NUDE est une protéine ubiquitaire très conservée comme NUDF et NUDC. En effet, des orthologues sont connus chez *Neurospora crassa*, RO11 (Minke *et al.*, 1999), chez le xénope, MP43 (Mitotic Phosphoprotein 43) (Stukenberg *et al.*, 1997), chez la souris, mNudE (Feng *et al.*, 2000) et NUDEL (Sasaki *et al.*, 2000), chez le rat, rNUDE (Kitagawa *et al.*, 2000) et chez l'homme, hNudE (Feng *et al.*, 2000) et NUDEL (Niethammer *et al.*, 2000). Il est donc important de noter qu'il existe, chez les mammifères, deux gènes distincts produisant chacun une protéine équivalente à NUDE (mNudE et NUDEL).

NUDE interagit directement avec NUDF par l'intermédiaire de son domaine en « coiled-coil » situé dans sa partie amino-terminale (Efimov et Morris, 2000). Cette interaction est très conservée puisque mNudE, rNUDE et NUDEL interagissent directement avec LIS1 via le même domaine (Feng *et al.*, 2000; Kitagawa *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2000). Il a été montré, en outre, que des mutations du gène *LIS1*, identifiées chez des patients

atteints de lissencéphalie, abolissent totalement son interaction avec mNudE et NUDEL (Feng *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2000). Sachant, par ailleurs, que NUDE est un suppresseur multi-copies de NUDF chez *Aspergillus nidulans*, il est fort probable que mNudE et NUDEL agissent en aval de LIS1 et qu'ils constituent des effecteurs de cette protéine au cours du développement du néocortex chez les mammifères.

E. LIS1 interagit avec le complexe dynéine / dynactine

Chez *Aspergillus nidulans*, certaines protéines codées par les gènes *nud* sont des sous-unités de la dynéine cytoplasmique (Beckwith *et al.*, 1998; Xiang *et al.*, 1994). En effet, NUDA, NUDI et NUDG sont les orthologues respectivement de la DHC, de la DIC et de la LC8. La protéine NUDK est, quant à elle, l'orthologue d'Arp1, une sous-unité de la dynactine (Xiang *et al.*, 2000). Des interactions génétiques entre LIS1 et le complexe dynéine/dynactine (D/D) ont également été suggérées dans des travaux réalisés sur la drosophile (Lei et Warrior, 2000; Liu *et al.*, 2000; Swan *et al.*, 1999) et la levure bourgeonnante (Fujiwara *et al.*, 1999). Plus récemment, des interactions directes entre LIS1/NUDF et le complexe D/D ont été démontrées par la combinaison d'expériences de co-précipitation, de co-immunoprécipitation (à partir de protéines purifiées, d'extrait de cerveau de rat ou de veau et/ou d'extrait de cellules transfectées) et de double hybride (Cf. tableau récapitulatif qui suit). Ces interactions directes impliquent le domaine ATPasique (P1 loop) de la DHC/NUDA (Hoffman *et al.*, 2001; Sasaki *et al.*, 2000; Tai *et al.*, 2002), la DIC (Faulkner *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000; Tai *et al.*, 2002) et la p50 (Tai *et al.*, 2002). De plus, le domaine carboxy-terminal de LIS1 (domaine WD) est suffisant pour l'interaction avec la DHC (Sasaki *et al.*, 2000; Tai *et al.*, 2002), la DIC et la p50 (Tai *et al.*, 2002). Par ailleurs, LIS1 interagit directement avec un site additionnel de la DHC, distinct du domaine ATPasique. Il s'agit d'une région recouvrant notamment le site responsable de l'interaction avec les chaînes intermédiaires légères (LICs), situé dans la partie amino-terminale en amont du premier domaine AAA (le site ATPasique) (Tai *et al.*, 2002). Cela dit, LIS1 et la LIC peuvent coexister sur ce même site de la DHC. Compte tenu de la structure de la DHC, les auteurs ont suggéré qu'une molécule de LIS1 pourrait interagir en même temps avec le site ATPasique et le domaine amino-terminal. En outre, LIS1 peut se lier à un site ATPasique non fonctionnel de la DHC. Autrement dit, l'interaction de LIS1 au site ATPasique n'est en rien affectée par la liaison ou non d'une molécule d'ATP (Tai *et al.*, 2002).

La p150^{glued}, Arp1 et la p62 semblent également interagir avec LIS1 dans des expériences de co-immunoprécipitation à partir d'extrait de cerveau de veau, mais aucune interaction directe n'a été publiée (Faulkner *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000). Ces interactions n'ont pas été confirmées lors d'expériences de co-immunoprécipitation réalisées à partir d'extrait de cellules COS7 co-transfectées, ce qui suggère un lien plus étroit entre LIS1 et le complexe D/D dans le cerveau. Il n'a pas été non plus possible de montrer une interaction, aussi faible fût-elle, entre LIS1 et les LICs, d'une part, et LIS1 et les LCs (LC8, Tctex-1 et RP3), d'autre part (Tai *et al.*, 2002). De façon analogue, NUDG (l'orthologue de LC8 chez *Aspergillus nidulans*) n'interagit pas directement avec NUDF, comme le montre les expériences de double hybride, de co-précipitation et de co-immunoprécipitation réalisée sur des protéines purifiées (Hoffmann *et al.*, 2001).

Quelques divergences entre les mammifères et *Aspergillus nidulans* paraissent informatives au regard des fonctions de LIS1 et de NUDF dans leurs organismes respectifs. En effet, la protéine NUDF n'interagit pas du tout avec NUDK (Hoffmann *et al.*, 2001), alors qu'il existe une interaction, au moins indirecte, entre LIS1 et Arp1 chez les mammifères. De plus, bien qu'une approche de double hybride ait permis de montrer une interaction faible entre NUDI et NUDF, les auteurs n'ont constaté aucun lien direct ou indirect entre ces deux protéines dans des expériences biochimiques (Hoffmann *et al.*, 2001). Cela s'oppose aux résultats obtenus chez les mammifères qui indiquent sans ambiguïté une interaction directe entre LIS1 et la DIC. De même, NUDF ne semble pas interagir avec le domaine aminoterminal de NUDA (Hoffmann *et al.*, 2001), contrairement à LIS1 qui se lie à un site de la DHC recouvrant notamment le domaine d'interaction avec les LICs.

| Interaction des sous-unités du complexe D/D avec LIS1 | <u>Co-immuno-précipitation</u> sur extrait de cerveau (de veau et/ou de rat) | <u>Co-immuno-précipitation</u> sur extrait de cellules co-transfectées | <u>Double Hybride</u> | <u>Orthologue chez <i>Aspergillus nidulans</i></u> | <u>Interaction directe avec NUDF*</u> (double hybride et co-immuno-précipitation sur protéines purifiées) | <u>Références</u> |
|--|--|--|------------------------------|---|---|---------------------------|
| DHC | + | + | + | NUDA | + | (a), (c), (d), (e) et (g) |
| DIC | + | + | + | NUDI | +/- | (a), (c), (d), (f) et (g) |
| LIC1 et LIC2 | N/D | - | N/D | inconnu | N/A | (g) |
| LC8 | N/D | - | N/D | NUDG | - | (c) et (g) |
| Tetex-1 et RP3 | N/D | - | N/D | inconnu | N/A | (g) |
| p150 ^{glued} | + | - | N/D | inconnu | N/A | (a), (d), (f) et (g) |
| Arp1 | + | - | N/D | NUDK | - | (a), (c) et (g) |
| p62 | + | - | N/D | inconnu | N/A | (a) et (g) |
| p50 | N/D | + | + | inconnu | N/A | (g) |

***Interaction avec NUDF des orthologues, chez *Aspergillus nidulans*, des sous-unités du complexe D/D. (a) :**(Faulkner *et al.*, 2000), **(b) :**(Feng *et al.*, 2000), **(c) :**(Hoffmann *et al.*, 2001), **(d) :**(Niethammer *et al.*, 2000), **(e) :**(Sasaki *et al.*, 2000), **(f) :**(Smith *et al.*, 2000), **(g) :**(Tai *et al.*, 2002).

Etant donné qu'elle interagit avec plusieurs sous-unités du complexe D/D, LIS1 pourrait être impliquée dans l'assemblage et la régulation de ce dernier, dans un large éventail de processus cellulaires. Elle pourrait, en particulier, renforcer l'interaction entre la dynéine cytoplasmique et la dynactine. Alternativement, elle pourrait influencer sur l'activité ATPasique de la dynéine cytoplasmique en renseignant, par exemple, la DHC de la présence ou non d'un cargo à transporter.

NUDF et LIS1 interagissent aussi avec le complexe D/D par l'intermédiaire respectivement de NUDE et de NUDEL et mNude (Cf. tableau récapitulatif qui suit). En effet, NUDE interagit directement non seulement avec NUDF, mais aussi avec NUDA, NUDG et NUDK chez *Aspergillus nidulans* (Hoffmann *et al.*, 2001). Chez les mammifères,

alors que le domaine en « coiled coil » de NUDEL interagit directement avec LIS1, son domaine carboxy-terminal interagit directement avec le domaine ATPasique (comme LIS1) et le domaine carboxy-terminal de la DHC (Sasaki *et al.*, 2000). De plus, NUDEL interagit avec la DIC, les LICs et la p150^{glued} (plus faiblement) lors d'expériences de chromatographie d'affinité (« GST-pull down ») et/ou de co-immunoprécipitation sur des extraits de cerveau de rat (Niethammer *et al.*, 2000). Par ailleurs, mNudE interagit directement avec LC8, l'orthologue de NUDG (Feng *et al.*, 2000). De plus, des expériences de co-sédimentation à partir d'extrait de cerveau traité au taxol montre que LIS1 et NUDEL forment avec la dynéine cytoplasmique un complexe associé aux MTs (Sasaki *et al.*, 2000).

| Interaction des sous-unités de D/D avec NUDEL et/ou mNudE[#] | <u>Double Hybride</u> | <u>Co-immunoprécipitation</u> sur extrait de cellules COS7 co-transfectées | <u>Co-immunoprécipitation</u> sur extrait de cerveau de rat | <u>GST-pull down</u> sur extrait de cerveau de rat | <u>GST-pull down</u> sur préparation de dynéine cytoplasmique purifiée | <u>Orthologue chez <i>Aspergillus nidulans</i></u> | <u>Interaction directe avec NUDE*</u> (double hybride et co-immunoprécipitation <u>sur protéines purifiées</u>) | <u>Références</u> |
|--|------------------------------|--|---|--|--|---|--|--------------------------|
| DHC | + | + | + | N/D | + | NUDA | + | (c), (d) et (e) |
| DIC | N/D | N/D | + | + | + | NUDI | +/- | (c) et (d) |
| LICs | N/D | N/D | N/D | N/D | + | inconnu | N/A | (d) |
| LC8 | + | N/D | N/D | N/D | N/D | NUDG | + | (b) et (c) |
| p150^{glued} | N/D | N/D | +/- | N/D | N/D | inconnu | N/A | (d) |
| Arp1 | N/D | N/D | N/D | N/D | N/D | NUDK | + | (c) |

#Seule l'interaction avec LC8 concerne mNudE.

***Interaction avec NUDE des orthologues, chez *Aspergillus nidulans*, des sous-unités du complexe D/D. Mêmes références bibliographiques citées plus haut.**

NudC pourrait aussi constituer un intermédiaire entre LIS1 et le complexe D/D. En effet, un anticorps dirigé contre la DHC est capable d'immunoprécipiter ensemble la DIC et NudC à partir d'extrait de cerveau de souris (Aumais *et al.*, 2001). Cela dit aucune interaction directe n'a pu être mise en évidence à ce jour.

F. Fonctions cellulaires de LIS1

1. LIS1 contrôle l'activité de la dynéine cytoplasmique

LIS1 se comporte comme un co-facteur de la dynéine cytoplasmique dans un grand nombre de processus cellulaires. A titre d'exemple, nous présentons ici brièvement trois observations expérimentales supportant cette assertion.

La sur-expression de LIS1 dans des cellules COS7 provoque une diminution importante de la solubilité de la DIC et de la p150^{glued} accompagnée d'une augmentation de la taille des complexes protéiques (entre 16S et 25S) contenant ces deux molécules (Smith *et al.*, 2000). Sachant que les complexes D/D sédimentant à 20S sont fonctionnels, il est probable que LIS1 favorise l'assemblage du complexe D/D et, par là même, contrôle son activité.

Dans des fibroblastes embryonnaires *Lis1*^{+/-}, contenant seulement 50% du taux normal de LIS1, β -COP, un marqueur de l'appareil de Golgi, est anormalement diffus dans tout le volume de la cellule (Sasaki *et al.*, 2000). En revanche, la sur-expression de LIS1 dans des cellules COS7 provoque le resserrement de l'appareil de Golgi à proximité du noyau (Smith *et al.*, 2000). Sachant que le complexe D/D participe au transport des vésicules depuis le réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi (Presley *et al.*, 1997), nous pouvons supposer que LIS1 constitue un activateur de ce moteur moléculaire. Par ailleurs, dans ces mêmes fibroblastes ne contenant que 50% du taux normal de LIS1, la DHC est anormalement concentrée autour du noyau. Parallèlement, la sur-expression du domaine carboxy-terminal de NUDEL, capable d'interagir avec la « P1 loop » et la partie carboxy-terminale de la DHC, dans des cellules COS7 provoque la même distribution péri-nucléaire de la DHC (Sasaki *et al.*, 2000). Ces données indiquent que la localisation et probablement le fonctionnement du complexe D/D dépendent de NUDEL et de LIS1.

Chez la souris, LIS1 et NUDEL s'accumulent à partir de P5 dans les axones des neurones du néocortex (Sasaki *et al.*, 2000). Cette nouvelle localisation perdurera tout au long de la vie adulte de l'animal, non seulement, dans les neurones du cortex, mais aussi, dans les neurones du système nerveux périphérique. Cela suggère que LIS1, accompagnée de NUDEL, joue un rôle dans l'axone du neurone mature, peut-être dans le transport rétrograde dépendant de la dynéine cytoplasmique. Pour tester cette hypothèse une expérience de ligature du nerf sciatique a été réalisée (Sasaki *et al.*, 2000). Six heures après cette dernière, la kinésine KIF5C

s'accumule uniquement du côté proximal de la ligature (proche du corps cellulaire), alors que NUDEL et LIS1 se trouvent localisées avec la DIC des deux côtés (régions proximale et distale de la ligature). Cela montre, de façon convaincante, que les protéines LIS1 et NUDEL sont associées à la dynéine cytoplasmique pendant le transport axonal rétrograde. Cela soutient également l'hypothèse selon laquelle LIS1 et NUDEL pourraient contrôler le complexe D/D dans un large éventail de ses fonctions cellulaires.

2. LIS1 contrôle la dynamique des Microtubules

Comme nous l'avons évoqué dans le premier chapitre, de nombreux processus cellulaires, comme la migration cellulaire et la mitose, requièrent un contrôle très élaboré du cytosquelette et, de façon concomitante, de la polarité cellulaire. Il a été suggéré, chez divers organismes, un lien étroit entre LIS1 et la régulation de la dynamique des MTs.

a) Aspergillus nidulans

Chez *Aspergillus nidulans*, une mutation dans le gène *tubA*, codant pour la tubuline α , supprime l'effet de mutations dans les gènes *nudA*, *nudC*, *nudG* et *nudF*, même lorsqu'il s'agit d'une délétion complète de *nudF* ou de *nudA* (Willins *et al.*, 1995). Par ailleurs, cette mutation confère aux champignons une sensibilité accrue au froid et au bénomyl, une drogue capable de dépolymériser les MTs. De plus, les auteurs ont montré que le bénomyl est capable à lui seul de contrecarrer les effets des mutations dans *nudA*, *nudC*, *nudG* et *nudF* (Willins *et al.*, 1995). Aussi, étant donné qu'une déstabilisation « artificielle » des MTs est capable de palier une carence en protéine NUDF, cette dernière pourrait être impliquée dans un mécanisme qui contrôle la dynamique des MTs. Cela indique aussi que la dynamique des MTs est essentielle à la migration des noyaux dans l'hyphe du champignon *Aspergillus nidulans*.

NUDF interagit directement avec la tubuline α et la tubuline γ (Hoffmann *et al.*, 2001). Elle se localise *in vivo*, ainsi que NUDA et NUDI, à l'extrémité (+) des MTs en cours de polymérisation et parfois lors de leur dépolymérisation (Han *et al.*, 2001; Xiang *et al.*, 2000). De plus, NUDA et NUDI dépendent l'un de l'autre et de NUDK mais pas de NUDF pour être recrutés sur les bouts (+) des MTs (Xiang *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002a). Une mutation « perte de fonction » dans le gène *nudF* provoque, *in vivo*, une diminution importante de la fréquence de catastrophe et de sauvetage ainsi qu'une baisse significative de la vitesse de dépolymérisation, sans affecter la vitesse de polymérisation (Han *et al.*, 2001).

L'ensemble de ces résultats, obtenus chez *Aspergillus nidulans*, semble indiquer que NUDF est une « +TIP » (« + end Tracking Protein » (Schuyler et Pellman, 2001a)) qui contribue à augmenter la dynamique des MTs *in vivo*. C'est, toutefois une +TIP » particulière, puisqu'elle peut maintenir son association avec les bouts (+) des MTs dépolymérisant.

b) Les mammifères

Dans des cellules interphasiques de mammifères, LIS1 est localisée, de façon ponctuée, le long des MTs (Sapir *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2000). Cependant, aucune localisation dynamique aux bouts (+) des MTs n'a été rapportée à ce jour.

Comme cela a été évoqué plus tôt, la dynéine cytoplasmique et la dynactine (p50, p150 et Arp1) se localisent de façon dynamique à l'extrémité (+) des MTs dans des cellules COS7 et HeLa (Valetti *et al.*, 1999; Vaughan *et al.*, 1999). Dans des cellules COS7 sur-exprimant NUDEL, la DIC et NUDEL se co-localisent sur les bouts (+) des MTs et le recrutement de la DIC sur ces derniers est considérablement accru (Niethammer *et al.*, 2000). En revanche, la sur-expression de LIS1 déplace la p150^{glued} (Faulkner *et al.*, 2000) et la DIC (Niethammer *et al.*, 2000) des bouts (+) des MTs sans affecter la localisation d'EB1 (Faulkner *et al.*, 2000). LIS1 semble donc influencer sur le recrutement du complexe D/D aux bouts (+) des MTs dans des cellules de mammifères, alors que NUDF n'est pas nécessaire à ce recrutement chez *Aspergillus nidulans*. Par ailleurs, la délocalisation du complexe D/D des bouts (+) des MTs ne semble pas influencer sur la dynamique des MTs puisque la sur-expression de LIS1 ne perturbe pas le recrutement d'EB1 à cet endroit. Pour s'en assurer, il faudra toutefois réaliser des mesures de la dynamique des MTs dans ces conditions.

La protéine LIS1 co-sédimente avec les MTs à partir d'extrait de cerveau de souris et se co-assemble, *in vitro*, avec de la tubuline purifiée. De plus, elle interagit directement avec la tubuline α et peut réguler, *in vitro*, la dynamique des MTs (Sapir *et al.*, 1997). En effet, LIS1 réduit la fréquence de catastrophe et augmente la taille maximale pouvant être atteinte par les MTs *in vitro*. Cet effet est optimum lorsque le rapport [LIS1/dimère de tubuline] est d'environ 1/5, ce qui est cohérent avec les taux physiologiques mesurés dans les cellules PC12.

Ces données vont à l'encontre des résultats obtenus, *in vivo*, par l'équipe de N.R. Morris concernant le rôle de NUDF dans le contrôle de la dynamique des MTs chez

Aspergillus nidulans (Cf. le paragraphe précédent). Néanmoins, il est fort probable que la mutation « perte de fonction » de *nudF*, chez *Aspergillus nidulans*, provoque des effets pléiotropiques qui convergent vers la stabilisation des MTs, sans que cela signifie que NUDF ait une fonction déstabilisante par elle-même. En revanche, le travail biochimique de l'équipe de O. Reiner (Sapir *et al.*, 1997) montre un effet direct de LIS1 sur la dynamique des MTs en s'affranchissant, au moyen d'un système acellulaire, des autres fonctions et interactions de cette protéine (effets sur NudC, NUDEL, mNUDE etc...). Cela est d'autant plus important que mNudE et NUDEL semblent jouer un rôle dans la nucléation et la polymérisation des MTs (Feng *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2000).

La protéine DCX (Doublecortine) est également capable de s'associer aux MTs et de stimuler, *in vitro*, la polymérisation de ces derniers (Gleeson *et al.*, 1999). Elle peut directement interagir avec LIS1, et cette interaction promeut, de façon additive, la polymérisation des MTs *in vitro* (Caspi *et al.*, 2000). Ces données récentes suggèrent un lien fonctionnel entre ces deux protéines et renforcent l'hypothèse selon laquelle la perturbation de la dynamique des MTs est impliquée dans la lissencéphalie de type I, en empêchant très probablement la migration des neurones dans la plaque corticale.

3. LIS1 participe au fonctionnement du MTOC

LIS1, NudC, mNudE et NUDEL se co-localisent avec la tubuline γ aux centrosomes de cellules neuronales et COS7 (Aumais *et al.*, 2001; Feng *et al.*, 2000; Niethammer *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000). La sur-expression de LIS1 dans des cellules COS7 provoque une augmentation du recrutement de la p150^{glued} et de la DIC sur le centrosome et entraîne le déplacement de MTs vers la périphérie. Dans ces cellules, la focalisation des extrémités (-) des MTs au MTOC est perturbée alors que la localisation de la tubuline γ n'y est pas affectée. De plus, après trois heures de traitement des cellules au nocodazole, la sur-expression de LIS1 conduit, pendant le relâchement, à l'accumulation de fragments de MTs isolés dans tout le volume cellulaire. Le MTOC conserve cependant la capacité de nucléer des MTs dans ces cellules. Parallèlement, dans des fibroblastes embryonnaires en culture, ne contenant que 50% du taux normal de LIS1, l'organisation du réseau microtubulaire est altérée et les MTs sont davantage concentrés autour du noyau que dans des fibroblastes *Lis1*^{+/+} (Smith *et al.*, 2000). L'ensemble de ces données indique que LIS1 pourrait faciliter le détachement de MTs du MTOC. Alternativement, LIS1 pourrait

réguler la focalisation des extrémités (-) des MTs, fonction également attribuée au complexe D/D (chapitre II).

La protéine mNudE est un élément essentiel du centrosome. En effet, elle se co-immunoprécipite avec la tubuline γ et elle interagit directement avec beaucoup d'autres protéines centrosomales comme la péricentrine, la mitosin, SLAP, CEP110 et TCP-1 (Feng *et al.*, 2000). En revanche et contrairement à NUDE, LIS1 ne semble pas interagir physiquement avec la tubuline γ , suggérant que mNudE pourrait recruter LIS1 sur le centrosome.

La sur-expression de mNudE dans des cellules COS7 provoque un bouleversement important de l'organisation du réseau de MTs. En effet, les MTs apparaissent fréquemment détachés du MTOC et la tubuline γ est délocalisée du centrosome dans ces cellules. Cette nucléation ectopique des MTs est parfois accompagnée d'une polymérisation de la tubuline γ en γ -tubules (Feng *et al.*, 2000). Ces données indiquent que mNudE participe à la formation du MTOC et à la nucléation des MTs.

Somme toute, mNudE et peut-être NUDEL pourraient constituer des effecteurs de LIS1 au centrosome. Corroborant cette hypothèse, la sur-expression de LIS1 dans des cellules COS7 conduit à une redistribution péri-nucléaire de NUDEL, alors que dans les fibroblastes *Lis1*^{+/-} (Cf. plus haut), NUDEL est plus diffus dans le cytoplasme (Niethammer *et al.*, 2000).

Sachant que certaines mutations de LIS1, découvertes chez des patients atteints d'ILS ou de MDS, annihilent son interaction avec mNudE et NUDEL (Feng *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2000), il est probable que les fonctions de LIS1 au centrosome soient altérées au cours de la lissencéphalie. A cet égard, il serait intéressant de vérifier que ces protéines LIS1 mutées sont toujours détectées au centrosome et que les MTs sont correctement nucléés et organisés dans les différents types cellulaires chez ces patients.

Il est établi qu'une fois le neurone mature, le centrosome participe à la formation des dendrites et à la projection de l'axone (Baas, 1999). Au cours du développement du cerveau chez la souris, NUDEL et LIS1 sont détectées sur le centrosome des neurones du néocortex. En effet, LIS1 et NUDEL co-localisent à E15.5 avec la tubuline γ dans les neurones situés depuis la zone ventriculaire jusqu'à la plaque corticale, suggérant qu'une partie de ces protéines a une fonction au centrosome lors de la neurogenèse et/ou pendant la migration neuronale. Une partie non négligeable reste toutefois cytoplasmique. A P5, la distribution de

LIS1 et de NUDEL subit un changement radical. Ces deux protéines tendent effectivement à disparaître du centrosome pour s'accumuler dans l'axone. Ce changement dynamique de localisation de LIS1 et de NUDEL a également été observé au cours du développement du cervelet et a été confirmé sur des neurones en cultures issus de cerveaux embryonnaires de souris à E15.5 (Sasaki *et al.*, 2000). Ces données suggèrent que ces protéines, associées initialement au centrosome, participent à la projection de l'axone à partir de P5 (Sasaki *et al.*, 2000).

Des expériences de migration de cellules granuleuses du cervelet *in vitro* ont permis de montrer que NudC se co-localise avec LIS1 et la DIC à l'extrémité des neurites et sur le MTOC de façon polarisée. En effet, lorsque les conditions nécessaires à la migration sont réunies, le centrosome, sur lequel se trouvent localisées LIS1, NudC et la DIC, s'oriente de façon à faire face au front de migration. En revanche, les neurones, dont le milieu de culture ne permet pas la migration, présentent une distribution diffuse de NudC dans le soma avec cependant un léger enrichissement du côté du noyau où se trouve le MTOC et la DIC (Aumais *et al.*, 2001). Ces données tendent à confirmer l'implication du complexe D/D dans le mécanisme de réorientation du MTOC, suggérée aussi chez des astrocytes en migration *in vitro* (Etienne-Manneville et Hall, 2001), et indiquent un rôle probable pour LIS1 et NudC dans ce processus. Par ailleurs, la co-localisation de NudC et de la p150, dans des cellules COS-1, sur une région du cortex faisant grossièrement face au MTOC, suggère que le complexe D/D pourrait exercer une force de traction sur les MTs au cortex de façon à orienter le MTOC vers le front de migration (Aumais *et al.*, 2001). Cependant, la dynéine cytoplasmique n'a pas été détectée au cortex de ces cellules.

En conclusion, LIS1, accompagnée de NUDEL et mNudE, pourrait participer à la nucléation des MTs, au maintien des extrémités (-) des MTs focalisées au centrosome et à la projection de l'axone du neurone mature. Avec NudC et le complexe D/D, LIS1 semble participer aussi à la polarisation du réseau microtubulaire des neurones en migration. Afin d'élucider les fonctions précises de LIS1 et de ses partenaires au MTOC, il serait intéressant d'étudier les effets de la perturbation de chacune de ces protéines (micro-injection d'anticorps, siRNA etc...) sur des processus cellulaires, comme la migration et la mitose (séparation des pôles, assemblage du fuseau de division, etc...), pendant lesquels le centrosome joue un rôle capital (voir chapitre I.C.). Il serait également très informatif d'établir la hiérarchie de recrutement au MTOC des protéines que nous venons de décrire.

4. LIS1 contrôle la migration nucléaire

Chez *Aspergillus nidulans*, des mutations dans le gène *nudA* sont capables de supprimer la mutation *nudF6* sans augmenter le taux de NUDF dans les cellules. De plus, le double mutant [*nudF7* ; Δ *nudA*] présente le même phénotype que le simple mutant Δ *nudA* et certains mutants de *nudA* peuvent contourner une délétion complète de *nudF*. Tout cela semble indiquer, d'une part, que les protéines NUDF et NUDA jouent un rôle dans la même voie fonctionnelle et, d'autre part, que NUDF agit en amont de la dynéine cytoplasmique pour assurer la migration des noyaux et peut-être d'autres processus dépendant du complexe D/D (Willins *et al.*, 1997).

De même, PAC1p, l'orthologue de LIS1 chez *Saccharomyces cerevisiae*, joue un rôle déterminant dans la migration du noyau, de concert avec la dynéine cytoplasmique (Geiser *et al.*, 1997).

Nous verrons plus en détail, dans le paragraphe traitant du développement embryonnaire, que LIS1, le complexe D/D et les MTs fonctionnent de concert, au cours de l'ovogenèse et lors du développement du système nerveux chez la drosophile et la souris, pour assurer notamment le positionnement des noyaux et probablement la migration des neurones.

5. Fonctions de LIS1 au cours de la mitose

Les taux respectifs de NudC, NUDEL et LIS1 sont particulièrement élevés dans les cellules prolifératives, ce qui suggère une implication de ces protéines dans la division cellulaire (Gocke *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 1999; Niethammer *et al.*, 2000; Reiner *et al.*, 1995; Sasaki *et al.*, 2000).

La sur-expression de LIS1 dans des cellules MDCK et COS7 provoque une augmentation importante de l'indice mitotique et génère un nombre accru de cellules en pré-métaphase (Faulkner *et al.*, 2000). Quoique moins sévère, ce phénotype est comparable à celui que provoque la sur-expression de la p50 (Echeverri *et al.*, 1996). La diminution de 93% du taux de LIS1 dans les cellules COS7, par une approche « anti-sens », conduit également à une augmentation de l'indice mitotique, ce qui tend à montrer que LIS1 est nécessaire au bon déroulement de la mitose (Faulkner *et al.*, 2000).

a) LIS1 et les sites corticaux

Les cellules, dont le taux de LIS1 est modifié, présentent fréquemment un fuseau mitotique altéré. En effet, le nombre de fuseaux multipolaires est significativement accru dans les cellules COS7 et MDCK sur-exprimant ou sous-exprimant LIS1. De plus, un grand nombre de cellules COS7 mitotiques sur-exprimant LIS1 sont anormalement étalées et contiennent un fuseau de division mal positionné. Dans certaines cellules en pré-métaphase tardive ou en métaphase, les MTs astériens sont anormalement longs et se courbent au contact du cortex pour longer le bord de la cellule ou se diriger vers le cytoplasme. Ce phénotype est comparable à celui qui est provoqué par la délétion de *DYNI* (dynéine cytoplasmique) ou de *PAC1p* chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Carminati et Stearns, 1997; Faulkner *et al.*, 2000; Geiser *et al.*, 1997).

Le complexe D/D est impliqué dans l'attachement et le glissement des MTs astériens au cortex cellulaire chez *Saccharomyces cerevisiae* (Adames et Cooper, 2000; Carminati et Stearns, 1997) et probablement chez *Caenorhabditis elegans* (Gonczy *et al.*, 1999; Skop et White, 1998). Chez les mammifères, la dynéine cytoplasmique, la dynactine (Busson *et al.*, 1998) ainsi que LIS1 (Faulkner *et al.*, 2000) se co-localisent au cours de la mitose sur les MTs astériens, sur les pôles du fuseau de division et sur les sites corticaux (voir aussi chapitre I.C.2.). Dans les cellules MDCK sur-exprimant LIS1, la dynéine cytoplasmique ainsi que la dynactine sont toujours localisés aux endroits que l'on vient d'évoquer à l'exception des sites corticaux. En effet, ces derniers sont remplacés par de larges amas localisés au cortex et dans le cytoplasme de façon apparemment aléatoire. Les MTs astériens sont désorganisés et semblent s'ancrer dans ces amas. Ce phénotype est accompagné d'un problème d'orientation du fuseau de division (Faulkner *et al.*, 2000). Ces données tendent à montrer que LIS1 contrôle la localisation et le fonctionnement du complexe D/D au cortex des cellules en mitose notamment pour l'attachement de MTs astériens et l'orientation subséquente du fuseau de division. Cela constitue la première preuve de l'implication du complexe D/D, lorsqu'il se localise au cortex, dans l'orientation du fuseau de division des cellules épithéliales.

b) LIS1 et le kinétochore

Ainsi que le complexe D/D, LIS1 est localisée sur les kinétochores pendant la pré-métaphase pour quasiment y disparaître à partir de la métaphase (Faulkner *et al.*, 2000).

Les cellules sur-exprimant LIS1 ont un nombre anormalement élevé de chromosomes non alignés sur la plaque métaphasique alors que le complexe D/D est toujours présent sur les

kinétochores. Cela suggère l'existence d'un dysfonctionnement de l'attachement et/ou de la congression de ces derniers. De plus, un nombre important de cellules interphasiques sur-exprimant LIS1, contiennent des micro-noyaux, ce qui généralement révèle un dysfonctionnement du point de contrôle métaphase/anaphase (« spindle assembly checkpoint ») (Faulkner *et al.*, 2000).

Afin de savoir si LIS1 participe aux fonctions du kinétochore (attachement, congression...), des anticorps dirigés contre LIS1 ont été micro-injectés dans des cellules NRK, juste avant la rupture de l'enveloppe nucléaire. L'observation des mouvements des chromosomes au cours de la mitose, au moyen d'un video-microscope, a permis de mettre en évidence, dans environ 50% des cellules micro-injectées, un retard dans l'alignement de certains chromosomes et parfois un défaut dans le maintien des chromosomes alignés. Ces dysfonctionnements conduisent généralement à un délai du déclenchement de l'anaphase. Cela dit, dans certains cas, l'anaphase se déclenche alors que certains chromosomes ne sont pas correctement attachés, ce qui tend à confirmer l'existence d'un dysfonctionnement du point de contrôle métaphase/anaphase. Il est intéressant de noter par ailleurs que les durées respectives de la métaphase, de l'anaphase et de la télophase ne sont pas altérées. Seule la pré-métaphase semble affectée dans ces cellules. Quoique moins prononcé, ce phénotype est comparable à celui provoqué par la micro injection d'anticorps dirigés contre la DIC dans des cellules NRK, à ceci près que ces dernières possèdent un point de contrôle métaphase/anaphase fonctionnel (Faulkner *et al.*, 2000). L'ensemble de ces données indiquent que LIS1 pourrait fonctionner de concert avec le complexe D/D dans l'attachement des MTs du fuseau de division aux kinétochores, dans les mouvements des chromosomes au cours de la pré-métaphase et/ou dans le fonctionnement du point de contrôle de l'assemblage du fuseau de division (Faulkner *et al.*, 2000).

Confirmant le rôle mitotique de LIS1, la sous-expression de hNudC dans des cellules embryonnaires humaines 293 provoque une inhibition de la prolifération cellulaire et la formation de fuseaux multi-polaires (Zhang *et al.*, 2002b). Par ailleurs, une approche « ARN interférant », *in vivo*, visant à diminuer chez le nématode *Caenorhabditis elegans* le taux de nud-1, l'orthologue de NUDC, ou de LIS1 a permis de montrer notamment que LIS1 et NudC jouent un rôle décisif dans le positionnement du noyau pendant les divisions cellulaires embryonnaires précoces (Dawe *et al.*, 2001). Compte tenu de la localisation préférentielle des protéines LIS1 et nud-1 dans les neurones, ces données suggèrent l'existence d'un lien

fonctionnel étroit entre la migration des noyaux, la division cellulaire et le fonctionnement des neurones.

G. Fonctions de LIS1 au cours du développement embryonnaire

1. Prolifération cellulaire et développement précoce

LIS1 est une protéine essentielle à la vie chez la drosophile et la souris. En effet, les embryons homozygotes, *Lis1*^{-/-} et *DLis-1*^{-/-}, pour un allèle portant une mutation nulle (mutation occasionnant une perte de fonction) meurent à un stade larvaire précoce chez la drosophile et juste après l'implantation chez la souris (Hirotune *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999). La protéine LIS1 est exprimée à partir de l'ARNm maternel de l'ovocyte dans les deux cas (Cahana et Reiner, 1999; Liu *et al.*, 1999). De plus, aux stades larvaires L1 et L2 précoce, la protéine LIS1 est clairement décelable dans une larve de drosophile homozygote *DLis-1*^{-/-}. Le taux de LIS1 diminue rapidement après le stade L2 et la larve *DLis-1*^{-/-} meurent 5 à 6 jours après (Liu *et al.*, 1999). L'ensemble de ces données suggère fortement que la survie des embryons, jusqu'au stade L2 chez la drosophile homozygote *DLis-1*^{-/-} et jusqu'à l'implantation chez la souris homozygote *Lis1*^{-/-}, est due à la présence de protéines LIS1 maternelles.

Des études réalisées, *in vitro*, sur des blastocystes isolés provenant d'embryons de souris homozygotes *Lis1*^{-/-} ont révélé une inhibition de la prolifération des cellules de la masse cellulaire interne (Hirotune *et al.*, 1998). Chez la drosophile, les techniques dites « MARCM » (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker) et « FLP-DFS » (Dominant Female Sterile – yeast Flipase recombination target) permettent d'obtenir des clones de cellules homozygotes chez des drosophiles globalement hétérozygotes pour un gène quelconque (Chou et Perrimon, 1996; Lee et Luo, 1999). En contournant la létalité d'une mutation homozygote du gène *DLis-1*, ces approches ont permis d'étudier, *in vivo*, les conséquences de l'absence totale de protéine LIS1 dans diverses cellules de la drosophile. Aussi, chez ces drosophiles mosaïques, l'absence de LIS1 diminue considérablement la prolifération des neuroblastes et des cellules de la lignée germinale, et empêche la différenciation de l'ovocyte (Liu *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 1999). De plus, la croissance, le branchement et la maturation des dendrites des neurones des « mushroom-bodies » (structures responsables de l'apprentissage et de la mémoire chez la mouche du vinaigre) sont considérablement altérés. Cette malformation des dendrites a été également observée dans

hippocampe des cerveaux de souris hétérozygote *Lis1*^{+/-} (Fleck *et al.*, 2000). Par ailleurs, en absence de LIS1, les axones des neurones des « mushroom-bodies » présentent des zones de gonflements sur toute leur longueur (Liu *et al.*, 2000). Ce phénotype a également été observé en l'absence de la chaîne lourde de la dynéine cytoplasmique, chez des drosophiles mosaïques pour le gène *Dhc64C*. Cela tend à mettre en évidence un dysfonctionnement du transport dynéine dépendant dans les axones des neurones dépourvus de LIS1. Sachant que LIS1 s'associe avec la DIC pendant le transport axonal rétrograde (expérience de la ligature du nerf sciatique évoquée plus haut, (Sasaki *et al.*, 2000)), ces données suggèrent fortement que LIS1 pourrait contribuer au fonctionnement du complexe D/D pendant ce transport.

L'ensemble de ces travaux indiquent que LIS1 joue un rôle important pendant l'ovogenèse et le développement précoce chez la souris et la drosophile. Cette protéine semble, en effet, requise pour la prolifération, la différenciation et la maturation de certaines cellules comme les neuroblastes et les cellules de la lignée germinales. Cependant, chez la souris hétérozygote *Lis*^{+/-}, la prolifération cellulaire ne semble pas affectée malgré la diminution de 50% du taux de LIS1 (Fleck *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000). Dans le paragraphe suivant, nous verrons que la migration des neurones, au cours du développement du système nerveux central, est nettement plus sensible à une diminution du taux de LIS1 que la division cellulaire.

2. Migration des neurones et développement du cerveau

Bien qu'ubiquitaire, la protéine LIS1 est exprimée plus fortement dans les neurones du système nerveux central embryonnaire et adulte de la drosophile et de la souris que dans d'autres types de cellules (Liu *et al.*, 2000; Reiner *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 2000). Au cours du développement du cortex cérébral, le taux de LIS1 est considérablement accru dans les neurones de la plaque corticale chez la souris et l'homme (Reiner *et al.*, 1995). Plus précisément, chez la souris, LIS1, la DIC, NudC et NUDEL sont fortement enrichies dans la zone ventriculaire à E13, et dans la zone marginale, la zone intermédiaire et la plaque corticale à E16 (Aumais *et al.*, 2001; Sasaki *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000) (Niethammer *et al.*, 2000). La protéine mNudE est, quant à elle, exprimée fortement dans la zone ventriculaire à E14 et, bien que son expression soit diminuée à partir de E15.5, on peut encore la détecter dans la zone ventriculaire, la zone intermédiaire et, à un plus faible niveau, dans la plaque corticale (Feng *et al.*, 2000). Ces données suggèrent fortement que LIS1, associée à la dynéine

cytoplasmique, NudC, NUDEL et mNudE, joue un rôle essentiel dans la neurogenèse (division des neuroblastes) et la migration des neurones pendant la formation du néocortex.

Les souris hétérozygotes pour un allèle de *Lis1* portant une mutation nulle (*Lis1*^{+/-}) sont viables et fertiles malgré une diminution de 50% du taux de LIS1 dans leurs cellules (Hirotune *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2000). Elles présentent des troubles moteurs et comportementaux ainsi que des difficultés d'apprentissage et de mémoire comme les patients atteints de lissencéphalie (Fleck *et al.*, 2000).

Globalement, les cerveaux adultes de ces souris hétérozygotes ne présentent pas de défaut anatomique majeur si ce n'est : des ventricules latéraux anormalement grands et un striatum ainsi qu'un septum de taille réduite (Hirotune *et al.*, 1998). Cependant, des coupes sagittales de ces cerveaux ont révélé une désorganisation importante des neurones du néocortex, des bulbes olfactifs et de l'hippocampe. En effet, Il est difficile de distinguer, dans ces cerveaux, les différentes couches de neurones bien que celles-ci apparaissent dans un ordre correct. Ces défauts histologiques sont vraisemblablement dus à une inhibition de la migration des neurones (délais ou ralentissement) au cours de l'embryogenèse, comme semblent l'indiquer les expériences réalisées *in vitro* et *in vivo* (Hirotune *et al.*, 1998). De plus, l'injection de 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) dans des souris gestantes *Lis1*^{+/-}, à différentes étapes du développement des embryons, n'a révélé aucun problème majeur de neurogenèse dans l'hippocampe (Fleck *et al.*, 2000). A quelques exceptions près, les cellules de l'hippocampe semblent effectivement proliférer normalement aux étapes appropriées du développement embryonnaire chez ces souris. Seule la migration des neurones apparaît considérablement ralentie et le plus souvent incomplète dans cette structure. Par ailleurs, il est intéressant de noter que ce ralentissement de la migration des neurones *Lis1*^{+/-} ne dépend pas de leur environnement. Autrement dit, les neurones *Lis1*^{+/-} présentent ce même défaut dans un environnement sauvage (Hirotune *et al.*, 1998).

Afin de réduire davantage le taux de LIS1, des souris hétérozygotes composées ont été générées (Hirotune *et al.*, 1998). Celles-ci présentent un allèle de *Lis1* portant une mutation nulle (occasionnant une perte de fonction) et un autre portant une mutation hypomorphe (associée à une perte de fonction partielle). Ce génotype aboutit à une diminution du taux de LIS1 supérieure à 50 % (Sasaki *et al.*, 2000). Le phénotype de ces animaux est bien plus sévère que celui des animaux hétérozygotes possédant un des deux allèles de *Lis1* intact. En effet, les souris hétérozygotes composées présentent une absence presque totale

d'organisation des neurones du néocortex, des bulbes olfactifs et de l'hippocampe ainsi que des défauts cérébelleux importants, décrits également dans le cas de certaines lissencéphalies. Ces souris meurent quelques jours après leur naissance. Ce résultat semble indiquer que la migration des neurones, au cours du développement du cerveau, dépend directement du taux de LIS1. Pour confirmer cela, il serait intéressant de comparer, *in vitro*, la vitesse de migration des neurones entre les embryons hétérozygotes et les embryons hétérozygotes composés. En outre, des études récentes tendent à montrer que la division de la pré-plaque est perturbée chez ces souris hétérozygotes composées comme lors de la lissencéphalie de type I (M.J. Gambello, données non publiées, (Gupta *et al.*, 2002)).

Une approche de type « dominant négatif » a permis de montrer que LIS1 joue un rôle essentiel dans la lamination du système nerveux central antérieur du xénope (Feng *et al.*, 2000). Cette expérience a consisté à perturber l'interaction entre LIS1 et MP43, l'orthologue de mNudE chez le xénope, en injectant dans la moitié des blastomères d'un embryon de xénope au stade 2 ou 4 cellules, un ARNm codant une forme tronquée de mNudE. Cette dernière correspond à la partie de mNudE responsable de l'interaction avec LIS1. Les embryons, ainsi injectés, ont été analysés à une étape tardive de l'embryogenèse (stade 40 ou plus tard). La moitié injectée de l'embryon présente des structures antérieures petites et déformées ainsi que des yeux de taille réduite. L'analyse histologique a révélé un défaut de la lamination de la rétine et, dans les cas les plus sévères, une absence de cristallin. De plus, la partie rostrale du télencéphale est anormalement épaisse et désorganisée si on la compare au contrôle. En revanche, les cellules non neuronales, environnant les yeux et le cerveau, ne présentent aucun défaut visible. Cela tend à confirmer l'extrême sensibilité des neurones à un déficit ou une perturbation de LIS1, aussi faible soit-ils. Ce travail laisse supposer également que les fonctions de LIS1 dans la migration des neurones et/ou la lamination du système nerveux central dépendent de son interaction avec mNudE/MP43. La découverte, chez différents patients atteints de lissencéphalie, de mutations dans LIS1 abolissant son interaction avec mNudE, NUDEL et la DHC, tend à confirmer l'hypothèse selon laquelle LIS1, accompagnée de mNudE, NUDEL et du complexe D/D, participe au mécanisme de la migration des neurones (Feng *et al.*, 2000; Sasaki *et al.*, 2000).

Venant souligner l'importance du rôle joué par LIS1 lors du développement embryonnaire des amphibiens, il a été montré que l'expression de *PNUDC*, l'orthologue de *NUDC* chez *Plorodeles waltl*, est très précisément contrôlée, dans le temps et dans l'espace,

lors de l'ovogenèse et pendant le développement à partir de la gastrulation (Moreau *et al.*, 2001).

Une étude récente a permis de faire un parallèle entre les caractéristiques biochimiques d'une protéine LIS1 mutée et les conséquences de cette dernière sur le développement embryonnaire du cortex cérébral chez la souris (Cahana *et al.*, 2001). Les auteurs de cette étude ont généré une souris dépourvue du premier exon de l'un des deux allèles de *Lis1*. Cette délétion aboutit en une protéine LIS1 plus courte (sLIS1, pour small LIS1) dont la traduction est initiée à partir de la seconde méthionine (M63). En conséquence, la protéine sLIS1 est dépourvue des deux premiers tiers du « coiled-coil ». L'allèle *sLis1* a été découvert chez un patient atteint d'une lissencéphalie relativement peu sévère. En effet, le patient n'était pas épileptique, il était capable de communiquer, de marcher sans assistance et possédait un cortex cérébral moins désorganisé que dans les cas d'une mutation nulle dans l'un des deux allèles de *Lis1*.

Contrairement aux embryons homozygotes *sLis1/sLis1*, les souris hétérozygotes *Lis1/sLis1* sont viables et fertiles. L'analyse du cortex cérébral au cours du développement précoce des souris *Lis1/sLis1* révèle un délai dans la division de la pré-plaque et la formation de la plaque corticale. Ce délai est plus prononcé dans les régions caudale et médiane de la partie dorsale du télencéphale embryonnaire à E14.5.

Généralement, la division de la pré-plaque a lieu graduellement depuis la région ventro-latérale jusqu'à la région dorso-médiane. Il a été montré que ce gradient suit celui de l'expression de LIS1 (Fig. 20A). En effet, l'expression de LIS1, à E12.5, décroît de la région dorsale à la région ventrale et de la région caudale à la région rostrale. De plus, les sites exprimant le plus de LIS1 à E12.5 dans les régions dorsale et caudale du cortex constituent les zones du cerveau les plus affectées chez la souris *Lis1/sLis1* (zones en couleur sur Fig.20B).

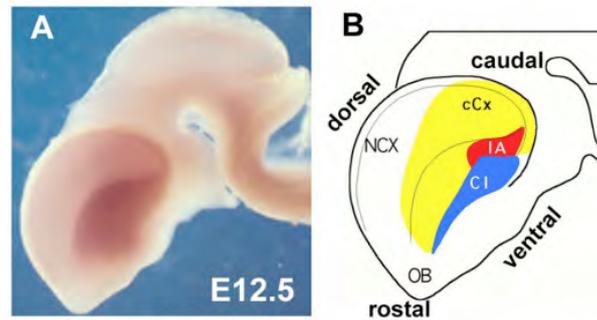


Figure 20 : (A) Hybridation *in situ* avec une sonde permettant de visualiser l'ensemble des ARNm de LIS1 dans un embryon de souris sauvage à E12.5. (B) Schéma général indiquant, par des couleurs différentes, les régions les plus affectées chez les souris *Lis1/sLis1*. D'après : (Cahana *et al.*, 2001).

Noter la corrélation entre les régions les plus affectées chez la souris *Lis1/sLis1* et les zones où *Lis1* est normalement plus fortement exprimée. NCX : néocortex ; CI : claustrum ; OB : bulbe olfactif ; cCx : cortex pariétal et occipital ; IA : amygdale latérale.

A E14.5, la morphologie des neurones pyramidaux et des cellules gliales du cortex est altérée chez la souris *Lis1/sLis1*. Entre E14.5 et E17.5, le développement des axones thalamo-corticaux est ralenti. Ceci est probablement dû au retard du développement de la plaque corticale. Par ailleurs, des expériences d'injection de BrdU ont permis de mettre en évidence un ralentissement important de la migration des neurones pendant la formation de la plaque corticale, entre E13.5 et E17.5. Il est important de souligner que l'ensemble de ces phénotypes est plus prononcé dans la partie caudale du cerveau embryonnaire où l'expression de LIS1 est normalement la plus élevée (Fig. 20).

L'étude biochimique de la protéine sLIS1 a été réalisée sur des extraits de cerveaux embryonnaires *Lis1/sLis1*, et les résultats ont été comparés à ceux obtenus à partir de cerveaux embryonnaires sauvages *Lis1+/+* (Cahana *et al.*, 2001). Il apparaît que, contrairement à LIS1, la protéine sLIS1 ne peut pas se dimériser et ne peut pas interagir avec les sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du PAF-AH. Cela suggère fortement que la dimérisation de LIS1 est nécessaire à sa participation au PAF-AH. En revanche, sLIS1 est capable de s'associer aux MTs, comme LIS1. Par ailleurs, l'activité du PAF-AH est significativement accrue dans le télencéphale dorsal des souris *Lis1/sLis1* à E14.5, mais pas chez la souris adulte. L'association de sLIS1 avec les MTs pourrait causer, par compétition, l'augmentation du taux local de LIS1 libre. Par conséquent, les molécules de LIS1 libres pourraient interagir avec le PAF-AH et augmenter son activité. Il en résulterait une diminution du taux de PAF, ce qui

pourrait affecter la dynamique des MTs et provoquer ainsi les défauts morphologiques observés chez les neurones pyramidaux et les cellules gliales. Alternativement, il est possible que sLIS1 perturbe la dynamique des MTs directement en s'associant à eux et en remplaçant partiellement LIS1.

3. Translocation nucléaire, détermination de l'ovocyte et maturation des neurones

Comme nous l'avons évoqué précédemment, la translocation nucléaire joue un rôle essentiel dans la migration neuronale au cours du développement du néocortex, principalement lors de la division de la pré-plaque et pendant les premières étapes de la formation de la plaque corticale. Compte tenu de l'implication des orthologues de LIS1, NUDF et PAC1p, dans la migration du noyau chez *Aspergillus nidulans* et *Saccharomyces cerevisiae*, il a été suggéré que l'inhibition de la migration des neurones, chez les patients atteints de lissencéphalie et chez les souris *Lis1*^{+/-}, pourrait résulter d'un dysfonctionnement de la translocation nucléaire (Geiser *et al.*, 1997; Morris *et al.*, 1998a). Des études menées sur des drosophiles portant une mutation dans *DLis-1* tendent à confirmer cette hypothèse.

Chez la drosophile, la position du noyau est déterminante pour l'établissement de la polarité de l'ovocyte. Le mécanisme de positionnement du noyau dans l'ovocyte implique notamment la dynéine cytoplasmique, les MTs ainsi que Bic-D (Bicaudal-D) et Egl (Egalitarian), des facteurs essentiels à la répartition de certains déterminants moléculaires qui définissent les axes antéro-postérieur et dorso-ventral (Mach et Lehmann, 1997; Swan et Suter, 1996).

Des drosophiles homozygotes pour la mutation hypomorphe E415 du gène *DLis-1* présentent, dans l'ovocyte au stade 9, un mauvais positionnement du noyau et une diffusion de certains facteurs de polarité comme Osk (ARNm et protéine) (Swan *et al.*, 1999). Ce défaut, constaté dans plus de la moitié des drosophiles mutantes, est probablement dû à un dysfonctionnement de la migration et/ou de l'ancrage au cortex du noyau. De même, des drosophiles hétérozygotes composées (un allèle nul et un allèle hypomorphe) pour le gène *DLis-1* présentent le même défaut de positionnement du noyau dans l'ovocyte, confirmant que la migration des noyaux est très sensible à la diminution du taux de LIS1 (Lei et Warrior, 2000).

Chez *Aspergillus nidulans* et la levure bourgeonnante, respectivement NUDF et PAC1p fonctionnent de concert avec le complexe moteur dynéine/dynactine et les MTs, au

cours de la migration du noyau (Geiser *et al.*, 1997; Willins *et al.*, 1997). Chez la drosophile, deux études récentes ont permis de démontrer une interaction fonctionnelle entre DLis-1, DHC, Glued et Bic-D pendant la migration du noyau de l'ovocyte. En effet, la DHC et DLis-1 se co-localisent très précocement au cortex de l'ovocyte et sont requises pour la détermination de celui-ci (McGrail et Hays, 1997; Swan *et al.*, 1999). De plus, il existe une interaction génétique entre *Gl* (p150^{Glued}) et *DLis-1*, d'une part, et entre *Bic-D* et *Gl*, d'autre part (Swan *et al.*, 1999). Par ailleurs, dans les ovocytes des mutants homozygotes E415, le mauvais positionnement du noyau est accompagné de la délocalisation de la DHC du cortex, d'une perturbation de l'organisation des MTs et de la diffusion de Bic-D et d'Egl depuis la région péri-nucléaire où ces protéines se trouvent normalement concentrées (Swan *et al.*, 1999). Tout cela tend à montrer que le complexe dynéine/dynactine est ancré au cortex par DLis-1 ce qui lui permet d'assurer le positionnement du noyau et la distribution de facteurs de polarité de l'ovocyte, via un mécanisme dépendant des MTs.

Chez une drosophile homozygote pour une mutation sévère (létale précocement), la migration du noyau est également affectée, au cours du développement, dans les cellules nerveuses spécialisées que sont les photorécepteurs (Swan *et al.*, 1999). Cela aboutit à une malformation importante des yeux, caractérisée notamment par une réduction de la taille et un aspect rugueux (Lei et Warrior, 2000; Swan *et al.*, 1999). Ce phénotype est en tout point comparable à celui provoqué par la mutation d'un allèle du gène *Gl* (Fan et Ready, 1997) et se trouve considérablement aggravé chez des doubles mutants pour les gènes *DLis-1* et *Gl* ou *DLis-1* et *Dhc64C* (Lei et Warrior, 2000). De plus, dans les deux cas (mutation de *Gl* et de *DLis-1*), le réseau de MTs est altérés, dévoilant en particulier une mauvaise focalisation des extrémités (-) des MTs. Ce défaut de focalisation des MTs a également été observé dans des fibroblastes embryonnaires issus de souris hétérozygotes *Lis1*^{+/-} (Smith *et al.*, 2000). Par ailleurs, une mutation dans le gène *Bic-D* provoque également un défaut de positionnement du noyau dans les cellules photo-réceptrices, sans pour autant affecter l'organisation des MTs. Ceci tend à montrer que, d'une façon analogue à polarisation de l'ovocyte, DLis-1 joue un rôle essentiel avec le complexe dynéine/dynactine et Bic-D dans la migration des noyaux des cellules nerveuses.

L'ensemble de ces données est en faveur d'un rôle de LIS1 et de la dynéine cytoplasmique dans la translocation nucléaire, MTs dépendant, au cours de la migration des neurones. Il est probable que ce processus soit affecté pendant la formation de la plaque corticale chez les patients atteints d'une lissencéphalie de type I liée au gène *LIS1*.

4. Mitose et migration des neurones au cours du développement

Bien que les cellules de l'hippocampe semblent proliférer normalement aux étapes appropriées du développement du cerveau chez les souris *Lis1*^{+/-} (avec quelques exceptions), il est possible qu'un dysfonctionnement de la division cellulaire affecte néanmoins la migration des neurones post mitotiques du néocortex.

LIS1 associée au complexe D/D pourrait contrôler les mouvements oscillants du noyau des cellules prolifératives précurseurs (cellules souches) de la zone ventriculaire. En effet, la position du noyau de ces cellules varie dans l'épaisseur de la zone ventriculaire au cours du cycle cellulaire : en G2, le noyau est transloqué vers la surface du ventricule pour se diviser et, en G1, il s'éloigne de la surface ventriculaire pour se rapprocher du cortex et entrer en phase S (Fig.21-1).

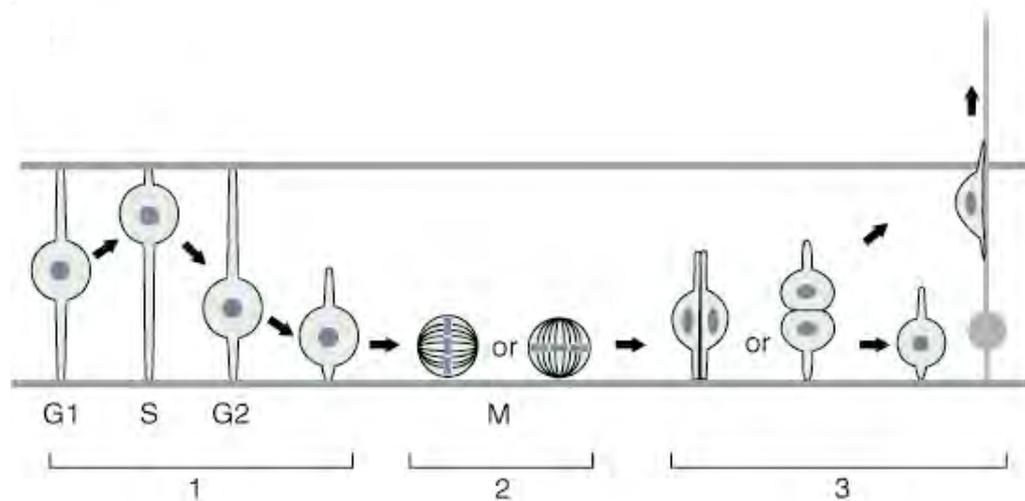


Figure 21 : Mouvements du noyau des cellules souches dans la zone ventriculaire. D'après (Faulkner *et al.*, 2000)

Etant donné que le devenir d'un neurone dépend directement du moment auquel sa dernière division a eu lieu (McConnell et Kaznowski, 1991), un dysfonctionnement du mécanisme de translocation du noyau chez les souris *Lis1*^{+/-} pourrait, en retardant l'entrée en mitose, perturber la migration et la distribution des neurones post mitotiques dans les différentes couches de la plaque corticale. De façon non exclusive, la migration du neurone post mitotique pourrait être empêchée ou ralentie faute d'un positionnement correct de la cellule précurseur dans la zone ventriculaire.

Il existe deux sortes de divisions cellulaires dans la zone ventriculaire : la division symétrique et la division asymétrique (Fig. 21-2 et -3) (Chenn et McConnell, 1995). Lors de la division symétrique, la cellule souche se divise suivant un axe vertical (perpendiculaire à la surface ventriculaire) et donne naissance à deux cellules filles identiques qui resteront connectées à la surface du ventricule et continueront à se diviser. La division asymétrique s'opère suivant un axe horizontal et produit deux cellules filles très différentes. La cellule située à proximité du domaine apical de la zone ventriculaire (surface ventriculaire) conservera une morphologie de cellules précurseur bipolaire proliférative connectée à la surface ventriculaire et dont le noyau continuera à osciller. La cellule faisant face au domaine basal de la zone ventriculaire adoptera rapidement la morphologie d'un neurone post mitotique en migration, déconnecté de la surface ventriculaire, et migrera très rapidement vers le cortex.

Comme nous l'avons évoqué plus haut (III.F.5.a)), LIS1 joue un rôle essentiel au cours de la mitose notamment dans la formation des sites corticaux et l'orientation subséquente du fuseau de division. Il est par conséquent possible que, chez les souris *Lis1*^{+/-} et les patients atteints de lissencéphalie, l'orientation du fuseau de division soit perturbée dans les cellules souches de la zone ventriculaire. De cette façon, la production de neurones post mitotiques serait inhibée ce qui pourrait expliquer le ralentissement de la migration neuronale observée.

Chez les souris *Lis1*^{+/-} et chez les souris hétérozygotes composées pour le gène *Lis1*, les défauts de migration neuronale observés dans les différentes structures que sont le bulbe olfactif, l'hippocampe, le cervelet et le néocortex sont probablement dus à une combinaison de dysfonctionnements de divers processus cellulaires comme : Translocation nucléaire, la locomotion, la polarisation cellulaire préalable à la migration (réorientation du MTOC, localisation du complexe D/D et de LIS1 à l'extrémité des neurites en extension etc...), les oscillations du noyau des cellules précurseurs de la zone ventriculaire, l'orientation du fuseau de division, la coordination entre la détermination du neurone post mitotique et le déclenchement de la dernière mitose, etc... Chacun de ces dysfonctionnements pourrait être plus ou moins prononcé selon la gravité de la mutation dans les deux allèles du gène *Lis1* et, par voie de conséquence, selon le taux de protéines LIS1 natives dans les cellules.

IV. **La CLIP-170**

Tandis que l'équipe de Thomas Kreis recherchait de nouveaux moteurs moléculaires MTs dépendants, en utilisant pour crible leur capacité de se détacher des MTs en présence d'ATP, une protéine de 170 kDa fut identifiée (Rickard et Kreis, 1990). Celle-ci a été appelée par la suite CLIP-170 pour « Cytoplasmic Linker Protein of 170 kDa » en raison de sa capacité d'établir un lien statique entre les vésicules d'endocytose et les MTs *in vitro* (Pierre *et al.*, 1992).

A. La CLIP-170 est une M.B.P (« Microtubule Binding Protein ») dont l'association aux MTs est régulée par phosphorylation

Les propriétés de la liaison de la CLIP-170 aux MTs sont très différentes de celles de la kinésine et de la dynéine cytoplasmique (Rickard et Kreis, 1990). D'une part, l'interaction de la CLIP-170 avec les MTs n'est pas sensible à la présence d'AMP-PNP, un analogue non hydrolysable de l'ATP, contrairement à la kinésine. D'autre part, le GTP est capable de détacher la CLIP-170 des MTs alors qu'il n'a aucun effet sur la dynéine cytoplasmique. La CLIP-170 semble donc se lier aux MTs indépendamment de ces deux moteurs moléculaires. Par ailleurs, la CLIP-170 sédimente à 6S, à partir d'un extrait de cellules HeLa, de façon bien distincte de la kinésine (9,5S) et de la dynéine cytoplasmique (20S), ce qui indique qu'elle n'est pas associée à ces moteurs dans les conditions de l'expérience.

L'étude biochimique de l'interaction entre la CLIP-170 et les MTs a révélé que ce n'est pas l'interaction de la CLIP-170 avec l'ATP mais la phosphorylation de la CLIP-170 qui provoque son détachement des MTs (Rickard et Kreis, 1991). En effet, la présence d'un inhibiteur de phosphatase réduit considérablement l'association de la CLIP-170 avec les MTs *in vitro*. Cette étude a suggéré également qu'une kinase associée aux MTs est responsable (au moins en partie) de la phosphorylation de la CLIP-170 sur des résidus sérines. Bien que la CLIP-170 possède plusieurs sites potentiellement phosphorylables par diverses kinases, telles que la caséine kinase II, la protéine kinase C, la protéine kinase AMPc dépendante, la protéine kinase II Ca²⁺/calmoduline dépendante et les CDKs (Matovcik *et al.*, 1994; Pierre *et al.*, 1992), l'identité de cette kinase associée aux MTs et des phosphatases capables de contrôler effectivement l'état de phosphorylation de cette protéine est encore inconnue. Néanmoins, des

expériences préliminaires ont révélé que l'activité de la kinase associée aux MTs n'est pas affectée par l'AMPc mais qu'elle est inhibée par le Ca^{2+} (Rickard et Kreis, 1991).

Par ailleurs, la dépolymérisation ou la stabilisation des MTs par un traitement au nocodazole, à la colchicine ou au taxol abolit l'incorporation de nouveaux groupements phosphates dans la CLIP-170. De plus, les traitements au nocodazole et à la colchicine augmentent la vitesse de déphosphorylation de cette protéine ce qui n'est pas le cas du traitement au taxol. Cela indique que la dynamique des MTs influe sur l'état de phosphorylation de la CLIP-170 peut-être en modulant l'activité de la kinase associée au MTs (Rickard et Kreis, 1991).

Bien que l'équipe de T. Kreis ait montré que la phosphorylation de la CLIP-170 sur des résidus sérines provoque son détachement des MTs, une étude récente révèle que la phosphorylation de multiples résidus, situés dans le domaine amino-terminal de la CLIP-170, par la kinase FRAP (pour « FKBP-Rapamycin-Associated Protein ») provoque l'effet opposé (Choi *et al.*, 2002). En effet, il existe dans la CLIP-170 des sites de phosphorylation sensibles, *in vivo*, à la rapamycine et qui peuvent être phosphorylés, *in vitro*, par FRAP. L'inhibition de ces phosphorylations par la rapamycine empêche l'interaction de la CLIP-170 avec les MTs dans les cellules HeLa et dans un test de co-sédimentation *in vitro*.

FRAP est une kinase essentielle à la prolifération cellulaire, connue pour contrôler certaines voies de signalisation qui impliquent notamment p70S6K1, 4EBP1/PHAS-1 et Gln3 (Abraham, 1998; Dennis *et al.*, 1999; Dennis et Thomas, 2002; Raught *et al.*, 2001). La rapamycine est un antibiotique qui constitue un inhibiteur très spécifique de FRAP. Cet antibiotique, ou plutôt CCL-779 (un ester dérivé de la rapamycine), est utilisé en chimiothérapie dans le traitement de certains cancers. Compte tenu du rôle joué par FRAP dans le contrôle de l'interaction de la CLIP-170 avec les MTs et sachant que les MTs sont essentiels à la prolifération cellulaire, la phosphorylation de la CLIP-170 pourrait jouer un rôle important dans l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses par la rapamycine.

B. Structure et propriétés de la CLIP-170 et des protéines apparentées

1. La CLIP-170

a) Organisation fonctionnelle de la CLIP-170

L'ADNc de la CLIP-170 a été cloné et séquencé à partir d'une banque d'expression d'ADNc de cellules Hela. La protéine déduite de cet ADNc contient 1392 résidus aminoacides (masse moléculaire théorique de 157 kDa) et présente trois régions majeures (Pierre *et al.*, 1992):

- Un domaine globulaire amino-terminal de 349 résidus aminoacides, contenant deux motifs de type « CAP-Gly » (« Glycine-rich Cytoskeleton-Associated Protein ») (Riehemann et Sorg, 1993), de 57 résidus aminoacides chacun, responsables de la liaison de la CLIP-170 aux MTs (Pierre *et al.*, 1994; Pierre *et al.*, 1992). Ces motifs, qui ont été cristallisés récemment (Li *et al.*, 2002), sont flanqués de deux régions riches en sérines phosphorylables. Il est intéressant de rappeler qu'un exemplaire du motif « CAP-Gly » a été trouvé dans le domaine amino-terminal de la p150^{Glued}. L'organisation générale de cette dernière présente, de plus, une certaine ressemblance avec la CLIP-170 (Fig. 24).

- Une région intermédiaire, de 961 résidus aminoacides, qui contient 116 heptades susceptibles de former une structure en hélice α , impliquée probablement dans l'homodimérisation de la protéine (« coiled-coil ») (Pierre *et al.*, 1992).

- Une région carboxy-terminale, de 82 résidus aminoacides, impliquée dans la localisation de la CLIP-170 sur des structures cytoplasmiques périphériques observées après dépolymérisation des MTs (Pierre *et al.*, 1994). Cette région contient deux exemplaires d'un motif susceptible de former une structure de type « doigt de zinc » dont la fonction, au sein de la CLIP-170, était encore inconnue jusqu'à cette thèse (Griparic *et al.*, 1998; Lantz et Miller, 1998; Pierre *et al.*, 1992). La séquence consensuelle de ce motif est $Cx_2Cx_4Hx_4C$ (x_n désigne la présence de n acides aminés quelconques). Alors que le premier motif (proximal) diffère de la séquence consensuelle par l'insertion d'une cystéine, le motif le plus distal, localisé à l'extrémité carboxy-terminale de la protéine, est remarquablement bien conservé :

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|----------|---|---|----------|---|---|---|---|----------|----------|----------|---|---|---|----------|
| Motif 1 (ou proximal) : | C | D | I | C | D | C | F | D | L | H | D | T | E | D | C |
| Motif 2 (ou distal) : | C | E | I | C | E | | M | F | G | H | W | A | T | N | C |
| Séquence consensuelle : | C | x | x | C | x | | x | x | G | H | W | x | x | x | C |

b) La boîte CCHC

Ce motif de type « doigt de zinc » a été identifié par Jeremy M. Berg au cours d'une recherche systématique de séquences susceptibles de former une structure comparable au « doigt de zinc » du facteur de transcription TFIIIA (Berg, 1986). Il a été appelé « boîte CCHC » en référence aux acides aminés supposés intervenir dans la liaison de l'ion métallique (Green et Berg, 1990). En dehors des trois cystéines et de l'histidine, une glycine est très conservée en huitième position, juste avant l'histidine. Il apparaît également qu'un résidu hydrophobe est fréquemment présent après cette même histidine (en position dix). Dans le cas du motif distal de la CLIP-170 comme dans beaucoup d'autres, cet acide aminé hydrophobe est le tryptophane. Par ailleurs, il semble qu'un autre résidu hydrophobe soit souvent présent entre les deux premières cystéines. Concernant le motif distal de la CLIP-170, il s'agit de l'isoleucine en position trois.

La boîte CCHC est présente, en un ou deux exemplaires, dans certaines protéines codées par les gènes *gag* des rétrovirus comme la protéine NC de la nucléocapside du virus du sarcome de Rous et la protéine NCp7 du virus HIV1 (Berg, 1986).

L'altération, par mutagenèse dirigée, de la boîte CCHC de la protéine NC du virus du sarcome de Rous provoque un dysfonctionnement dans le processus d'empaquetage de l'ARN génomique conduisant à une baisse drastique du pouvoir infectieux (Meric *et al.*, 1988). De plus, des études biochimiques (dichroïsme circulaire, protéolyse ménagée, etc...) ont montré que la liaison du Zn^{2+} induit un repliement stable de la région CCHC (Berg, 1990; Green et Berg, 1990), ce qui permet à certaines protéines, pourvues de ces motifs, d'interagir avec des acides nucléiques simples brin (South et Summers, 1993). Ce repliement est altéré lorsque la séquence de la boîte CCHC est modifiée. Tout semble ainsi indiquer que la boîte CCHC a une fonction biologique conditionnée par la liaison du Zn^{2+} et la formation subséquente d'une structure particulière.

La protéine NCp7 de la nucléocapside du virus HIV1 possède également deux boîtes CCHC très conservées. NCp7 joue un rôle fondamental dans la réplication du génome du virus. Une altération du doigt de zinc proximal induit la formation de particules virales dont la morphologie est modifiée et qui présentent des défauts dans le mécanisme de synthèse de l'ADN proviral (Tanchou *et al.*, 1998). De plus, il a été montré une interaction directe entre NCp7 et la protéine Vpr (connue pour stimuler la réplication du virus) par l'intermédiaire des deux motifs « doigts de zinc » (De Rocquigny *et al.*, 2000; de Rocquigny *et al.*, 1997). Par ailleurs, d'autres exemples de structures apparentées aux « doigts de zinc » comme celles caractérisant les domaines LIM sont impliquées dans des interactions de type protéine-protéine (Berg, 1990; Feuerstein *et al.*, 1994; Schmeichel et Beckerle, 1998). Sachant, d'une part, qu'il n'a jamais été montré d'interaction physique entre la CLIP-170 et les acides nucléiques et, d'autre part, qu'il pourrait exister un lien entre les protéines du complexe D/D et la CLIP-170 (voir plus loin), les auteurs ont suggéré que les boîtes CCHC de la CLIP-170 pourraient être, elles aussi, impliquées dans des interactions avec d'autres protéines (Pierre *et al.*, 1992).

c) Propriétés de l'interaction de la CLIP-170 avec les MTs

Comme cela a été évoqué plus haut, la CLIP-170 est une MBP (Microtubule Binding Protein) dont l'association avec les MTs est régulée par phosphorylation. L'élimination ou l'altération de l'un des deux motifs « CAP-Gly » n'empêche pas la CLIP-170 d'interagir avec les MTs *in vitro* (Pierre *et al.*, 1992) et *in vivo* (Pierre *et al.*, 1994). Cependant, une étude plus récente, menée sur un homologue très proche de la CLIP-170 (la CLIP-115, voir plus loin), indique que les domaines « CAP-Gly » ne sont pas suffisants pour cette interaction (Hoogenraad *et al.*, 2000). En effet, les auteurs ont établi que la présence d'au moins l'un des deux groupes de résidus sérines est absolument nécessaire à l'association de cette protéine aux MTs, confirmant l'existence d'une régulation des domaines « CAP-Gly » par phosphorylation.

Le domaine amino-terminal de la CLIP-170 s'associe directement aux MTs *in vitro* avec une stœchiométrie d'1 molécule pour 4 hétérodimères de tubulines. Toutefois, la CLIP-170 native se lie aux MTs *in vitro* avec une stœchiométrie moindre ce qui suggère que le domaine central en « coiled-coil » et/ou le domaine carboxy-terminal ont une influence sur l'interaction de la CLIP-170 avec les MTs (Scheel *et al.*, 1999).

d) Structure de la CLIP-170

La CLIP-170 native a été purifiée, en grande quantité, à partir du placenta humain par chromatographie d'immuno-affinité puis par liaison sur des MTs stabilisés suivie d'une élution (Diamantopoulos *et al.*, 1998). Une analyse détaillée de cette protéine native, ainsi que de courts fragments contenant les différents domaines fonctionnels de la CLIP-170, a été réalisée par des techniques biophysiques et par microscopie électronique (Scheel *et al.*, 1999). Cette analyse a révélé une structure fine de 135 nm de long contenant deux éléments charnières (ou « kinks ») dans le domaine central, à égales distances des deux extrémités (environ 37 nm). Ces « kinks » confèrent une certaine flexibilité mécanique à cette molécule très allongée (Fig. 22). Lors de cette étude, les auteurs ont confirmé par ailleurs la structure globulaire du domaine amino-terminal et démontré la formation du « coiled-coil » et l'homodimérisation de la CLIP-170 dans une orientation vraisemblablement parallèle (Scheel *et al.*, 1999).

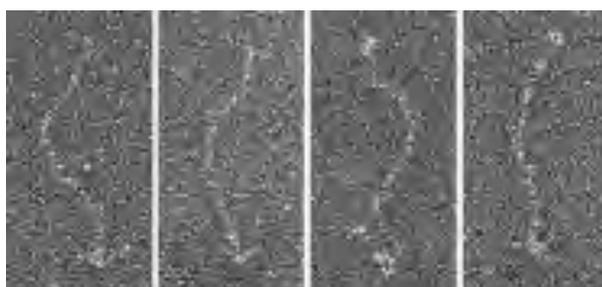


Figure 22 : Analyse en microscopie électronique de molécules de CLIP-170 native, quelques exemples montrant la flexibilité de la molécule.
D'après (Scheel *et al.*, 1999).

2. Les homologues et orthologues de la CLIP-170

Depuis les travaux précurseurs de J. Rickard et de T. Kreis, plusieurs homologues et orthologues de la CLIP-170 ont été clonés et séquencés.

a) Les isoformes de la CLIP-170

La Restine est une protéine humaine qui ne diffère de la CLIP-170 que par la seule insertion de 35 résidus aminoacides dans la partie amino-terminale du domaine central (Bilbe *et al.*, 1992). Curieusement, ces auteurs ont rapporté une interaction entre cette protéine et les filaments intermédiaires, alors qu'il a été montré, par ailleurs, que la CLIP-170 ne s'y associe pas (Pierre *et al.*, 1994). Une précision a été apportée par le clonage de la CLIP-170 de la poule, montrant que la CLIP-170 et la Restine sont les produits d'un même gène dont le

transcrit primaire subit un épissage alternatif (Griparic *et al.*, 1998). La séquence de cette insertion prédit un allongement du domaine central et l'apport de deux sites susceptibles d'être phosphorylés par la caséine kinase II. Bien qu'une preuve biochimique de l'interaction directe entre la Restine et les filaments intermédiaires manque toujours, l'insertion des 35 résidus aminoacides pourrait être à l'origine d'une interaction avec des partenaires différents permettant une association aux filaments intermédiaires. Ces travaux suggèrent donc que différentes isoformes de CLIP-170 pourraient intervenir dans des processus distincts. A ce propos, les travaux de L. Griparic et coll. indiquent que deux isoformes additionnelles de la CLIP-170 existent chez la poule et l'humain, pour lesquelles l'insert des 35 aminoacides de la Restine est remplacé soit par 11 autres résidus, soit par la somme des 11 et 35 résidus (Fig. 23) (Griparic et Keller, 1998). La fonction de ces insertions est encore inconnue, mais il semblerait que les formes '11' et '11+35' soient préférentiellement exprimées dans les muscles alors que la Restine est considérablement enrichie dans le cerveau. En outre, l'expression de chacune de ces 4 isoformes varie au cours du développement embryonnaire de la poule et en fonction des tissus. Plus récemment, un autre site d'épissage alternatif, tissu spécifique, a été mis en évidence dans la séquence du gène de la CLIP-170 de la poule, en aval du site correspondant à l'insert des 35 résidus aminoacides. Un épissage à partir de ce site (il s'agit bien évidemment d'un site donneur en 5') permet de faire disparaître 6 résidus aminoacides (VGGSSK) qui existent dans la CLIP-170 conventionnelle (Fig. 23) (Griparic et Keller, 1999).

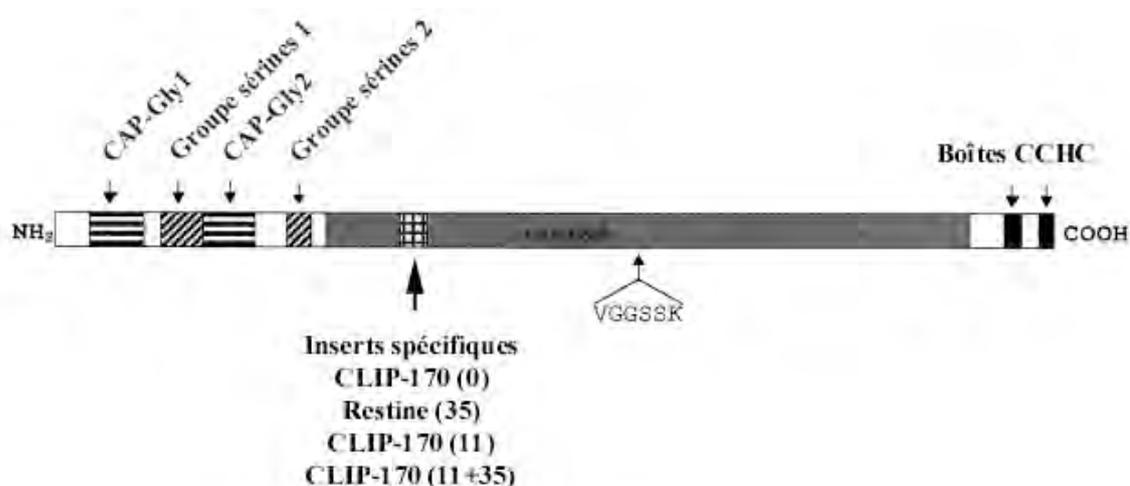


Figure 23 : Schéma illustrant les différentes isoformes de la CLIP-170

Des anticorps dirigés contre la CLIP-170 reconnaissent une protéine localisée dans la plaque des desmosomes (Wacker *et al.*, 1992). Cependant, l'expression de différentes constructions de CLIP-170, reconnaissables par une étiquette « c-myc », dans différents types cellulaires mammaliens, montre que la CLIP-170 humaine n'est pas adressée aux desmosomes (données non publiées, D.L. Dujardin et J.R. De Mey). Ces résultats suggèrent que la protéine détectée n'était pas la CLIP-170 mais une protéine présentant des homologies reconnues par les différents anticorps. Les desmosomes étant connectés au réseau de filaments intermédiaires, cette protéine pourrait être la Restine ou une des autres isoformes de la CLIP-170.

b) La CLIP-115, un paralogue de la CLIP-170 chez les mammifères

La CLIP-115 présente 45% d'identité avec la Restine et contient l'insert de 35 aminoacides découvert chez cette dernière. Cependant, cette protéine de rat spécifique, à priori, du cerveau ne dispose pas de la partie carboxy-terminale contenant les motifs « doigt de zinc » et possède un domaine en « coiled-coil » raccourci (De Zeeuw *et al.*, 1997). Dans certains neurones du système nerveux central (hippocampe, bulbe olfactif, cortex piriforme...), la CLIP-115 est associée à un organite membranaire spécifique des dendrites, impliqué probablement dans le fonctionnement des jonctions communicantes : le « Dendritic Laminar Body » (DLB) (De Zeeuw *et al.*, 1995). La CLIP-115 pourrait jouer un rôle dans le positionnement et le fonctionnement de cet organite puisque qu'elle interagit préférentiellement avec les MTs situés au voisinage des DLBs. Venant confirmer cette hypothèse, la dépolymérisation des MTs provoque une réduction significative de la densité de ces organites dans les dendrites (De Zeeuw *et al.*, 1997). Il est intéressant de noter, par ailleurs, que la CLIP-115, comme les différentes isoformes de la CLIP-170, voit son niveau d'expression fluctuer au cours du développement.

La CLIP-115 est codée par un gène distinct de celui de la CLIP-170. Ce gène a été appelé *CYLN2* pour « Cytoplasmic Linker Protéine 2 ». Il se localise, chez la souris, sur l'extrémité télomérique du chromosome 5 et, chez l'humain, sur le chromosome 7, dans la région critique du syndrome de Williams (WSCR pour « Williams Syndrome Critical Region ») (Hoogenraad *et al.*, 1998) (le gène de la CLIP-170 étant localisé sur le chromosome 12). Ce syndrome se caractérise par des anomalies cardiovasculaires (en particulier une sténose aortique supra-ventriculaire), une hypercalcémie infantile, une croissance inhibée et

des troubles comportementaux et cognitifs importants (Bellugi *et al.*, 1990). Les auteurs ont mis en évidence, chez 8 patients atteints du syndrome de Williams, une délétion totale de l'un des deux allèles du gène *CYLN2*. Cela suggère qu'une perte de fonction de la CLIP-115 pourrait être impliquée dans certains troubles neurologiques observés au cours de cette maladie (Hoogenraad *et al.*, 1998). Confortant cette hypothèse, des souris ayant une haploinsuffisance pour le gène *Cyln2*, présentent un défaut de croissance, des anomalies cérébrales, un dysfonctionnement de l'hippocampe et des troubles moteurs comparables aux affections neuro-développementales décrites dans le cas du syndrome de Williams (Hoogenraad *et al.*, 2002). Les auteurs suggèrent que la mutation d'autres gènes situés dans la WSCR pourrait provoquer les autres troubles, notamment cardiovasculaires, décrits chez les patients atteints de ce syndrome.

c) La CLIPR-59, une CLIP associée à l'appareil de Golgi chez les mammifères

La CLIPR-59 (pour « CLIP-170-Related protein of 59 kDa ») est aussi une CLIP dont l'expression est particulièrement élevée dans le cerveau. Elle a été isolée à partir de banques de données de séquences « EST » en utilisant comme référence les motifs « CAP-Gly » de la CLIP-170 (Perez *et al.*, 2002). Sa séquence et son organisation sont très différentes de celles de la CLIP-170 et de ses autres homologues et orthologues. En effet, la CLIPR-59 possède, dans sa région amino-terminale, un domaine acide riche en glutamates et en prolines, suivi de trois sites de type ankyrine et, dans sa région carboxy-terminale, deux domaines « CAP-Gly » suivi d'un domaine de « localisation golgienne » inconnu jusque-là (GoLD « Golgi Localization Domain »). Par ailleurs, cette protéine ne semble pas contenir de domaine en « coiled-coil ».

d) La D-CLIP-190, une CLIP chez la drosophile

Une protéine présentant 34,5% d'identité avec la CLIP-170 a été clonée chez la drosophile (Lantz et Miller, 1998). Malgré cette faible conservation et une taille supérieure à la CLIP-170 (1690 aminoacides contre 1392 pour la CLIP-170), la D-CLIP-190 dispose de la même organisation générale et possède également deux domaines « CAP-Gly », ainsi que les deux motifs susceptibles de former des doigts de zinc de type « CCHC ». En outre, ces auteurs ont montré que la D-CLIP-190, bien qu'étant capable d'interagir avec les MTs, co-immunoprécipite avec la myosine non conventionnelle 95F (classe VI) à partir d'un extrait d'embryon de drosophile. Ces deux protéines se co-localisent dans les axones de certains

neurones au cours du développement du systèmes nerveux central et au pôle postérieur de l'embryon précoce (avant la cellularisation). Cela n'est pas sans rappeler la localisation de la DHC et de LIS1 au cours de l'ovogenèse ainsi que leurs rôles dans la migration du noyau et la détermination de l'ovocyte chez la drosophile (Cf. III.G.3 et : (Swan *et al.*, 1999)). Ces résultats suggèrent donc que la D-CLIP-190, et peut-être la CLIP-170, pourraient coordonner des processus MTs et actine dépendants, par exemple en fournissant un lien entre l'extrémité plus des MTs et les microfilaments d'actine du cortex, ou en servant d'interface au transfert de vésicules entre MTs et microfilaments d'actine (Lantz et Miller, 1998).

e) BIK1p et Tip1p les orthologues de la CLIP-170 chez les levures

La protéine Bik1p (Bilateral karyogamy defect protein) est probablement l'orthologue de la CLIP-170 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Berlin *et al.*, 1990). A l'exception de la présence d'un motif CAP-Gly dans le domaine amino-terminal et d'une boîte CCHC dans la région carboxy-terminale (Fig. 24), la protéine Bik1p est très différente de la CLIP-170. En effet, Bik1p est de taille très réduite en comparaison de la CLIP-170, elle ne possède pas de groupe de résidus sérines et les pourcentages d'identité et de similitude entre ses deux protéines sont extrêmement faibles. Cela dit, comme nous le verrons par la suite, les fonctions de Bik1p, notamment au cours de la mitose, conforte l'hypothèse selon laquelle Bik1p serait bien l'équivalent fonctionnel de la CLIP-170 chez la levure bourgeonnante (Berlin *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 2001; Pellman *et al.*, 1995). Par ailleurs, Tor1 et Tor2, les orthologues de la kinase FRAP chez *Saccharomyces cerevisiae*, interagissent avec Bik1p (Choi *et al.*, 2000), ce qui corrobore cette hypothèse et suggère également une conservation des voies de signalisation en amont de Bik1p et de la CLIP-170.

Tip1p, le probable orthologue de CLIP-170 chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, a été identifié dans un crible visant à isoler des mutants dont la morphologie était altérée. Il s'agit d'une protéine assez courte (461 résidus aminoacides) mais qui possède un domaine CAP-Gly, un groupe de résidus sérines qui jouxte le domaine d'interaction avec les MTs, un domaine central en « coiled-coil » et une boîte CCHC à l'extrémité carboxy-terminale (Brunner et Nurse, 2000) (Fig. 24). Dans le paragraphe suivant, nous verrons que Tip1p et la CLIP-170 ont des propriétés et des fonctions similaires ce qui conforte l'hypothèse selon laquelle ces protéines sont orthologues.

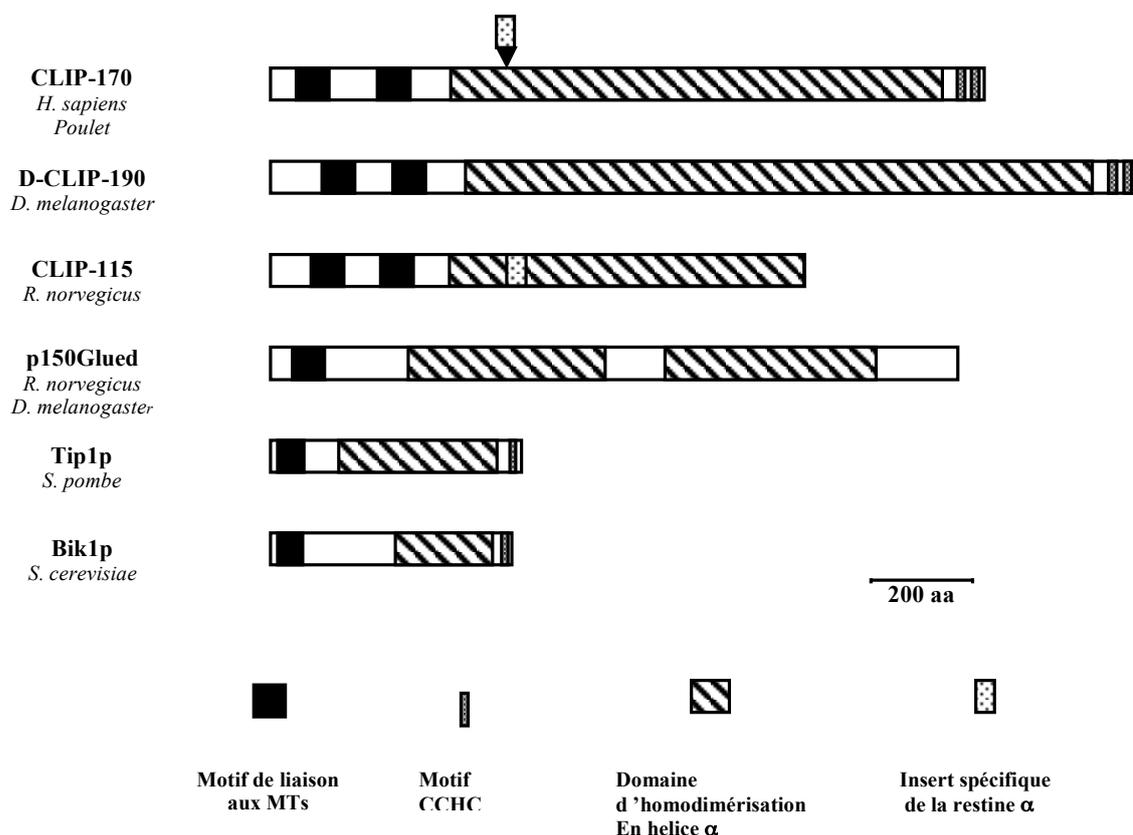


Figure 24 : Répartition des différents domaines fonctionnels de la CLIP-170 et de ses orthologues et homologues proches

Remarque : M. Tarsounas et Coll., ont publié un article relatif au clonage et à la caractérisation d'une protéine de la souris, baptisée : CLIP-50 (Tarsounas *et al.*, 2001). La CLIP-50 présente de forts pourcentages d'identité et de similitude avec le domaine carboxy-terminal de la CLIP-170. Cependant, cette protéine, qui semble être requise dans la morphogenèse de noyau du spermatozoïde chez la souris, n'est certainement pas une CLIP puisqu'elle ne possède pas de CAP-GLY, le domaine d'interaction avec les MTs caractéristique de cette famille. Par ailleurs, en analysant la séquence, nous avons acquis la conviction que la CLIP-50 est très probablement produite à partir du même gène que la CLIP-170, par épissage alternatif.

C. Fonctions cellulaires de la CLIP-170

1. Implication des CLIPs dans le trafic intracellulaire

a) Transport des vésicules d'endocytose

La CLIP-170 a été localisée sur des structures distribuées à la périphérie de la cellule. De plus, la dépolymérisation des MTs ou des microfilaments d'actine n'empêche pas la CLIP-170 de s'associer à ces structures cytoplasmiques (Rickard et Kreis, 1990). Seule la délétion de sa partie carboxy-terminale empêche la CLIP-170 de se localiser sur ces dernières, suggérant un rôle des boîtes CCHC dans le mécanisme d'adressage (Pierre *et al.*, 1994). Ces données préliminaires ont conduit les auteurs à émettre l'hypothèse selon laquelle la CLIP-170 pourrait être recrutée spécifiquement sur des organites membranaires (Pierre *et al.*, 1994).

Un test *in vitro* permet de déterminer l'implication de facteurs cytosoliques dans la liaison de vésicules marquées à des MTs fixés sur des billes magnétiques (Scheel et Kreis, 1991). En utilisant ce test, il a été montré que la CLIP-170 est nécessaire (mais pas suffisante) à la liaison de vésicules d'endocytose sur les MTs *in vitro* (Pierre *et al.*, 1992). De plus, des expériences d'immunofluorescence ont permis de montrer que la CLIP-170 et le récepteur à la transferrine se co-localisent sur des structures endocytaires et, de façon plus prononcée, sur les tubules générés par un traitement des cellules à la bréfeldine A (Pierre *et al.*, 1992). L'ensemble de ces données suggèrent que la CLIP-170 pourrait interagir transitoirement avec les vésicules d'endocytose pendant le transport entre les endosomes précoces et les endosomes tardifs.

L'implication de la dynéine cytoplasmique dans le transport entre endosomes précoces et endosomes tardifs (Aniento *et al.*, 1993) a permis de proposer un modèle de fonctionnement selon lequel la CLIP-170 permettrait l'interaction initiale entre les endosomes et les MTs ce qui faciliterait leur prise en charge par le complexe D/D (Fig. 25; (Rickard et Kreis, 1996)).

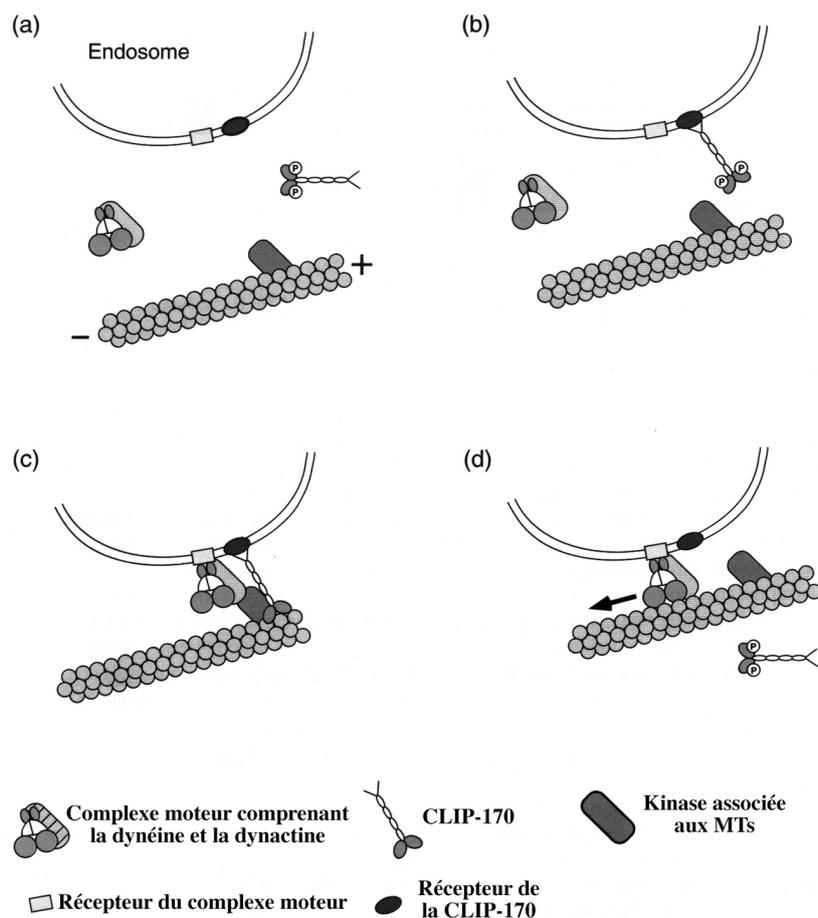


Figure 25: Modèle de fonctionnement de la CLIP-170 dans le transport d'organelles membranaires.

La CLIP-170 et la dynéine du cytosol (a) sont recrutées sur la membrane de l'organelle (b et c), et la déphosphorylation de la CLIP-170 permet d'établir un lien statique entre l'organelle et le MT (c). La phosphorylation de la CLIP-170, par une kinase associée aux MTs, provoque la dissociation de la CLIP-170 et permet ainsi le transport de l'organelle par la dynéine cytoplasmique (d). D'après (Rickard et Kreis, 1996).

b) Transport vers le réseau trans-golgien

La CLIPR-59 pourrait participer au trafic tubulo-vésiculaire depuis les endosomes précoces (et/ou de recyclage) vers le réseau trans golgien (TGN) (Perez *et al.*, 2002). En effet, dans des cellules HeLa, la CLIPR-59 se localise sur les saccules de la partie trans de l'appareil de Golgi et sur le TGN. Sa sur-expression perturbe le transport depuis les endosomes précoces et les endosomes de recyclage vers le TGN.

La CLIPR-59 ne semble pas interagir, *in vivo*, avec les MTs. Seule la délétion du domaine responsable de son adressage sur les membranes golgiennes (ou GoLD, correspondant aux 60 derniers résidus amino-acides), permet de localiser, non sans difficulté, cette protéine sur une sous-population de MTs. De plus, la délétion additionnelle du domaine amino-terminal et du GoLD, permet d'augmenter considérablement le recrutement de la protéine recombinante sur les MTs (Perez *et al.*, 2002). Ces données suggèrent l'existence d'une régulation très élaborée de l'association de la CLIPR-59 avec les MTs par le GoLD et le domaine amino-terminal. Aussi, les auteurs ont proposé un modèle selon lequel les

molécules de CLIPR-59 libres, nouvellement synthétisées, ne pourraient pas interagir avec les MTs et s'associeraient spécifiquement, dans un premier temps, à certains organites membranaires. Cette association pourrait ensuite faciliter et orienter le transport (par analogie avec la CLIP-170) en permettant une interaction transitoire des organites avec une sous-population de MTs bien précise *via* la CLIPR-59. Autrement dit, l'interaction de la CLIPR-59 avec des organites membranaires pourrait provoquer un changement conformationnel de cette protéine lui permettant d'interagir, de façon très contrôlée et furtive, avec les MTs (Perez *et al.*, 2002).

En 1996, J. Rickard et T. Kreis émettaient l'hypothèse selon laquelle il pourrait exister, pour chaque type d'organite, une CLIP spécifique capable de contrôler leurs mouvements, leur localisation et, par là même leur fonctionnement (Rickard et Kreis, 1996). Les recherches actuelles tendent à confirmer cette hypothèse. En effet, il existe la CLIP-170 pour les endosomes, la CLIP-115 pour les DLBs, la CLIPR-59 pour l'appareil de Golgi et une autre CLIPR, non encore clonée, pour les péroxysomes (Thiemann *et al.*, 2000).

2. Contrôle de la dynamique et de la polarisation des MTs, implication dans la polarisation cellulaire

a) La plupart des CLIPs sont des « +TIPs » (+ End Tracking Protein)

En interphase, la CLIP-170 est recrutée sur les bouts (+) des MTs en phase de polymérisation (Diamantopoulos *et al.*, 1999), où elle se co-localise avec la dynactine et la dynéine cytoplasmique (Vaughan *et al.*, 1999). De plus, le domaine amino-terminal de la CLIP-170 est capable à lui seul de se localiser aux extrémités (+) des MTs, indiquant que l'interaction de la région carboxy-terminale avec d'autres structures cytoplasmiques n'est pas nécessaire à cette localisation (Diamantopoulos *et al.*, 1999). Dans des cellules Vero transfectées, la chimère « GFP-CLIP-170 » s'associe, sur une certaine longueur, à l'extrémité (+) des MTs et semble se mouvoir à raison de 0,15 à 0,4 μm par seconde, ce qui est comparable à la vitesse de polymérisation des MTs (Perez *et al.*, 1999). Les auteurs ont également montré, par « Fluorescence Speckle Analysis », que la CLIP-170 n'est pas transportée activement le long des MTs mais subit plutôt un phénomène de « treadmilling ». En outre, des expériences biochimiques tendent à montrer que la CLIP-170 se co-polymérise avec la tubuline et pourrait ainsi constituer un activateur de la polymérisation des MTs. Par ailleurs, le traitement de cellules HeLa par la rapamynine abolit la localisation de la CLIP-170

aux bouts (+) des MTs et modifie considérablement la structure de ces derniers (Choi *et al.*, 2002). Cela suggère un rôle de la kinase FRAP dans l'association de la CLIP-170 avec les dimères de tubuline et tend à confirmer que la CLIP-170 pourrait jouer un rôle dans l'assemblage des MTs.

La protéine chimère « GFP-CLIP-115 », faiblement exprimée dans des cellules COS-1, se localise également de façon dynamique sur les bouts (+) des MTs (Hoogenraad *et al.*, 2000). Bien que décrite originellement comme une CLIP spécifique du cerveau, la CLIP-115 endogène est détectée, ainsi que la CLIP-170, sur les extrémités (+) des MTs dans les fibroblastes 3T3 et les CHO-K1, alors que seule la CLIP-170 est présente sur ces structures dans d'autres cellules non neuronales comme les COS-1 (Akhmanova *et al.*, 2001; Komarova *et al.*, 2002).

La sur-expression d'une forme de CLIP-170 dépourvue de son domaine amino-terminal (CLIP-170 Δ H) provoque la délocalisation de la CLIP-170 et de la CLIP-115 endogènes des bouts (+) des MTs dans des cellules CHO-K1 (Komarova *et al.*, 2002). Il en résulte un changement important de la dynamique des MTs. En effet, une analyse très précise des paramètres de l'instabilité dynamique dans ces conditions, a révélé une diminution très importante de la fréquence de sauvetage (voire même une suppression des événements de sauvetage). Dans ces cellules sur-exprimant la CLIP-170 Δ H, la transfection d'un plasmide codant le domaine amino-terminal de la CLIP-170 permet de recouvrer un comportement « normal » des MTs. Ces données tendent à montrer que la CLIP-170 et la CLIP-115, localisées au bout (+) des MTs, jouent un rôle dans la stabilisation de ces derniers en augmentant la fréquence de sauvetage (Komarova *et al.*, 2002). Par ailleurs, nous verrons par la suite que la CLIP-170 est capable, en interagissant avec d'autres protéines, de stabiliser les MTs en réduisant probablement la fréquence de catastrophe. Ces deux modes de stabilisation ne sont certainement pas mutuellement exclusifs et seront commentés dans la discussion.

La sur-expression de la CLIP-115 ou d'une forme de CLIP-170 dépourvue de son domaine carboxy-terminal, dans des cellules COS-1 et/ou HeLa, provoque la délocalisation de la CLIP-170 endogène et de la p150^{glued} des bouts (+) des MTs (Hoogenraad *et al.*, 2002; Valetti *et al.*, 1999). En revanche, la sur-expression d'une protéine chimérique, composée des 159 derniers résidus aminoacides de la CLIP-170 fusionnés à l'extrémité carboxy-terminale de la CLIP-115, permet le recrutement de la p150^{glued} sur les bouts (+) des MTs (Hoogenraad *et al.*, 2002). De plus, dans des fibroblastes embryonnaires issus de souris *Cyln2*^{-/-}

(homozygotes pour une mutation nulle), le recrutement de la CLIP-170 et de la dynactine sur les bouts (+) des MTs est augmenté de 1,6 et 2,8 fois respectivement (Hoogenraad *et al.*, 2002).

L'ensemble de ces données indique qu'il existe une compétition entre la CLIP-115 et la CLIP-170 pour leur localisation aux extrémités (+) des MTs et tend à montrer que la CLIP-170 recrute, à cet endroit, la dynactine et probablement la dynéine cytoplasmique par l'intermédiaire de son domaine carboxy-terminal. A ce propos, les deux boîtes « CCHC », contenues dans ce domaine, pourraient jouer un rôle dans le recrutement en étant impliquées, par exemple, dans des interactions avec une ou plusieurs sous-unités du complexe D/D. Par ailleurs, cette compétition entre la CLIP-115 et la CLIP-170 pourrait expliquer le fait que l'architecture et la dynamique du réseau de MTs ne sont pas affectées dans les fibroblastes embryonnaires issus des souris *Cyln2*^{-/-}. En effet, étant davantage recrutée sur les bouts (+) des MTs dans ces cellules, la CLIP-170 pourrait remplacer la CLIP-115 dans certaines des fonctions que l'on lui attribue, comme le contrôle de la dynamique des MTs. Il serait donc intéressant de produire des souris dépourvues à la fois de la CLIP-115 et de la CLIP-170 et d'analyser les conséquences de cette double mutation sur le réseau microtubulaire.

Confirmant le rôle de la CLIP-170 dans le recrutement de la dynactine sur les bouts (+) des MTs, la sur-expression de la CLIP-170 Δ H provoque une délocalisation des bouts (+) des MTs, non seulement de la CLIP-170 endogène, mais aussi, de la p150^{Glued}, sans perturber le recrutement d'EB1 (Komarova *et al.*, 2002).

Le recrutement du complexe D/D, par la CLIP-170, sur les bouts (+) des MTs pourrait faciliter la prise en charge de cargos situés à la périphérie de la cellule, comme les vésicules d'endocytose, et permettre leur transport vers le noyau.

Lors d'expériences, réalisées *in vitro*, consistant à analyser l'effet du fragment amino-terminal de la CLIP-170 sur la polymérisation de la tubuline-GTP, les auteurs ont mis en évidence une augmentation très nette du taux de nucléation des MTs, non seulement à partir des centrosomes mais aussi de façon isolée (Diamantopoulos *et al.*, 1999). Ces données indiquent que la CLIP-170 pourrait faciliter la nucléation des MTs en s'associant aux dimères de tubulines et en favorisant, par exemple, la formation d'oligomères.

Bik1p et Tip1p se localisent également de façon dynamique à l'extrémité (+) des MTs (Brunner et Nurse, 2000; Lin *et al.*, 2001). Des études génétiques ont permis de montrer que

chacune de ces deux protéines a une fonction globalement stabilisatrice vis-à-vis des MTs (voir le paragraphe suivant) (Berlin *et al.*, 1990; Brunner et Nurse, 2000).

b) Rôle des CLIPs dans la polarisation des microtubules et des cellules

Chez les eucaryotes, la stabilisation sélective et l'interaction des MTs avec des régions spécialisées du cortex cellulaire sont essentielles à certains processus comme le transport intracellulaire polarisé d'organelles et l'établissement d'une asymétrie cellulaire. Nous avons déjà évoqué, dans les paragraphes précédents, le rôle de certaines +TIPs comme EB1, APC et le complexe D/D dans de tels mécanismes de polarisation. Nous allons voir, dans ce paragraphe, que les CLIPs jouent aussi un rôle essentiel dans l'orientation, la stabilisation et l'ancrage des MTs dans des régions corticales spécialisées.

- Rôle de Tip1p dans la polarisation cellulaire

La levure *Schizosaccharomyces pombe* constitue un excellent modèle pour étudier la polarisation cellulaire. En effet, l'allongement de ces levures ne se fait qu'aux deux extrémités cellulaires et dépend des MTs dont l'orientation longitudinale est maintenue en permanence (Fig. 26). Cette orientation des MTs dépend de la localisation de Tip1p à leur extrémité (+). Généralement, dans les levures sauvages, les extrémités des MTs qui entrent en contact avec une région intermédiaire du cortex (loin de l'une des deux extrémités), continue de se polymériser et se courbe pour longer le cortex et se diriger vers l'une des deux extrémités de la cellule (Fig. 26). En revanche, au contact du cortex de l'une des deux extrémités de la levure, le MT se dépolymérise après un bref temps de pause. Chez le mutant *tip1Δ*, ce comportement asymétrique des MTs est complètement aboli. En effet, les MTs se dépolymérisent systématiquement au contact de n'importe quelle région du cortex et Tea1p, un marqueur de polarité, ne s'accumule plus aux deux extrémités de la levure (Brunner et Nurse, 2000; Mata et Nurse, 1997). Il en résulte des levures dont les MTs sont plus courts et désorientés, et dont la morphologie est considérablement altérée (les levures ont généralement une forme courbe et souvent branchée) (Brunner et Nurse, 2000). Ces résultats suggèrent que Tip1p, en entrant en contact avec certaines protéines corticales, stabilise les MTs en inhibant leur dépolymérisation (Brunner et Nurse, 2000). De cette manière, la dépolymérisation des MTs est restreinte aux extrémités en croissance de la levure. Ce mécanisme permet donc la polarisation de la levure en distribuant les MTs longitudinalement et en déposant localement et spécifiquement des marqueurs de polarité comme Tea1p. La localisation aux extrémités

corticales de Tea1p dépend aussi de Tea2p, un moteur moléculaire de type kinésine (Browning *et al.*, 2000). Tip1p et Tea2p s'accumulent aussi aux deux extrémités corticales de la levure, et cette accumulation dépend de Tea1p. Cela tend à mettre en évidence l'existence d'un dialogue entre les +TIPs et des régions corticales spécialisées (Behrens et Nurse, 2002).

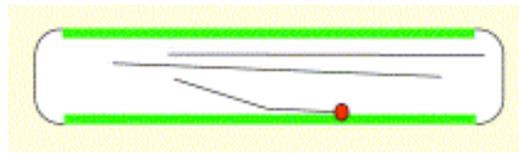


Figure 26 : L'orientation des MTs chez *Schizosaccharomyces pombe* dépend de Tip1p, l'orthologue de CLIP-170.

D'après (McNally, 2001)

Tip1p, située à l'extrémité des MTs (en rouge), interagit avec des composants inconnus du cortex intermédiaire (en vert) ce qui promeut la polymérisation des MTs. En conséquence, les MTs se courbent, longent le cortex puis se dirigent vers l'une des deux extrémités de la cellule. Ce mécanisme permet de maintenir l'orientation des MTs longitudinalement, et d'assurer une croissance polarisée de la levure.

- Rôle de la CLIP-170 et de la CLIP-115 dans la polarisation cellulaire

Chez les mammifères, la CLIP-170 et la CLIP-115 pourraient participer, de façon analogue à Tip1p, à un processus d'orientation des MTs. En effet, compte tenu de leur localisation aux bouts (+) des MTs, les CLIPs pourraient intervenir dans le mécanisme de stabilisation sélective des MTs orientés vers le « leading edge » des cellules en migration (voir chapitre I.C.1.). Cependant, la localisation de la CLIP-170 et de la CLIP-115 sur les bouts (+) des MTs ne présente pas d'asymétrie dans les cellules en migration ce qui suggère l'existence d'autres protéines capables de stabiliser spécifiquement certains microtubules en interagissant, peut-être, avec les CLIPs.

Récemment, l'équipe de Niels Galjart a identifié un groupe de protéines capables d'interagir avec la CLIP-170 et la CLIP-115 (Akhmanova *et al.*, 2001). Les CLASPs (CLIP-Associated Proteins) s'associent, *in vitro*, à la partie amino-terminale du domaine central en « coiled-coil » de la CLIP-115 et de la CLIP-170, indiquant que l'insert de 35 aminoacides, présent dans la Restine et la CLIP-115, n'est pas nécessaire à cette interaction. Les auteurs ont montré que les CLASPs participent au processus de polarisation cellulaire que nous venons d'évoquer, en stabilisant une sous-population de MTs. En effet, seuls les bouts (+) des MTs,

situés exclusivement dans la région du « leading edge » de fibroblastes 3T3 en migration, recrutent les CLASPs, alors que la localisation des CLIPs ne présente aucune asymétrie dans ces cellules. Parallèlement, la sur-expression des CLASPs, dans des cellules COS-1, augmente la détyrosination et l'acétylation des MTs (témoins de la stabilisation). En revanche, la micro-injection d'anticorps dirigés contre CLASP2, dans des fibroblastes motiles, réduit le nombre et provoque la désorganisation des MTs stabilisés (Fig. 27).

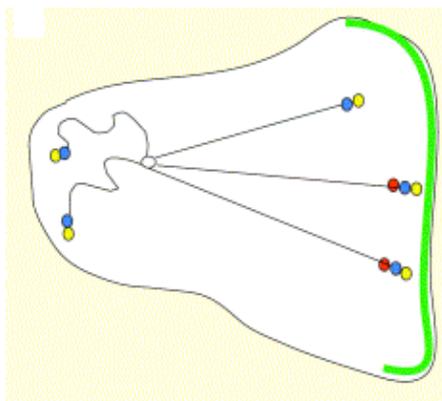


Figure 27: Stabilisation des MTs orientés vers le « leading edge » de fibroblastes en migration. D'après (McNally, 2001)

Les CLASPs (en rouge) s'associent spécifiquement avec les bouts (+) des MTs orientés vers le « leading edge » (localisation asymétrique). La CLIP-170 (en bleu) ainsi qu'EB1 (en jaune) se lie virtuellement aux bouts (+) de l'ensemble des MTs (localisation symétrique). Les CLASPs participent ainsi à la stabilisation des MTs au voisinage du « leading edge ».

La localisation asymétrique des CLASPs sur les bouts (+) des MTs semble dépendre de la kinase GSK3 β (« Glycogen Synthase Kinase 3 β ») (Akhmanova *et al.*, 2001). En effet, la sur-expression d'une forme constitutivement active de la GSK3 β , dans des cellules COS-1, provoque la délocalisation des CLASPs des bouts (+) des MTs. En revanche, l'inhibition totale de la GSK3 β par le chlorure de lithium conduit, dans les fibroblastes 3T3 en migration, à une localisation symétrique des CLASPs sur les bouts (+) des MTs et au déploiement de MTs acétylés dans tout le volume cellulaire. Somme toute, ce travail suggère que l'inhibition totale de la GSK3 β abolit la polarisation des fibroblastes en ne contrôlant plus la localisation asymétrique des CLASPs sur les bout (+) des MTs et l'orientation consécutive des MTs stabilisés vers le « leading edge ».

La PI-3 kinase (Phosphoinositide-3 Kinase) est connue pour participer au fonctionnement du « leading edge » (Haug *et al.*, 2000). L'inhibition de la PI-3 kinase dans une culture de fibroblastes 3T3 « blessée », après une privation puis un ajout de sérum dans le

milieu de culture, réduit l'accumulation des CLASPs dans le « leading edge » (Akhmanova *et al.*, 2001). Sachant, que la GSK3 β est dans la voie de signalisation contrôlée par la PI-3 kinase, les auteurs ont suggéré que la PI-3 kinase pourrait inhiber localement la GSK3 β et permettre ainsi le recrutement des CLASPs sur les bouts (+) des MTs spécifiquement dans la région du « leading edge ». Bien qu'il ait été montré, *in vitro*, que l'association des CLASPs avec les MTs est régulée par phosphorylation, il reste toutefois à démontrer que les différentes isoformes de CLASPs sont effectivement des substrats de la GSK3 β . Dans l'affirmative, les CLASPs constitueraient une sorte de relais entre la signalisation émanant du « leading edge » et les MTs.

Bien que les CLASPs interagissent directement avec la CLIP-115 et la CLIP-170 *in vitro*, ces interactions semblent transitoires et furtives dans les cellules COS-1 et les fibroblastes 3T3 (Akhmanova *et al.*, 2001). En effet, les CLASPs et les CLIPs ne se co-localisent pas systématiquement dans ces cellules. Contrairement à la CLIP-170 et à la CLIP-115, les CLASPs s'associent à l'appareil de Golgi dans les cellules COS-1 et ne s'associent qu'à un nombre limité de MTs dans les fibroblastes 3T3 (voir plus haut). Par ailleurs, CLASP2 se localise aux bouts (+) des MTs sur un segment significativement plus grand que les CLIPs et la protéine EB1. L'ensemble de ces données suggère l'existence, *in vivo*, d'une régulation très fine de l'interaction entre les CLASPs et les CLIPs. Ce genre d'interaction furtive est probablement la raison pour laquelle il a fallu plus de dix années de recherches pour trouver les premiers partenaires de la CLIP-170.

Les CLASPs sont capables d'interagir avec les MTs de façon CLIPs indépendante. En effet, un mutant de CLASP2, dépourvu de son domaine de liaison aux CLIPs, est toujours recruté sur les bouts (+) des MTs. Réciproquement, les CLIPs sont recrutées sur les bouts (+) des MTs indépendamment des CLASPs. Les auteurs pensent que les CLASPs et les CLIPs pourraient s'influencer mutuellement afin d'augmenter leur affinité respective pour les MTs. Les CLIPs pourraient, par exemple, stimuler la relocalisation des CLASPs sur les MTs depuis les membranes Golgiennes. Parallèlement, les CLASPs pourraient augmenter le recrutement des CLIPs sur les MTs situés dans la région du « leading edge » et favoriser ainsi leur stabilisation. Cela constituerait un moyen par lequel les CLASPs pourraient contribuer à stabiliser les MTs et corroborerait le rôle anti-catastrophe proposé pour Tip1p (Brunner et Nurse, 2000).

Il reste donc à identifier le mécanisme permettant aux CLASPs de stabiliser les MTs et de relayer, ainsi, la signalisation émanant du « leading edge » des cellules en migration. Deux hypothèses sont envisageables. Une fois localisés aux bouts (+) des MTs, les CLASPs pourraient stabiliser les MTs directement, ou indirectement en empêchant la dissociation de la CLIP-170 et/ou de la CLIP115 de l'extrémité des MTs. Pour discriminer ces deux hypothèses, il serait intéressant de mesurer le temps de demi-vie des CLIPs aux bouts (+) des MTs en fonction de la présence ou non des CLASPs.

Une autre question intéressante à propos des CLASPs est de savoir si elles peuvent constituer des sites d'ancrage pour les MTs à la membrane plasmique. En effet, les CLASPs sont capables d'interagir avec certaines membranes intracellulaires (appareil de Golgi) et une des isoformes est susceptible d'être palmytoylée, à son domaine amino-terminal, suggérant un possible recrutement à la membrane plasmique (Akhmanova *et al.*, 2001).

Les propriétés du couple CLIPs-CLASPs ressemblent étonnamment à celles du couple EB1-APC (voir chapitre I.B.e.). En effet, de façon analogue au couple CLIPs-CLASPs, les protéines EB1 et APC interagissent entre elles, se localisent sur les bouts (+) des MTs et régulent la dynamique des MTs dans des cellules polarisées. De plus, APC se localise préférentiellement sur les bouts (+) des MTs qui s'étendent vers la région du « leading edge » (Nathke *et al.*, 1996) et EB1 pourrait jouer un rôle important dans la stabilisation des MTs au voisinage du « leading edge », dans la voie RhoA-mDia (voir chapitre I.C.1). Il serait donc intéressant de rechercher des interactions éventuelles (fonctionnelles et/ou physiques) entre ces deux couples de protéines afin de mieux comprendre les mécanismes qui contrôlent la polarisation des MTs.

- La CLIP-170 pourrait participer à l'orientation et au positionnement du fuseau mitotique

Nous avons évoqué précédemment, le rôle du complexe moteur D/D dans l'attachement au cortex, le positionnement et/ou l'orientation du fuseau mitotique chez divers organismes comme *Saccharomyces cerevisiae* (Segal et Bloom, 2001), *Caenorhabditis elegans* et *Drosophila melanogaster* (Gonczy, 2002). Parallèlement, nous savons que la dynéine cytoplasmique, la dynactine et LIS1 forment, dans les cellules mitotiques épithéliales de mammifères, des sites corticaux, sous les jonctions serrées, capables d'établir des contacts avec les MTs astériens (Busson *et al.*, 1998; Faulkner *et al.*, 2000). Etant donné qu'elle

fonctionne vraisemblablement de concert avec la dynéine cytoplasmique, la CLIP-170 localisée aux bouts (+) des MTs pourrait interagir directement ou indirectement avec le complexe moteur D/D et la protéine LIS1, localisés au cortex. Ainsi, en permettant à la dynéine cytoplasmique de générer une force de traction sur les MTs, cette interaction pourrait contribuer à l'orientation du fuseau de division et au maintien de cette orientation au cours de la mitose. Soutenant cette hypothèse, la mutation nulle *bik1Δ* provoque, chez la levure bourgeonnante, des défauts de positionnement du fuseau de division (Berlin *et al.*, 1990). Cependant, il reste à déterminer, et c'est l'un des objets de cette thèse, la nature du lien éventuel pouvant exister entre le complexe D/D et la CLIP-170. Par ailleurs, la démonstration récente, *in vitro*, d'une interaction entre EB1 et certains éléments du complexe D/D (p150^{Glued}, DIC et p50) (Berrueta *et al.*, 1999), laisse supposer l'existence d'une relation fonctionnelle entre la voie EB1/APC et la voie dynéine/dynactine, peut-être dans ce mécanisme d'attachement des MTs et d'orientation du fuseau de division. Venant corroborer cette dernière hypothèse, une étude fondée sur l'utilisation d'un ARN interférent a permis de mettre en évidence l'implication de la protéine EB1 dans l'élongation des MTs astériens, l'assemblage du fuseau mitotique, le positionnement du fuseau de division et la ségrégation des chromosomes (Rogers *et al.*, 2002).

- Mécanismes d'ancrage des microtubules au cortex cellulaire

Une question subsiste : Quel est le mécanisme, permettant le recrutement d'APC, de D/D et de CLIPs-CLASPs au cortex cellulaire ? En effet, ces protéines ne sont pas connues pour interagir directement avec l'actine ou la membrane plasmique (sauf peut-être une des formes de CLASP, voir plus haut) et, bien que la protéine corticale Num1p, semble capable de recruter le complexe D/D au cortex du bourgeon chez *S. cerevisiae* (chapitre I.C.2.) (Farkasovsky et Kuntzel, 2001), nous ne connaissons pas, chez les mammifères, de protéine équivalente susceptible de recruter APC, CLIPs-CLASPs et D/D au cortex. Toutefois une publication récente, a révélé une interaction directe entre la CLIP-170 et IQGAP1, un effecteur des petites GTPases Rac1 et Cdc42 (voir chapitre I.C.1.), capable d'interagir directement avec l'actine (Fukata *et al.*, 2002).

Cdc42 et Rac1 sont des petites GTPases de la famille de Rho qui jouent un rôle déterminant dans les mécanismes de polarisation cellulaire (Hall, 1998; Kaibuchi *et al.*, 1999) en participant notamment à la réorganisation du cytosquelette d'actine au cours de certains processus de polarisation dont on a parlé au chapitre I.C.1.. Bien que Cdc42 ait été impliquée

dans le contrôle de la polarité du réseau de MTs (réorientation du MTOC) des astrocytes et des fibroblastes 3T3 en migration *via* mPar6, la PKC ζ et la dynéine cytoplasmique (Etienne-Manneville et Hall, 2001; Palazzo *et al.*, 2001a), peu d'éléments concourent à montrer réellement la participation de Cdc42 et de Rac1 dans la réorganisation du réseau de MTs pendant la polarisation cellulaire.

IQGAP1 est une protéine capable de lier les microfilaments d'actine entre eux par des interactions croisées et qui se localise sur le cortex du lamellipode de fibroblastes en migration (Hart *et al.*, 1996; Kuroda *et al.*, 1996). La CLIP-170 interagit directement, *via* son domaine amino-terminal, avec la région carboxy-terminale d'IQGAP1. Elle recrute cette dernière sur les MTs et ce recrutement est augmenté par Cdc42 et Rac1 activées. En effet, dans un test de co-sédimentation, l'interaction d'IQGAP1 avec les MTs n'est possible qu'en présence de la CLIP-170, et se trouve augmentée en présence de GTP γ S-Rac1 ou de GTP γ S-Cdc42. De plus, les auteurs ont montré qu'un complexe tripartite se forme, *in vivo* et *in vitro*, entre la CLIP-170, IQGAP1 et Rac1 ou Cdc42 lorsque ces deux dernières protéines sont constitutivement activées. Par ailleurs, Rac1 activée et Cdc42 activée sont capables de capturer la CLIP-170 à la base, respectivement, du lamellipode et des filopodes, probablement par l'intermédiaire d'IQGAP1. Dans ces conditions, la CLIP-170 reste immobile au cortex pendant 24 à 120 secondes, alors que sans activer Rac1 et Cdc42, elle disparaît immédiatement après avoir rencontré le cortex. Aussi, l'ensemble des données, publiées récemment par l'équipe de K. Kaibuchi, suggère que l'activation de Rac1 et/ou Cdc42 pourrait permettre l'ancrage au cortex des extrémités (+) des MTs par l'intermédiaire d'une interaction entre CLIP-170 et IQGAP1. Cela étant, le temps de demi-vie d'un MT stabilisé dans le « leading edge » étant nettement supérieur à la durée moyenne de présence de la CLIP-170 au cortex, il est fort probable que le complexe Rac1/Cdc42-IQGAP1-CLIP-170-MTs soit seulement impliqué dans les étapes initiales de l'attachement des MTs au cortex et que d'autres protéines, comme les CLASPs ou la coiffe « ATPasique », dont on a parlé plus tôt (chapitre IC.1.), prennent le relais pour stabiliser cette interaction de façon durable.

D'autres systèmes d'ancrage pourraient exister :

Chez la drosophile, une approche génétique a permis de montrer qu'un complexe composé d'Armadillo (orthologue de la β -caténine), d' α -caténine et de dAPC2 interagit avec l'actine corticale par l'intermédiaire de l' α -caténine (McCartney *et al.*, 2001). Les protéines dAPC2 et dEB1 étant, toutes deux, nécessaires au mécanisme de positionnement du fuseau de

division dans les cellules du neuroectoderme, il était très tentant pour les auteurs de conclure à une interaction physique entre l'actine et les MTs *via* le couple dAPC2–dEB1. Cependant, les protéines dAPC2 et dEB1 ne semblent pas interagir entre elles. Néanmoins, sachant qu'il existe deux protéines similaires à APC et deux protéines similaires à EB1 chez la drosophile, il reste possible que l'interaction entre le complexe α -caténine- β -caténine-APC et EB1 constitue un moyen, très conservé chez les métazoaires, de connecter les MTs au cortex d'actine.

Une publication récente a révélé une interaction directe entre la DIC et la β -caténine (Ligon *et al.*, 2001). Parallèlement, les auteurs ont montré que la dynéine cytoplasmique se localise au niveau de la *zonula adherens* dans des cellules épithéliales en culture et que cette localisation est dépendante des microfilaments d'actine. Par ailleurs, la sur-expression de la β -caténine délocalise la dynéine cytoplasmique et abolit l'ancrage des MTs dans le cortex d'actine. En résumé, ces données indiquent un possible rôle de la dynéine cytoplasmique dans l'interaction des MTs avec les microfilaments d'actine *via* la β -caténine.

Dans la discussion, nous débâterons de l'existence possible, chez les eucaryotes supérieurs, d'un système impliquant la CLIP-170 qui permettrait la dépolymérisation des MTs tout en maintenant l'ancrage de ces derniers au cortex (« ancrage-dépolymérisation »). Autrement dit, un système similaire à la première étape du mécanisme de positionnement de fuseau mitotique, chez la levure *S. cerevisiae*, qui met en jeu le couple Bim1p-Kar9p (chapitre I.C.2.).

3. Fonctions des CLIPs dans la ségrégation des chromosomes

a) La CLIP-170

Comme la dynéine cytoplasmique, la dynactine et LIS1, la CLIP-170 est présente, de façon transitoire, sur les kinétochores pendant la prémétaphase, immédiatement après la rupture de l'enveloppe nucléaire (Dujardin *et al.*, 1998). Elle n'est plus détectée sur les kinétochores des chromosomes alignés sur la plaque métaphasique, mais elle reste présente sur les kinétochores non attachés à un pôle. Des expériences d'immunofluorescence indirecte ont montré que la CLIP-170 est détectée en permanence sur les kinétochores dans des cellules traitées à la vinblastine ou au nocodazole. Il semblerait même qu'elle y soit détectée à nouveau dans des cellules métaphasiques après dépolymérisation, même partielle, des

microtubules (Données non publiées, D.L. Dujardin et J.R. De Mey), suggérant fortement que l'interaction des bouts (+) des MTs avec la plaque externe des kinétochores provoque la libération de la CLIP-170. Ces résultats semblent limiter le rôle de la CLIP-170 aux premières étapes de la pré-métaphase, étapes correspondant aux premières interactions latérales entre les MTs du fuseau de division et la corona des kinétochores (voir chapitre I). La CLIP-170 pourrait, conjointement avec la dynéine et la dynactine, jouer un rôle dans les premiers mouvements des chromosomes (mouvements rapides) en facilitant la prise en charge de chaque kinétochore par le complexe moteur.

La disparition de la CLIP-170 des kinétochores semble coïncider avec celle de la dynéine cytoplasmique et de la dynactine, ce qui tend à confirmer l'hypothèse selon laquelle la CLIP-170 pourrait interagir et fonctionner de concert avec ce complexe moteur (Dujardin *et al.*, 1998). La dynactine joue un rôle important dans l'association de la dynéine cytoplasmique avec les kinétochores et certainement avec d'autres organites (Echeverri *et al.*, 1996). Une étude plus récente indique qu'elle pourrait être également impliquée dans le recrutement de la CLIP-170 sur les kinétochores. En effet, la sur-expression de la p50 (dynamitine), délocalise des kinétochores, non seulement, la dynéine cytoplasmique et de certaines sous-unités de la dynactine, mais aussi, la CLIP-170. En revanche, la sur-expression de la CLIP-170, ou d'une variante incapable de se lier aux microtubules, provoque le déplacement de la CLIP-170 endogène, mais n'a aucune incidence sur la localisation du complexe moteur (Dujardin *et al.*, 1998). Il existerait, donc, une hiérarchie dans la co-distribution de la CLIP-170 avec la dynéine et la dynactine sur des kinétochores, totalement opposée à celle que l'on a pu observer sur les bouts (+) des MTs.

La localisation de la CLIP-170 sur les kinétochores dépend de son domaine carboxy-terminal (Dujardin *et al.*, 1998). Sachant par ailleurs que le recrutement de la dynactine sur les bouts (+) des MTs dépend également du domaine carboxy-terminal de la CLIP-170 (Hoogenraad *et al.*, 2002; Valetti *et al.*, 1999), il est fort probable que l'interaction entre la CLIP-170 et le complexe D/D sur différentes structures cellulaires se fasse par l'intermédiaire de ce domaine et implique les boîtes CCHC.

La sur-expression de différentes formes de CLIP170, dépourvues du domaine d'interaction aux MTs et pouvant se lier aux kinétochores, retarde l'alignement des chromosomes (Dujardin *et al.*, 1998). Cela confirme l'implication de la CLIP-170 dans le fonctionnement des kinétochores avant la formation de la plaque équatoriale. En revanche, la

sur-expression de formes incapables de se lier aux kinétochores (dépourvues de leur domaine carboxy-terminal), mais capables d'interagir avec les MTs, induit la formation de faisceaux (ou paquets) de MTs (Pierre *et al.*, 1994) et provoque l'apparition de fuseaux mitotiques monopolaires (Données non publiées, D.L. Dujardin, F.M. Coquelle et J.R. De Mey). La CLIP-170 étant localisée sur les centrosomes en prophase (Dujardin *et al.*, 1998), ces données suggèrent que la CLIP-170, de concert avec le complexe moteur D/D, pourrait jouer un rôle déterminant dans la séparation des pôles, en participant peut-être à une force de traction exercée sur les MTs astériens. Cette force de traction pourrait s'exercer depuis le cortex cellulaire et/ou l'enveloppe nucléaire.

b) Bik1p

De façon analogue à CLIP-170, Bik1p est localisée, chez *Saccharomyces cerevisiae*, sur le fuseau mitotique, sur les SPBs (« Spinde Pole Bodies ») (Berlin *et al.*, 1990) et sur les kinétochores (Lin *et al.*, 2001). Un certain nombre de résultats expérimentaux tendent à montrer que Bik1p joue un rôle capital dans le mouvement des chromosomes. En effet, la protéine Bik1p semble requise, pour l'attachement des kinétochores aux MTs du fuseau de division (Lin *et al.*, 2001). Comme la CLIP-170, son recrutement sur les kinétochores est indépendant de sa liaison aux MTs et dépend de son domaine carboxy-terminal, contenant une boîte CCHC. De plus, la délétion du gène *BIK1* entraîne, outre un mauvais positionnement du fuseau de division, une perte de chromosomes au cours de la mitose (Berlin *et al.*, 1990). Par ailleurs, le traitement des levures par la rapamycine provoque grossièrement les mêmes effets que la délétion de *BIK1*, ce qui suggère que la kinase TOR, l'orthologue de FRAP, contrôle l'activité de Bik1p au cours de la mitose (Choi *et al.*, 2000).

Les fonctions de Bik1p en mitose, chez la levure bourgeonnante, semblent donc similaires à celles de la CLIP-170, chez les mammifères, confirmant que ces protéines sont orthologues, malgré la différence de taille et les faibles pourcentages d'identité et de similitude.

RESULTATS

RESULTATS

Avant-propos :

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, les mécanismes qui contrôlent l'organisation et la polarisation du réseau microtubulaire, notamment pendant la mitose et la migration des cellules, sont peu connus. Certes, de nombreux travaux ont révélé l'implication directe de divers types de protéines, comme des MAPs et des moteurs moléculaires, dans la régulation de la dynamique des MTs. Cependant, nous n'avons, à ce jour, aucune certitude concernant les mécanismes qui assurent le contrôle spatio-temporel de la dynamique des MTs et qui permettent l'ancrage de ces derniers dans des structures particulières comme le cortex cellulaire et le kinétochore. Toutefois, les cinq dernières années de recherche dans ce domaine, ont permis de faire la lumière sur une « nouvelle » famille de protéines qui pourrait jouer un rôle capital dans ce contrôle spatio-temporel de l'organisation du réseau microtubulaire. Il s'agit des +TIPs pour « +end Tracking Proteins » (Schuyler et Pellman, 2001). Ces protéines partagent la propriété de se localiser aux bouts (+) des MTs au cours de leur polymérisation. Elles contribuent à la régulation de la dynamique des MTs et constituent d'excellents candidats pour assurer le guidage de l'assemblage des MTs vers une région spécialisée du cortex (exemples de Tip1p chez *S. pombe* et du couple CLIP-CLASP chez les mammifères, voir chapitre IV de l'introduction). Par ailleurs, en interagissant avec certaines protéines corticales et kinétochoriennes, les +TIPs devraient permettre l'ancrage et la stabilisation concomitants des MTs au cortex cellulaire et au kinétochore (exemples du couple EB1-APC, chapitre I, et du couple CLIP-IQGAP1, chapitre IV).

La CLIP-170

La CLIP-170 est le prototype des +TIPs (Diamantopoulos *et al.*, 1999; Perez *et al.*, 1999). Elle a été identifiée originellement comme une protéine capable d'interagir avec les MTs de façon ATP dépendante (Rickard et Kreis, 1990). Elle est requise, *in vitro*, pour l'établissement d'un lien statique entre les vésicules d'endocytose et les microtubules (Pierre *et al.*, 1992). Des études menées sur Tip1p, son orthologue chez *S. pombe*, suggèrent que la CLIP-170 (et les CLIPs en général) pourrait stabiliser les MTs en réduisant la fréquence de catastrophe (Brunner et Nurse, 2000). Cependant, une étude récente, fondée sur l'utilisation d'un « dominant négatif » de CLIP-170, semble indiquer que la CLIP-170 pourrait agir en

augmentant la fréquence de sauvetage (Komarova *et al.*, 2002). Cela étant, ces deux hypothèses ne sont pas nécessairement mutuellement exclusives (voir discussion). En mitose, la CLIP-170 est détectée sur les centrosomes en prophase et sur les kinétochores en prémétaphase où elle pourrait jouer un rôle dans la capture des MTs et contribuer ainsi aux premiers mouvements des chromosomes (Dujardin *et al.*, 1998).

La dynéine cytoplasmique

La dynéine cytoplasmique est un moteur moléculaire impliqué dans le transport d'organelles vers l'extrémité (-) des MTs (Karki et Holzbaur, 1999). Elle requiert pour fonctionner un co-facteur appelé la dynactine qui semble remplir les fonctions de facteur de processivité et de récepteur du moteur moléculaire sur les organelles (Holleran *et al.*, 1998). De plus, la dynactine et la dynéine cytoplasmique (complexe dynéine/dynactine ou D/D) appartiennent également à la famille des +TIPs.

Le complexe D/D est impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires comme le transport des vésicules d'endocytose (Aniento *et al.*, 1993), le maintien de l'intégrité de l'appareil de Golgi (Burkhardt *et al.*, 1997; Harada *et al.*, 1998), la réorientation du MTOC vers le « leading edge » (front de migration) de cellules s'apprêtant à migrer (Etienne-Manneville et Hall, 2001) et la division cellulaire (Karki et Holzbaur, 1999). La mitose est l'un des modèles d'étude de la dynéine cytoplasmique dans notre laboratoire. En prémétaphase, D/D se localise sur la corona des kinétochores (Echeverri *et al.*, 1996; Pfarr *et al.*, 1990; Steuer *et al.*, 1990; Wordeman *et al.*, 1991), ce qui suggère son implication dans les premiers mouvements des chromosomes après la rupture de l'enveloppe nucléaire. Dans des cellules épithéliales, à partir de la prémétaphase tardive, un travail réalisé dans notre laboratoire a révélé l'existence d'accumulations corticales de dynéine cytoplasmique et de dynactine, sous les jonctions serrées, que nous avons appelées : sites corticaux (Busson *et al.*, 1998). Des données plus récentes de notre laboratoire, non encore publiées (Dompiere *et al.*, en préparation), indiquent que les sites corticaux sont capables, *in vivo*, de participer au positionnement du fuseau de division dans les cellules MDCK. En effet, cette étude, réalisée au moyen d'un microscope permettant de suivre dans le temps et dans l'espace deux marqueurs fluorescents au sein d'une cellule (outil développé dans notre laboratoire par J.R. De Mey et J-B Sibarita), a permis de montrer que les sites corticaux sont capables de capturer des MTs astériens et d'exercer, par ce biais, une tension sur les pôles du fuseau de division. Quel est le mécanisme moléculaire permettant aux sites corticaux de capturer les MTs ? De

quelle façon les sites sont-ils assemblés ? Plus précisément, quelles sont les voies de signalisation qui contrôlent la formation et la localisation des sites corticaux ? Autant de questions qui restent en suspens et qui feront l'objet d'une recherche intensive dans les années à venir.

Relations entre la CLIP-170 et le complexe dynéine/dynactine

Depuis la découverte et la caractérisation de la CLIP-170, un certain nombre d'arguments se sont accumulés en faveur d'un rôle de cette protéine dans le fonctionnement du complexe moteur dynéine/dynactine (D/D) :

- 1) La CLIP-170 se co-localise avec le complexe D/D, de façon dynamique, sur les bouts (+) des MTs (Vaughan *et al.*, 1999) et sur les kinétochores (Dujardin *et al.*, 1998).
- 2) La CLIP-170 pourrait fonctionner de concert avec le complexe D/D dans le transport vésiculaire entre les endosomes précoces et les endosomes tardifs. En effet, la CLIP-170 établit, *in vitro*, un lien statique entre les MTs et les vésicules d'endocytose, lesquelles sont transportées, *in vivo*, par le complexe D/D (voir le modèle décrit dans le chapitre IV de l'introduction, (Rickard et Kreis, 1996)).
- 3) La localisation du complexe D/D sur les bouts (+) des MTs dépend de la CLIP-170. En effet, la sur-expression d'une CLIP-170 dépourvue de son domaine carboxy-terminal, ou de la CLIP-115, inhibe le recrutement du complexe D/D sur les bouts (+) des MTs (Hoogenraad *et al.*, 2002; Valetti *et al.*, 1999). Toutefois, la p150^{glued}, probablement isolée du complexe D/D, pourrait être capable de s'associer aux bouts (+) des MTs de façon indépendante de la CLIP-170 (Vaughan *et al.*, 2002). Ce dernier point sera commenté dans la discussion.
- 4) Le recrutement de la CLIP-170 sur la corona des kinétochores en prémétaphase dépend de la dynactine. En effet, la sur-expression de la dynamitine (p50), dans des cellules COS7, délocalise des kinétochores, non seulement, la dynéine cytoplasmique et les autres sous-unités de la dynactine à l'exception de la p62 (Echeverri *et al.*, 1996), mais aussi, la CLIP-170 (Dujardin *et al.*, 1998).

Cependant, aucun lien physique n'avait pu être mis en évidence entre la CLIP-170 et D/D. Par ailleurs, rendant difficile l'étude des fonctions de la CLIP-170 vis-à-vis de D/D, nous ne connaissions, jusqu'à très récemment, aucun partenaire de la CLIP-170 à l'exception de la tubuline.

I. LIS1 constitue un adaptateur entre la CLIP-170 et le complexe dynéine cytoplasmique/dynactine. Article :(Coquelle *et al.*, 2002)

La co-localisation du complexe D/D avec la CLIP-170 dépend du domaine carboxy-terminal de cette dernière. En effet, des études préliminaires, menées au laboratoire, ont permis de montrer que l'adressage de la CLIP-170 vers les kinétochores dépend de ses 156 derniers résidus aminoacides (adressage qui dépend aussi de la dynactine, voir plus haut) (Dujardin *et al.*, 1998). De plus, comme cela a été évoqué plus haut, la CLIP-170, *via* son domaine carboxy-terminal, est vraisemblablement impliquée dans le recrutement de la dynactine et de la dynéine cytoplasmique sur les bouts (+) des MTs dynamiques (Hoogenraad *et al.*, 2002; Valetti *et al.*, 1999). Ces données suggèrent que la CLIP-170 pourrait interagir directement ou indirectement avec le complexe D/D par l'intermédiaire de son domaine carboxy-terminal. Ce dernier contient deux exemplaires d'un motif de type « doigt de zinc », appelé boîte CCHC, dont la fonction au sein de la CLIP-170 était totalement inconnue avant cette thèse (voir chapitre IV). Cette boîte CCHC est présente, par ailleurs, dans certaines protéines codées par les gènes GAG de rétrovirus comme HIV1 ou celui du sarcome de Rous. Sachant que les boîtes CCHC sont notamment impliquées dans une interaction de type protéine-protéine chez HIV1 (NCp7 et Vpr, voir chapitre IV) (de Rocquigny *et al.*, 1997), nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les motifs CCHC de la CLIP-170 pourraient, eux aussi, être impliqués dans ce même type d'interaction. Cette interaction pourrait concerner une ou plusieurs sous-unités de la dynactine ou de la dynéine cytoplasmique et permettre ainsi le recrutement de la CLIP-170 sur le kinétochore et du complexe D/D sur les bouts (+) des MTs. Alternativement, cette interaction pourrait concerner une tierce protéine susceptible de faire le lien entre la CLIP-170 et le complexe moteur D/D. Concernant cette dernière hypothèse, un candidat a été suggéré lors d'une étude génétique réalisée chez *S. cerevisiae* (Geiser *et al.*, 1997). Cette étude consistait à rechercher des gènes essentiels à la survie de levures mutées, par ailleurs, dans un gène codant pour une kinésine requise pour la séparation des pôles du fuseau de division. Cette approche a permis d'identifier, entre autres, de nombreux gènes codant pour des sous-unités du complexe dynéine/dynactine ainsi que Bik1p et Pac1p, les orthologues respectivement de la CLIP-170 et de LIS1.

LIS1 est une protéine mutée chez de nombreux patients atteints d'une lissencéphalie de type I (voir chapitre III). C'est une MAP qui permet de réduire la fréquence de catastrophe et d'augmenter la taille maximale pouvant être atteinte par les MTs *in vitro*. Elle interagit et se co-localise aussi avec plusieurs sous-unités du complexe D/D et semble se comporter comme un co-facteur activateur de ce dernier.

La protéine NUDF est l'orthologue de LIS1 chez *Aspergillus nidulans*. Elle a été identifiée dans un crible visant à isoler des mutants dont la migration du noyau est déficiente (nud, « Nuclear Distribution ») (Xiang *et al.*, 1995). C'est aussi un partenaire de la dynéine

cytoplasmique qui contribue à augmenter la dynamique des MTs *in vivo* (voir chapitre III) (Han *et al.*, 2001). NUDF se localise de façon dynamique sur les bouts (+) des MTs, ce qui fait de cette protéine une +TIP et laisse supposer que LIS1 pourrait en faire autant.

1) La CLIP-170 et LIS1 se co-localisent sur différentes structures cellulaires (Fig. 1)

Des données déjà publiées montrent que LIS1 (Faulkner *et al.*, 2000), d'une part, et CLIP-170 (Dujardin *et al.*, 1998), d'autre part, se co-localisent avec le complexe D/D sur les centrosomes et les kinétochores. Cependant aucune démonstration directe de la co-localisation de LIS1 avec la CLIP-170 sur ces structures n'a été rapportée à ce jour. Aussi, nous avons entrepris des expériences d'immunofluorescence indirectes sur des cellules HeLa (nous avons obtenu des résultats identiques avec les cellules COS7 et MDCK) afin de déterminer les localisations précises de LIS1 et de la CLIP-170 en interphase et en mitose.

Au cours de la mitose les deux protéines se co-localisent sur l'enveloppe nucléaire en prophase, sur la corona des kinétochores et les MTs astériens en prémétaphase et aux sites corticaux principalement à partir de la prémétaphase tardive. Ce travail constitue la toute première démonstration de la co-localisation de la CLIP-170 avec LIS1 sur les sites corticaux, ce qui suggère un rôle de la CLIP-170 dans le fonctionnement du complexe D/D sur ces structures (positionnement et orientation du fuseau de division).

Dans des cellules interphasiques de mammifères, LIS1 est localisée, de façon ponctuelle, le long des MTs (Sapir *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 2000). En dépit d'une localisation dynamique de NUDF aux bouts (+) des MTs, il n'a jamais été publié de localisation comparable pour LIS1. Compte tenu des résultats qui vont suivre, il est fort probable, néanmoins, que LIS1 se localise aussi sur les bouts (+) des MTs. Pour démontrer cela, nous avons transfecté des cellules HeLa par un plasmide codant pour la chimère LIS1-FLAG-DsRed (voir le « Mat&Met » de l'article). Dans un premier temps, nous nous sommes assurés que cette protéine chimérique se comportait bien comme la protéine endogène et qu'elle ne générât pas de phénotype consécutif à sa sur-expression modérée. Puis, nous avons constaté que, parallèlement à sa localisation ponctuelle le long des MTs, LIS1 est enrichie sur les bouts (+) des MTs où elle se co-localise avec la CLIP-170. Cela suggère fortement que LIS1 appartient aussi à la famille des +TIPs, comme cela a déjà été montré pour NUDF.

La co-localisation de LIS1 et de la CLIP-170 sur de nombreuses structures cellulaires connues par ailleurs pour recruter le complexe D/D, nous a conduit à supposer l'existence d'une interaction directe entre ces deux protéines.

2) La CLIP-170 interagit directement avec LIS1 par l'intermédiaire de sa boîte CCHC distale (la plus proche de l'extrémité carboxy-terminale) (Fig. 2)

Afin d'élucider les fonctions des deux « doigts de zinc » putatifs de la CLIP-170, et de tester leur implication dans une éventuelle interaction entre la CLIP-170 et LIS1, nous avons réalisé une série de mutations (délétions et substitutions par mutagenèse dirigée) des motifs CCHC et étudié leurs effets dans différents types d'expériences.

Nous avons généré, pour ces expériences, des fragments carboxy-terminaux de la CLIP-170, de tailles différentes, contenant ou non les mutations dont on vient de parler. Dans la **table 1** en annexe, sont schématisés les principaux fragments carboxy-terminaux que nous avons utilisés. Ces différents fragments carboxy-terminaux ont été sous-clonés dans plusieurs vecteurs de façon à produire des protéines chimériques décrites dans l'article. Ils ont été aussi sous-clonés dans le gène de la CLIP-170 « entière » à la place de la séquence sauvage correspondante.

Nous avons montré, par des approches moléculaires et biochimiques, que le domaine carboxy-terminal de la CLIP-170 interagit directement avec LIS1. De plus, des expériences de co-immunoprécipitation, réalisées sur des extraits de cerveaux embryonnaires de souris, nous ont permis de confirmer l'existence d'une telle interaction *in vivo*.

Le second motif CCHC de la CLIP-170 (le plus distal et le plus conservé des deux) est absolument nécessaire à cette interaction. En revanche, une mutation dans le premier motif CCHC réduit, mais n'abolit pas l'interaction avec LIS1. De plus, bien que l'intégralité de la séquence de LIS1 semble être nécessaire à une liaison stable et efficace avec la CLIP-170, les domaines WD5, WD6 et WD7 (dans cet ordre d'importance) semblent jouer un rôle prépondérant dans cette interaction.

3) Le recrutement de LIS1 sur les kinétochores dépend du complexe D/D (Fig. 3)

Il a été démontré auparavant que la sur-expression de la p50 (dynamitine) délocalise des kinétochores, non seulement, la dynéine cytoplasmique et certaines sous-unités de la dynactine (Echeverri *et al.*, 1996), mais aussi, la CLIP-170 (Dujardin *et al.*, 1998). Nous démontrons ici qu'il en est de même pour LIS1, ce qui suggère que l'adressage de LIS1 au kinétochore dépend du complexe D/D.

4) Le recrutement de la CLIP-170 sur les kinétochores dépend de son domaine de liaison à LIS1 (Fig. 4)

Pour cette expérience, nous avons réalisé des protéines chimériques en fusionnant la GFP (Green Fluorescent Protein) aux différents fragments carboxy-terminaux de la CLIP-170

décrits plus haut. L'expression de chacune de ces chimères dans des cellules COS7 a révélé que le second motif CCHC de la CLIP-170, requis par ailleurs pour l'interaction avec LIS1, est absolument nécessaire au recrutement de la CLIP-170 sur les kinétochores. En revanche, une mutation dans le premier « doigt de zinc » réduit beaucoup ce recrutement, mais ne l'abolit pas. Par ailleurs, nous montrons, dans cette expérience, qu'un fragment ne contenant que les deux boîtes CCHC (GFP-Z1+2) est capable à lui seul de s'associer aux kinétochores. En conclusion, le domaine d'interaction avec LIS1 de la CLIP-170 est nécessaire et suffisant pour le recrutement de cette dernière sur les kinétochores. Ces résultats corroborent l'interaction entre CLIP-170 et LIS1 et suggèrent fortement que LIS1 recrute la CLIP-170 sur les kinétochores.

Ces données, concernant le rôle du second motif CCHC dans l'adressage vers le kinétochore des chimères GFP, ont été vérifiées dans le contexte de la CLIP-170 entière et/ou de la CLIP-170 dépourvue seulement de son domaine amino-terminal (données non communiquées). Compte tenu des résultats mentionnés dans le paragraphe précédent, ces expériences donnent une idée plus précise de la hiérarchie de recrutement sur le kinétochore de la CLIP-170, de LIS1 et du complexe D/D. En effet, la dynactine est probablement recrutée en premier en interagissant avec ZW10 (Starr *et al.*, 1998), puis vient la dynéine cytoplasmique et LIS1 et, enfin, la CLIP-170.

5) Le recrutement de LIS1 sur les bouts (+) des MTs dans des cellules interphasiques sur-exprimant la CLIP-170 (Fig. 5)

La sur-expression de LIS1 est connue pour abolir le recrutement de la dynactine (p150glued) (Faulkner *et al.*, 2000) et de la dynéine cytoplasmique (DIC) (Niethammer *et al.*, 2000) sur les bouts (+) des MTs. Nous montrons ici, que la sur-expression de la CLIP-170 provoque l'accumulation de la chimère GFP-LIS1 co-transfectée sur les bouts (+) des MTs. En revanche, cette accumulation n'est pas constatée lorsque l'on sur-exprime la CLIP-115, mais elle réapparaît lorsque l'on sur-exprime une chimère correspondant à la fusion du domaine carboxy-terminal de la CLIP-170 à la CLIP-115. D'une part, ce résultat confirme le rôle du domaine carboxy-terminal de la CLIP-170, contenant les deux boîtes CCHC, dans l'interaction avec LIS1. D'autre part, ces données suggèrent un rôle de la CLIP-170 dans le recrutement de LIS1 sur les bouts (+) des MTs. Il est intéressant de noter que la hiérarchie de recrutement des protéines sur les bouts (+) des MTs paraît strictement inversée par rapport à celle constatée sur le kinétochore. Par ailleurs, nous montrons, dans cette expérience, que mNudE, NUDEL et NudC, des partenaires de LIS1, ne sont jamais recrutés sur les bouts (+) des MTs lors de la sur-expression des différentes CLIPs.

6) Éléments indiquant une possible régulation de l'interaction entre la CLIP-170 et LIS1 par phosphorylation (Fig. 6)

LIS1 est une phosphoprotéine dont l'état de phosphorylation change au cours du développement embryonnaire du cerveau chez la souris. En effet, LIS1 est phosphorylée sur divers sites par des kinases encore inconnues, mais dont l'activité varie au cours du développement (Sapir *et al.*, 1999) (chapitre III de l'introduction). Lors de cette expérience, nous avons utilisé deux anticorps différents dirigés contre LIS1 : un anticorps polyclonal, nous permettant de repérer, dans les cellules, la protéine LIS1 en général et un anticorps monoclonal, phospho-spécifique (clone 210), dirigé contre une région du domaine amino-terminal (voir le schéma plus loin).

La sur-expression de la CLIP-170 dans des cellules interphasiques provoque la formation de faisceaux de MTs épais recouvert de CLIP-170 exogène et endogène, de la p150^{Glued}, d'Arp1 (non montré) et de LIS1 (reconnue par les deux anticorps). La sur-expression d'une CLIP-170-Z2m (CLIP « pleine longueur » avec le motif CCHC distal altéré) provoquent également la formation de faisceaux de MTs épais recouverts de CLIP-170 exogène et de LIS1 reconnue par l'anticorps polyclonal, mais avec une forte diminution des signaux correspondant à la p150^{Glued} et à la sous-population de LIS1 reconnue par l'anticorps 210. Ces données suggèrent une régulation par phosphorylation de l'interaction entre la CLIP-170 et LIS1. Elles indiquent aussi que le recrutement de LIS1 sur les MTs est régulé par phosphorylation et dépend de la CLIP-170 dans le cas de phospho-LIS1 (forme de LIS1 reconnue par l'anticorps 210). Toutefois, une sous-population de LIS1, non phosphorylée à priori, semble posséder la capacité de s'associer aux MTs indépendamment de la CLIP-170. En outre, compte tenu de travaux déjà publiés (Hoogenraad *et al.*, 2002; Valetti *et al.*, 1999), ces données suggèrent que LIS1 pourrait recruter la dynactine, et peut-être la dynéine cytoplasmique, sur les MTs (voir le modèle apparaissant **fig. 7** et la discussion).

Ces expériences ont été réalisées également avec d'autres mutants de CLIP-170. Les résultats confirment le rôle du second motif CCHC dans le recrutement de phospho-LIS1 sur les faisceaux de MTs et sont résumés dans le tableau ci-après.

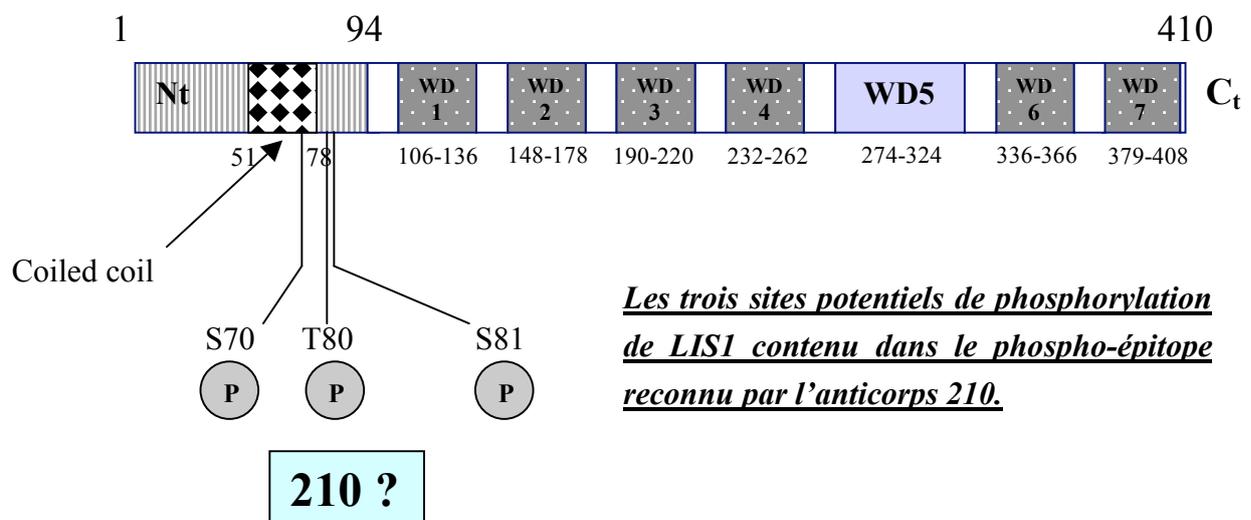
- **Résumé des résultats :**

| Mutants de CLIP-170 | Interaction avec LIS1 | Adressage aux kinétochores | Recrutement de la dynactine# sur les MTs | Recrutement de LIS1 sur les MTs |
|---------------------|-----------------------|----------------------------|--|---------------------------------|
| <i>WT</i> | +++ | +++ | +++ | +++ |
| <i>C2</i> | - | - | - | - |
| <i>C3</i> | - | - | - | n.d. |
| <i>C4</i> | +++ | ++ | +++ | n.d. |
| <i>Z1m</i> | ++ | + | + | + |
| <i>Z2m</i> | - | - | - | - |
| <i>dblZm</i> | - | - | - | - |
| <i>Z1+2</i> | n.d. | ++ | n.a. | n.a. |
| <i>Z2</i> | n.d. | +/- | n.a. | n.a. |

L'interaction, en double hybride, entre CLIP-Cter et LIS1, d'une part, et CLIP-Z1m et LIS1, d'autre part, a été quantifiée (voir : (Coquelle et al., 2002)). # testé pour Arp1 et p150^{Glued}, sauf dans le cas de Z1m, Z2m et dblZm pour lesquels nous n'avons analysé que le recrutement de la p150^{Glued}.

7) **Données complémentaires concernant la régulation de l'interaction entre LIS1 et la CLIP-170 par phosphorylation (Fig. 8)**

Afin d'étudier, plus en détail, le mécanisme de régulation de l'interaction entre LIS1 et CLIP-170, nous avons généré des mutations des sites putatifs de phosphorylation susceptibles d'être reconnus par l'anticorps 210. Il s'agit des sérines 70 et 81 et de la thréonine 80 (voir le schéma qui suit).



Nous avons réalisé, par mutagenèse dirigée, deux types de mutations pour chaque résidu phosphorylable : une substitution par l’alanine pour abolir toute possibilité de phosphorylation et une substitution par l’aspartate pour mimer la phosphorylation. Nous avons, par ailleurs, généré différentes combinaisons de mutations dites de phosphorylation, dans le contexte de la chimère LIS1-FLAG-DsRed (voir l’article pour la construction), dont voici la liste : LIS1-S70A-DsRed, LIS1-S70E-DsRed, LIS1-S81A-DsRed, LIS1-S81E-DsRed, LIS1-S70AS81A-DsRed, LIS1-S70ES81E-DsRed, LIS1-T80AS81A-DsRed et LIS1-T80ES81E-DsRed.

Chacune des chimères a été transfectée transitoirement dans des cellules HeLa. 48 heures après la transfection, les cellules ont été fixées dans des conditions permettant de préserver les bouts (+) des MTs et ont été immuno-marquées par l’anticorps polyclonal TA dirigé contre la CLIP-170. Après avoir réalisé trois expériences indépendantes, nous sommes venus à la conclusion que seule la mutation S70E réduit considérablement le recrutement de LIS1 sur les bouts (+) des MTs (comparer Fig. 8g à 8a), alors que l’intensité du signal correspondant à la CLIP-170 ne varie pas (Fig. 8b, e, h). Toutefois, le recrutement, aux bouts (+) des MTs, des chimères mutantes S70A (Fig. 8d.) et S70AS81A (non montrée) semble parfois, selon les cellules observées, légèrement plus élevé en comparaison de la construction sauvage. Les résultats sont résumés dans le tableau qui suit et la figure 8 montre un exemple représentatif pour chacune des constructions LIS1-WT-DsRed, LIS1-S70A-DsRed et LIS1-S70E-DsRed.

Résumé des résultats des expériences d’immunofluorescence :

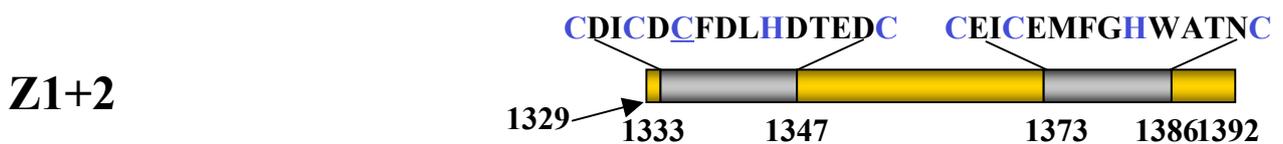
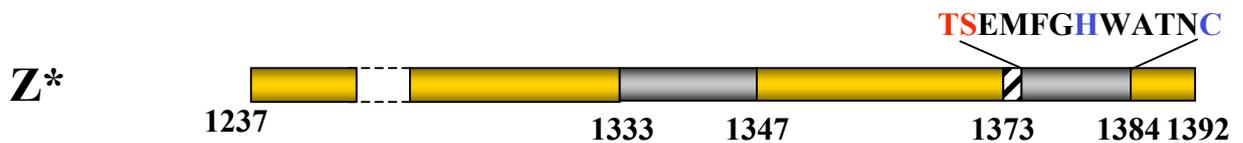
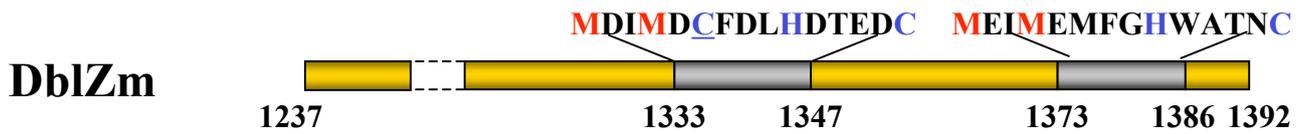
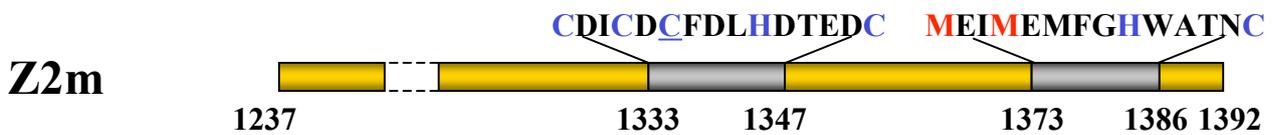
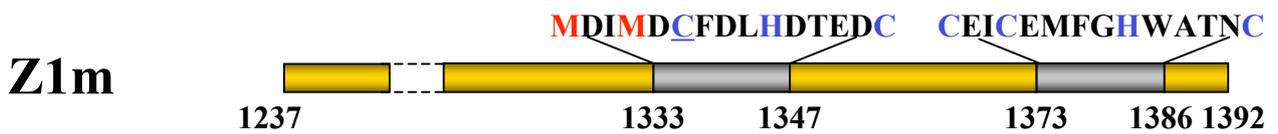
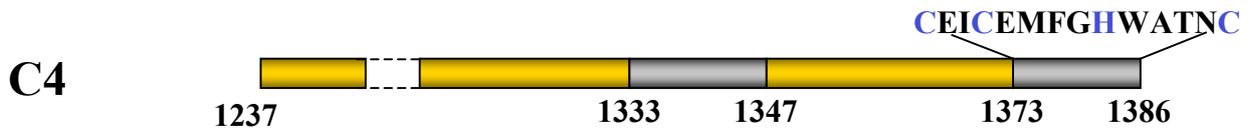
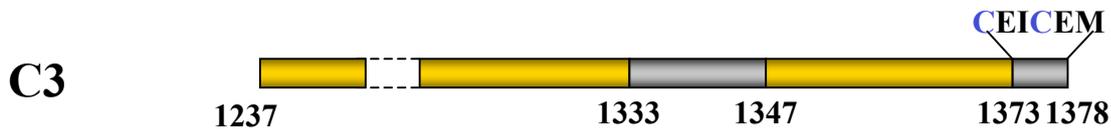
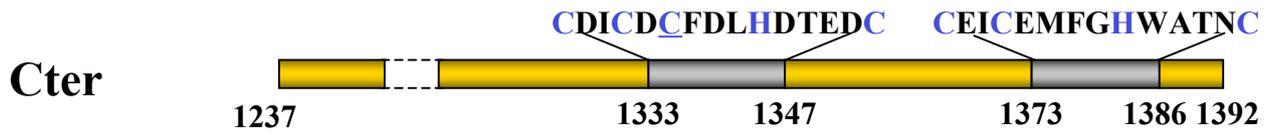
| Constructions : | Intensité du signal « DsRed » sur les bouts (+) des MTs |
|------------------------|--|
| LIS1-WT-DsRed | ++ |
| LIS1-S70A-DsRed | ++(+) |
| LIS1-S70E-DsRed | -/+ |
| LIS1-S81A-DsRed | ++ |
| LIS1-S81E-DsRed | ++ |
| LIS1-S70AS81A-DsRed | ++(+) |
| LIS1-S70ES81E-DsRed | -/+ |
| LIS1-T80AS81A-DsRed | ++ |
| LIS1-T80ES81E-DsRed | ++ |

Ces données sont des estimations visuelles. La quantification est en cours au laboratoire.

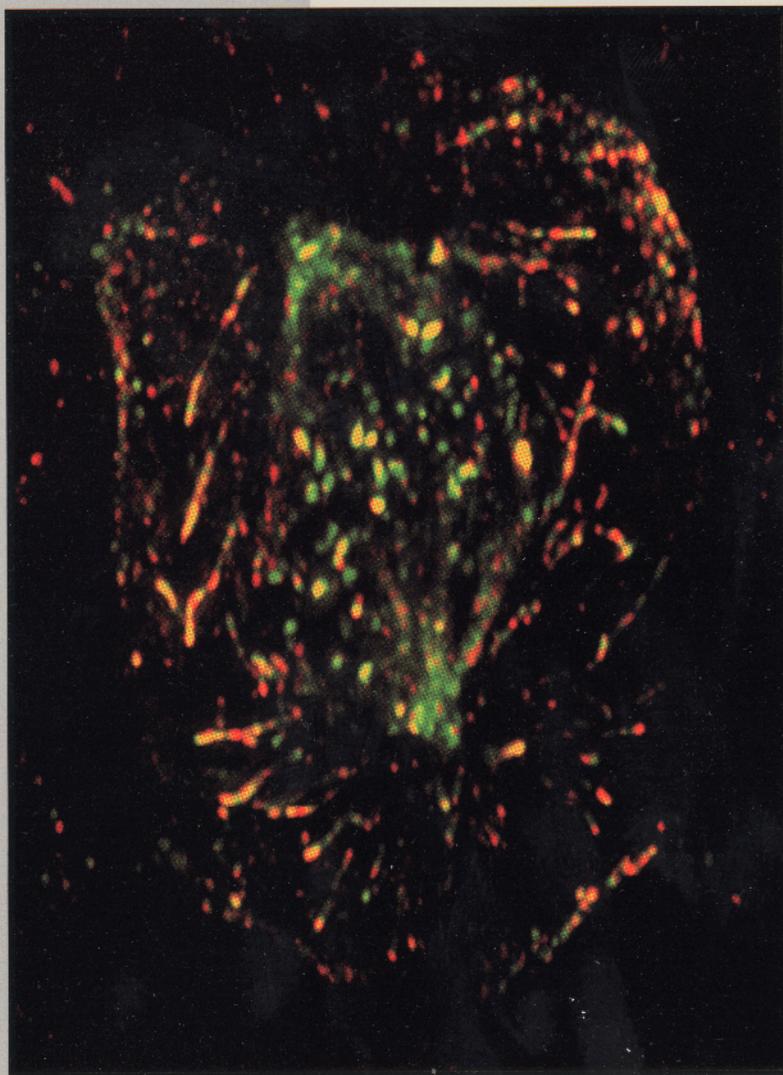
Conclusions : Ces données confirment l'existence d'une régulation par phosphorylation de la localisation de LIS1 sur les bouts (+) des MTs et semblent conforter l'hypothèse d'une régulation par phosphorylation de l'interaction entre la CLIP-170 et LIS1. Concernant ce dernier point, malgré plusieurs tentatives, nous n'avons pas été capables de confirmer le rôle de la sérine 70 dans cette interaction par des approches biochimiques (co-immunoprécipitations). En effet, les résultats ne sont pas reproductibles. Une perspective intéressante serait d'identifier la ou les kinases responsables de cette phosphorylation, afin de mieux comprendre les fonctions physiologiques de l'interaction entre la CLIP-170 et LIS1. Par ailleurs, la CLIP-170 est également une phosphoprotéine. Aussi, une régulation de l'interaction entre LIS1 et la CLIP-170 par la phosphorylation de cette dernière est envisageable. Cela est d'autant plus alléchant que, dans le cas de la CLIP-170, une kinase a été identifiée : FRAP (voir chapitre IV) (Choi *et al.*, 2002).

Nous nous attendions, néanmoins, à un résultat opposé. En effet, sachant que le phospho-anticorps 210 reconnaît une forme de LIS1 associée probablement à la CLIP-170 (voir plus haut), nous nous attendions à ce que des mutations qui miment la phosphorylation de certains résidus de LIS1, augmentent le recrutement de cette dernière sur les MTs et non le contraire (voir la discussion).

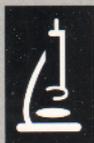
Matériel et méthodes : L'anticorps polyclonal TA dirigé contre la partie carboxy-terminale de la CLIP-170, décrit dans (Coquelle *et al.*, 2002), a été utilisé. L'anticorps secondaire « anti-lapin » est couplé à l'ALEXA-488 (Molecular Probe). Pour l'immunofluorescence permettant de localiser les protéines associées aux bouts (+) des MTs, les cellules HeLa ont été fixées, pendant 10 minutes, dans du méthanol 100 % à -20°C contenant 1 mM d'EGTA (ajouté extemporanément), puis 15 minutes dans une solution de paraformaldehyde 4 % dans le tampon PHEM (60 mM Pipes, 25 mM Hepes, 10mM EGTA, 2 mM acétate de magnésium, ajusté à pH6,9 avec une solution de KOH 6N). Après trois lavages en PBS de 5 minutes (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH7,5), les cellules sont traitées par une solution de 50mM de NH₄Cl dans du PBS pendant 10 minutes, lavées 3 fois en PBS (5 minutes par lavage), bloquées par un mélange PBS/BSA (0,1 % de BSA masse/volume) (3 fois 7 minutes) et marquées par l'anticorps TA pendant 1 heure à 37°C. Après trois lavages dans le PBS/BSA (3 fois 10 minutes), les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire pendant 45 minutes à 37°C. Les cellules sont post-fixées par une solution de formaldéhyde 4 % dans du PBS pendant 16 minutes, puis traitées par une solution de NH₄Cl 50 mM dans de PBS pendant 10 minutes. Les lamelles sont montées en PBS/glycerol 50 % contenant 100 mg.ml⁻¹ de DABCO (1.4-diazabicyclo-(2.2.2) octane (Sigma)). Tous les anticorps sont dilués dans du PBS/BSA. Les images sont acquises par un système 3D avec déconvolution, brièvement décrit dans l'article (Coquelle *et al.*, 2002) et traitées au moyen du logiciel *Metamorph*.



ARTICLE I



Published Twice Monthly
May 2002, Volume 22, Number 9



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

MICB

Molecular and Cellular Biology

LIS1, CLIP-170's Key to the Dynein/Dynactin Pathway

Frédéric M. Coquelle,¹ Michal Caspi,² Fabrice P. Cordelières,¹ Jim P. Dompierre,¹ Denis L. Dujardin,^{1†}
Cynthia Koifman,² Patrick Martin,¹ Casper C. Hoogenraad,³ Anna Akhmanova,³ Niels Galjart,³
Jan R. De Mey,¹ and Orly Reiner^{2*}

Institut Curie, Section de Recherche, CNRS-UMR 146, Centre Universitaire d'Orsay, 91405 Orsay Cedex, France¹; Department of Molecular Genetics, The Weizmann Institute of Science, 76100 Rehovot, Israel²; and Department of Cell Biology and Genetics, Erasmus University, 3000 DR Rotterdam, The Netherlands³

Received 10 October 2001/Returned for modification 7 December 2001/Accepted 15 January 2002

CLIP-170 is a plus-end tracking protein which may act as an anticatastrophe factor. It has been proposed to mediate the association of dynein/dynactin to microtubule (MT) plus ends, and it also binds to kinetochores in a dynein/dynactin-dependent fashion, both via its C-terminal domain. This domain contains two zinc finger motifs (proximal and distal), which are hypothesized to mediate protein-protein interactions. LIS1, a protein implicated in brain development, acts in several processes mediated by the dynein/dynactin pathway by interacting with dynein and other proteins. Here we demonstrate colocalization and direct interaction between CLIP-170 and LIS1. In mammalian cells, LIS1 recruitment to kinetochores is dynein/dynactin dependent, and recruitment there of CLIP-170 is dependent on its site of binding to LIS1, located in the distal zinc finger motif. Overexpression of CLIP-170 results in a zinc finger-dependent localization of a phospho-LIS1 isoform and dynactin to MT bundles, raising the possibility that CLIP-170 and LIS1 regulate dynein/dynactin binding to MTs. This work suggests that LIS1 is a regulated adapter between CLIP-170 and cytoplasmic dynein at sites involved in cargo-MT loading, and/or in the control of MT dynamics.

Several developmental and cellular processes require tightly controlled polarity signaling to the cytoskeleton. These processes include the migration of neurons during brain development (14), the establishment of apicobasolateral polarity of epithelial cells (83), and the positioning of mitotic spindles before the onset of anaphase (26). Central to this is the role of positional cues assembled at the actin-based cell cortex (65). These positional cues capture microtubules (MTs) and generate pulling forces on the centrioles and attached organelles. The molecular basis for MT capture at the cell cortex is still far from understood. Many proteins are thought to be involved in the process; among them are the MT-binding proteins CLIP-170 and LIS1.

CLIP-170, cortical cues, and dynein-dynactin. CLIP-170 was identified as an MT-binding protein that localized to a subset of MT distal ends (54). Subsequent experiments demonstrated that it is required for the binding of endocytic carrier vesicles to MTs in vitro (51). In living cells, it is found at MT plus ends (17), but it detaches when the MT stops growing (49). Genetic studies with budding and fission yeasts have also established that the CLIP-170 orthologs, Bik1p and tip1p, may act as an anticatastrophe factor at specific cellular sites, ensuring that the MTs reach the tip of the growing cell (4, 8). CLIP-170 belongs to a unique class of MT-binding proteins, recently termed +TIPS (for plus-end tracking proteins) (64). The closest homolog of CLIP-170 in mammals, CLIP-115 (16), is also a +TIP (1, 32). Like CLIP-170, CLIP-115 contains two MT

binding domains at its N terminus and a coiled-coil domain that mediates homodimerization (32, 62), but CLIP-115 lacks the unique C-terminal domain of CLIP-170, which displays two conserved zinc finger motifs (27). It remains unknown whether the latter are functionally important.

In addition to a potential role in the regulation of MT dynamics, the +TIPs may also function to recruit different proteins to the tips of growing MTs. For example, dynein/dynactin and adenomatous polyposis coli have been suggested to be targeted to MT tips by CLIP-170 (74) and EB1 (45), respectively. The positioning of the *Saccharomyces cerevisiae* mitotic spindle near the bud's neck and its migration into the bud involve interactions of cytoplasmic MTs with positional cues (48). The yeast homolog of EB1, Bim1p, is part of a kinesin-dependent pathway mediating positioning of the spindle near the bud's neck before anaphase (73). Bim1p interacts with Kar9p (44), a protein transported along actin cables to the bud cortex via an interaction with a type V myosin (reviewed in reference 37). This is so far the only elucidated molecular mechanism for tethering MTs to the cell cortex.

Genetic studies have suggested that the minus-end-directed MT motor dynein and its regulator, the dynactin complex, are also involved in MT capture at the cell cortex (7, 12). Dynein's known sites of action include cortical cues involved in centriole/nucleus rotations in *Caenorhabditis elegans* embryos (33, 69), spindle positioning in fruit fly oogenesis (42, 71), and mammalian epithelial cells (10). So far, the molecular mechanism of the dynein/dynactin-mediated MT tethering at cortical cues remains unknown. CLIP-170 may have an interesting role in this process, since it may tether cortex-associated dynein/dynactin to MTs, but so far attempts to demonstrate a physical interaction between these molecules have been unsuccessful.

Kinetochores as positional cues. A special example of a positional cue is the kinetochore, a pair of structures assem-

* Corresponding author. Mailing address: Department of Molecular Genetics, The Weizmann Institute of Science, 76100 Rehovot, Israel. Phone: 972 8 9342319. Fax: 972 8 9344108. E-mail: orly.reiner@weizmann.ac.il.

† Present address: Department of Pathology, Columbia University, New York, NY 10032-3702.

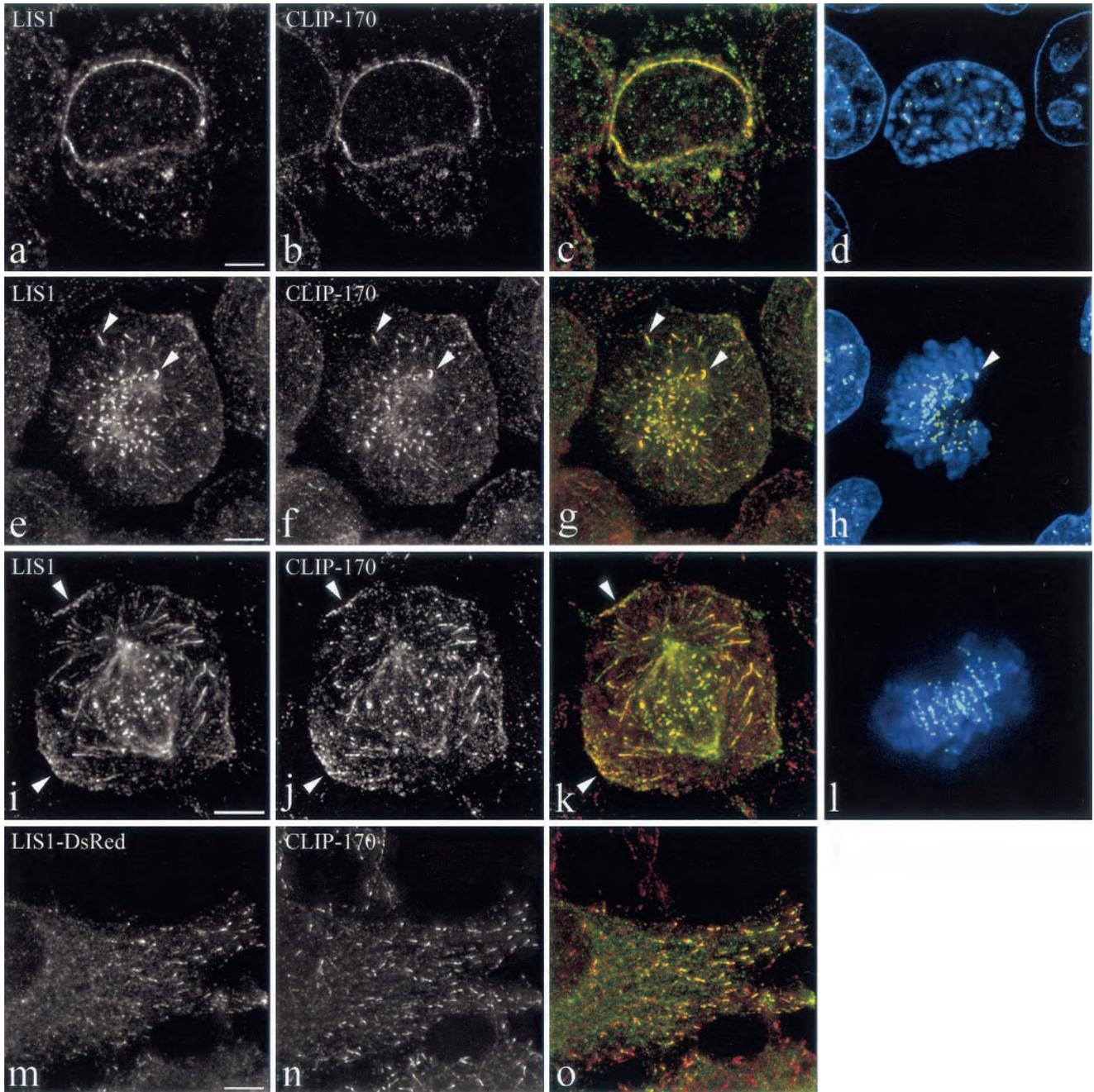


FIG. 1. Colocalization of LIS1 and CLIP-170 at MT-dependent and MT-independent sites. HeLa cells were labeled with a polyclonal anti-LIS1 antibody (a, e, and i), the monoclonal 4D3 anti-CLIP-170 antibody (b, f, and j), and CREST autoimmune serum. Panels c, g, and k are superimpositions of CLIP-170 (red) and LIS1 (green) signals. Panels d, h, and l are superimpositions of CREST (green) and DAPI signals. LIS1 and CLIP-170 colocalize on the nuclear envelope in prophase cells (a to d). In prometaphase, they colocalize on the kinetochores and MT tips (early prometaphase) (e to h, arrows) and on the cortical sites (late prometaphase) (i to l, arrows). HeLa cells were transiently transfected with LIS1-DsRed (m) and fixed under conditions preserving the MT tips (see Materials and Methods). They were labeled with polyclonal anti-CLIP-170 antibody TA (n). Panel o is a superimposition of LIS1-DsRed (green) and CLIP-170 (red). All images are maximal-intensity projections of x/y optical section stacks, acquired by three-dimensional deconvolution microscopy. Bars, 5 μm .

bled during mitosis at the centromeres (34). They contain several large protein complexes that mediate interactions with spindle MTs and are important for fail-safe progression of mitosis (reviewed in references 41, 56, 66, and 68). In vertebrate somatic cells entering mitosis, the first kinetochore

movements are mediated by the rapid sliding of one of the sister kinetochores along the matrix of a polar MT that it has captured tangentially (43, 55). This transport is likely to be driven by the dynein/dynactin motor complex (reviewed in reference 2). Kinetochore-localized CLIP-170 (18) could play

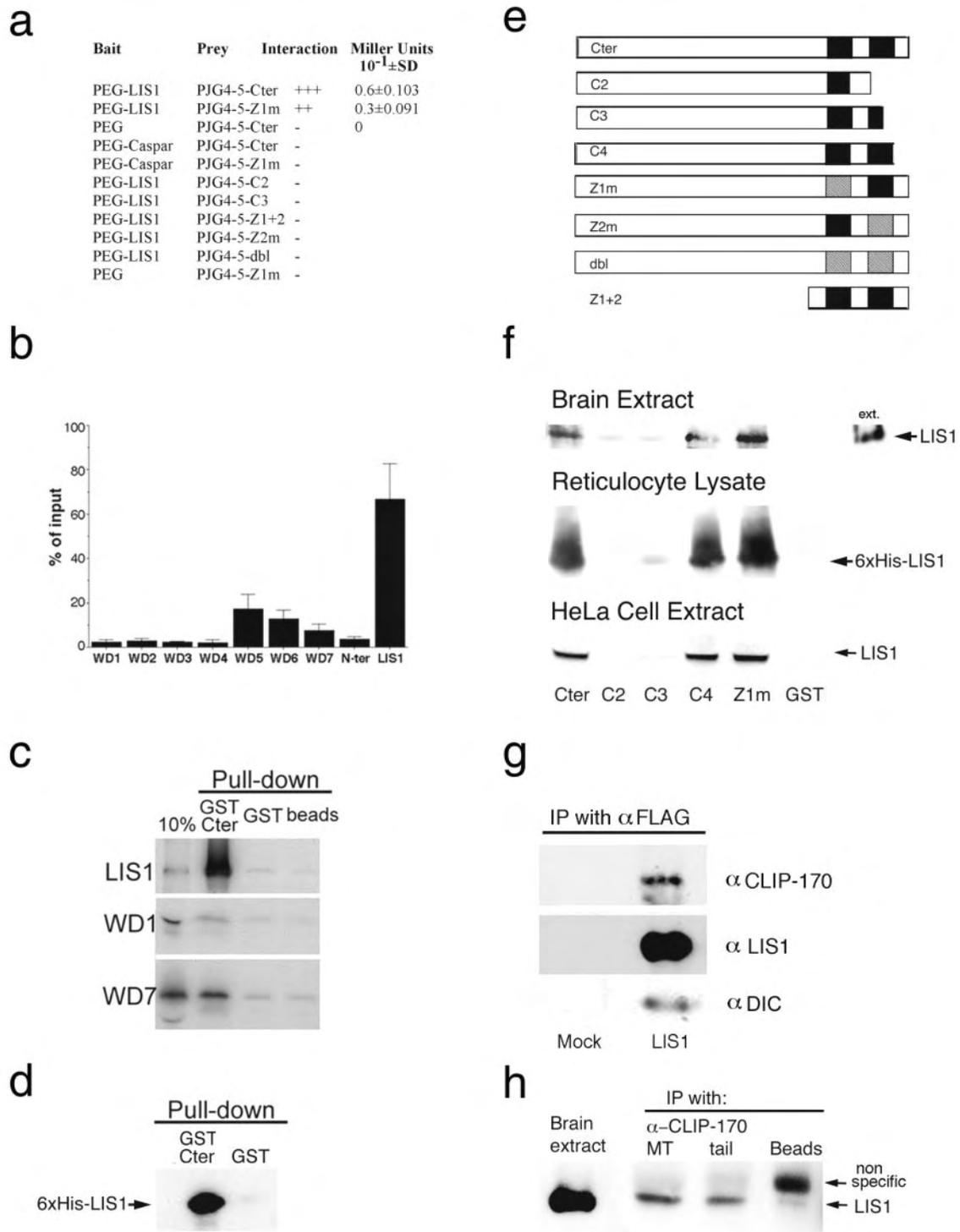


FIG. 2. Physical interaction between LIS1 and CLIP-170. (a) LIS1 interacts with the C-terminal region of CLIP-170 in a yeast two-hybrid system. Positive interactions were demonstrated between PEG-LIS1 and pJG4-5-Cter or Z1m. Other controls with empty baits or an unrelated bait (Caspar) resulted in no blue colonies. (b) CLIP-170 interaction with LIS1 requires the presence of the WD5 domain. GST pull-down assays using GST-Cter or GST (negative control) with individual domains of LIS1 that were *in vitro* translated in a reticulocyte lysate using [³⁵S]methionine were performed. The percentage of input protein that was pulled down specifically by GST-Cter is indicated. The results presented are averages from four independent experiments \pm standard errors of the means. (c) Representative autoradiogram used for quantification of the different LIS1 domains in panel b. (d) Recombinant six-histidine LIS1 and GST-Cter-CLIP-170 interact in a GST pull-down assay. The negative control GST does not interact with LIS1. (e) Schematic presentation of the different C-terminal CLIP-170 constructs used in this study. (f) LIS1 interacts with the C-terminal domain of CLIP-170 and requires the second zinc finger domain (results of GST pull-down assays with brain extract, reticulocyte lysate, and HeLa cell extract) are shown. (g) LIS1, CLIP-170, and dynein intermediate chain coimmunoprecipitate (IP) from cells transfected with DsRed-LIS1-FLAG using anti-FLAG antibodies. (h) LIS1 and CLIP-170 coimmunoprecipitate from E15.5 mouse brain extract with two different anti-CLIP-170 antibodies. The antibodies used were the MT domain antibodies anti-CLIP-115/170 antibody no. 2221 (32) and CLIP-170 C terminus (or tail)-specific antibodies (no. 2360), as described in Materials and Methods.

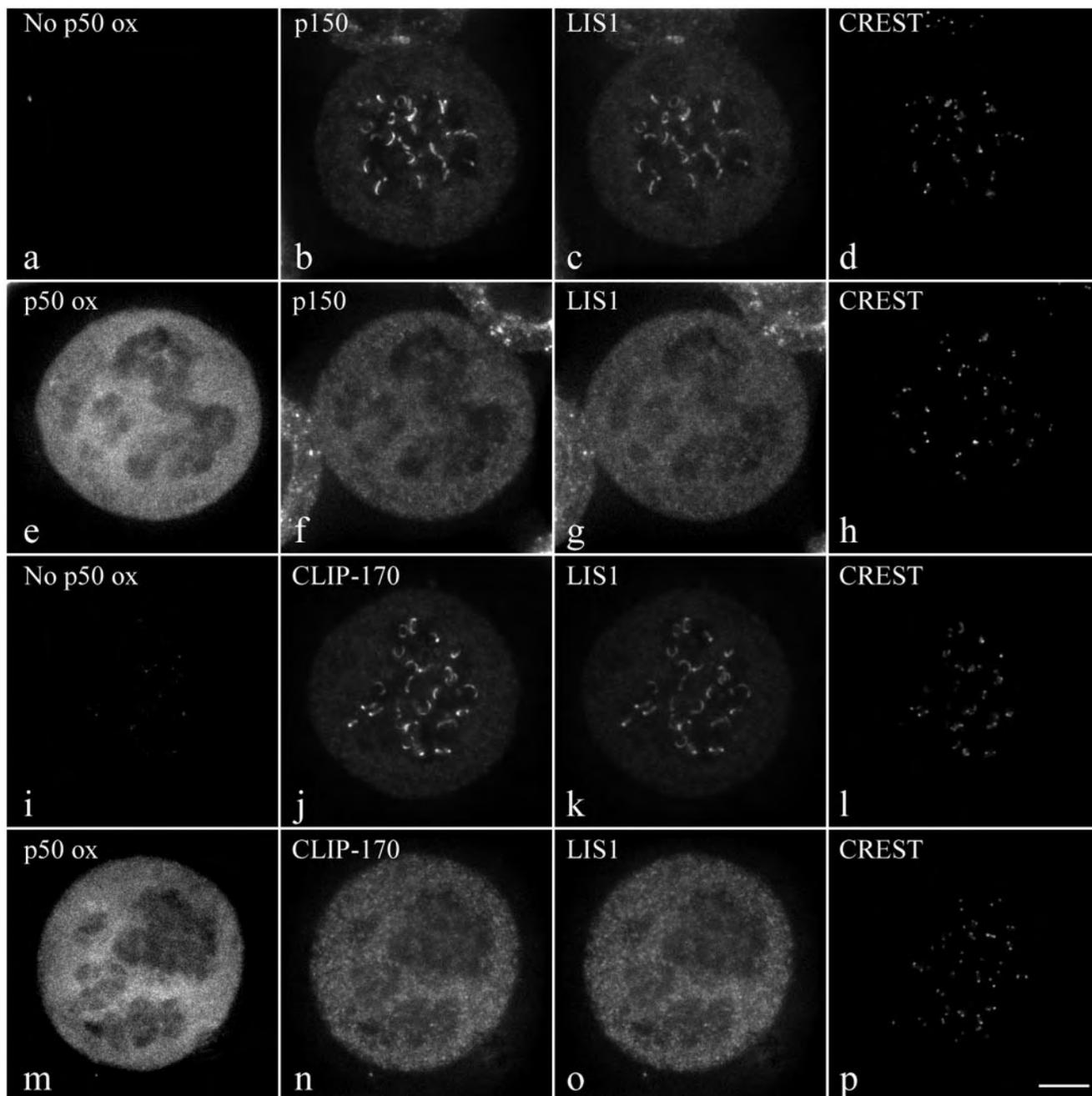


FIG. 3. Effect of p50 overexpression on CLIP-170 and LIS1 targeting to kinetochores. Triple immunostaining of mitotic control (a to d and i to l) or EGFP-p50-overexpressing (e to h and m to p) HeLa cells for either p150 (b and f), LIS1 (c and g), and CREST (d and h) or CLIP-170 (j and n), LIS1 (k and o), and CREST (l and p). Cells were treated with 10 μ M nocodazole for 4 h prior to fixation. As expected, p150 (b and f) and CLIP-170 (j and n) staining from kinetochores decreased under EGFP-p50 expression. Under these conditions LIS1 staining is also dramatically diminished (c, g, k, and o). The images in panels a and i demonstrate that there is no p50 overexpression (ox) while those in panels e and m show eGFP-p50 overexpression. All images are maximal-intensity projections of 10 consecutive planes acquired by three-dimensional deconvolution microscopy. Bar, 5 μ m.

a role in the MT-capturing process and subsequently aid the motor complex with initiating the transport, but so far, proof for this function is sparse. CLIP-170 colocalizes with the dynein/dynactin complex at nonattached kinetochores in a dynein/dynactin-dependent way (18). Like at MTs (74), this colocalization depends on the carboxy-terminal domain of CLIP-170 (18), indicating a direct or indirect association with the

motor complex. Recently, Bik1p was shown to be a +TIP and a component of the kinetochore-MT binding interface in budding yeast. Its binding to the kinetochore is dependent on the C-terminal 40 amino acids (38).

LIS1 and dynein/dynactin. *LIS1* is one of the genes that have a principal role in brain development, since hemizygote mutations in *LIS1* result in a severe brain malformation known

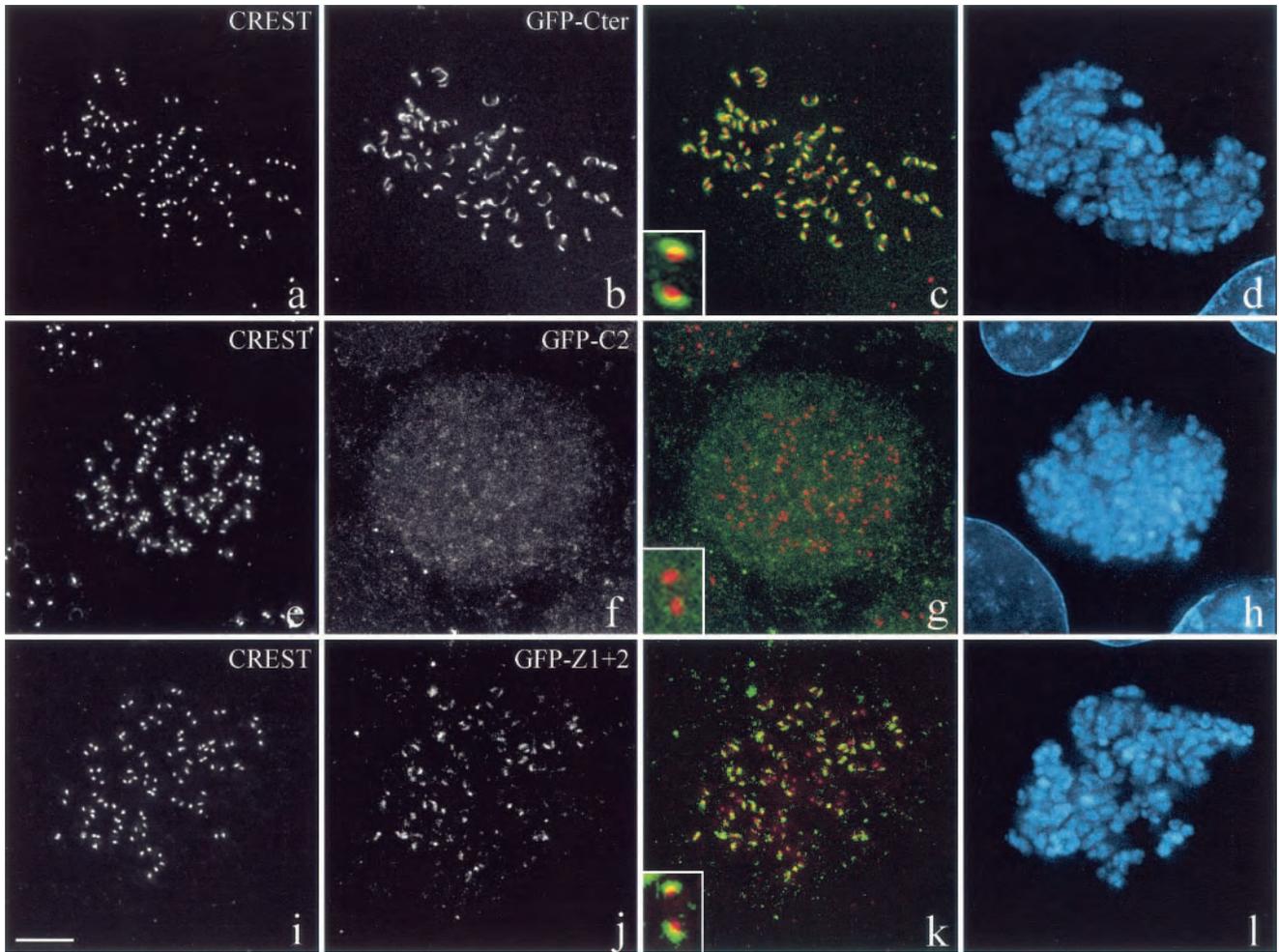


FIG. 4. CLIP-170 localization at the kinetochore is dependent on its LIS1-binding site. COS-7 cells were transiently transfected with GFP-Cter, GFP-C2, or GFP-Z1 + 2 and blocked in prometaphase by nocodazole treatment. The fixation was preceded by extraction in Triton X-100 in order to render kinetochore-bound CLIP-170 detectable. The cells were double labeled with CREST autoimmune serum (a, e, and i) and anti-GFP (b, f, and j). Panels c, g, and k are superimpositions of CREST (red) and GFP (green) signals. Chromosomes were stained with DAPI (d, h, and l). The insets in panels c, g, and k show the relative locations of GFP chimera proteins (in green) and the CREST antigens (in red). All images are maximal-intensity projections of xy optical section stacks acquired by three-dimensional deconvolution microscopy. Bar, 5 μ m.

as lissencephaly (smooth brain) (53). LIS1 contains an N-terminal region with a coiled-coil domain important for dimerization (11) and seven WD repeats that mediate protein interactions (52, 53). Recent data have provided compelling evidence for LIS1 function in the dynein/dynactin pathway. *nudF*, a *LIS1* homolog in the fungus *Aspergillus nidulans*, was identified in a screen for mutants defective in nuclear migration (46, 82). Genetic and biochemical evidence suggested that *nudF* regulates dynein motor activity and MT dynamics (3, 29, 31, 79–81). These findings are consistent with interaction of mammalian LIS1 with tubulin (58) and are corroborated by its interaction with the first P-loop of dynein heavy chain (60). Dynein, dynactin, and LIS1 also coimmunoprecipitate in cultured cells and in the brain (23, 70). In interphase mammalian cells, LIS1 was localized in a dot-like pattern along MTs but not at MT tips (58, 70), whereas in mitotic cells, it colocalizes at astral MTs, kinetochores, and cortical sites (23). Overexpression of LIS1 results in spindle misorientation and disturbance in mitotic progression (23). LIS1 could therefore be

involved in dynein/dynactin-mediated tethering of MTs to cortical sites in a yet-unknown way. Overexpression or reduced expression of LIS1 results in the disturbance of additional dynein-related functions in mammalian cells (60, 70) and in *Drosophila melanogaster* neurons (39). An additional link of LIS1 to the dynein pathway was demonstrated in yeast. A genetic screen for genes required for viability in budding yeast cells with a kinesin-like motor deleted identified many of the established dynein pathway genes (25). Pac1p and Bik1p, homologs of, respectively, LIS1 and CLIP-170 (4, 51), were identified in that screen as well. Pac1p was also found to be involved in nuclear migration together with other genes in the dynein/dynactin pathway (24, 25).

Taking into consideration the amazing conservation of LIS1 functions from *A. nidulans* to human, and based on the data from *S. cerevisiae*, indicating a possible functional relationship between *PAC1* and *BIK1*, we set out to investigate whether LIS1 and CLIP-170 interact in mammalian cells and the role of the CLIP-170 zinc finger motifs in this interaction. Here we

show, in addition to the expected localizations at kinetochores and tips of astral MTs, new colocalizations of CLIP-170 and LIS1 at MT tips in interphase cells, nuclei of prophase cells, and cortical sites contacting astral MTs in mitotic cells. We also provide evidence for the existence of a physical interaction between CLIP-170 and LIS1, involving both zinc fingers of CLIP-170 and some of the WD domains of LIS1. We report that the recruitment of LIS1 to kinetochores is dynein/dynactin dependent and that CLIP-170 targeting to these structures is via its LIS1-interacting domain. Although LIS1 has an intrinsic MT binding capacity, we show that association of a phospho-LIS1 isoform (and dynactin) to MT bundles, induced by CLIP-170 overexpression, is dependent on the distal zinc finger of CLIP-170, raising the possibility that CLIP-170 and LIS1 regulate dynein/dynactin binding to MTs. This work suggests that LIS1 is a regulated adapter between CLIP-170 and cytoplasmic dynein at sites involved in cargo MT loading, and/or in the control of MT dynamics.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture. Culturing and transfection of COS-1 cells (32) or HeLa and COS-7 cells (18) was performed as described previously.

Immunological methods. Antibodies against CLIP-170 were monoclonal antibody 4D3 (54), polyclonal antibody H2A (18), and MT domain antibodies anti-CLIP-115/170 antibody no. 2221 (32). Polyclonal anti-CLIP-170 TA antibodies were produced in rabbit by using a His-tagged fusion protein comprising the last 156 C-terminal amino acids of CLIP-170 (a gift of T. Kreis). CLIP-170 C terminus-specific antibodies (no. 2360) were generated by injecting glutathione *S*-transferase (GST)-CLIP-170 C terminus (amino acids 1029 to 1320) into rabbits as described previously (32). Antibodies against LIS1 (polyclonal [no. 19, affinity purified] and monoclonal [no. 210]) were described previously (57, 58). Other antibodies were monoclonal anti-p150GLUED (Transduction Laboratories, Lexington, Ky.), anti-cytoplasmic dynein intermediate-chain monoclonal antibody 70.1 (Sigma), human CREST autoimmune antiserum recognizing the centromeric region of chromosomes (a gift from H. Ponstingl, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany), monoclonal anti- β -tubulin (Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, Calif.), and monoclonal anti-myc 9E10 (22). All secondary antibodies used for the immunofluorescence studies were made in goat and conjugated to 6-((7-amino-4-methylcoumarin-3-acetyl)amino) hexonic acid, fluorescein isothiocyanate, Cy3, or Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, Pa.) or ALEXA-488, -594, -350 (Molecular Probes).

For immunofluorescence of MT tips, cells were fixed in 100% methanol-1 mM EGTA for 10 min at -20°C , followed by 15 min of fixation in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS). Cells were washed for 5 min in 0.15% Triton X-100-PBS, blocked in PBS-1% bovine serum albumin (BSA)-0.1% Tween, and labeled with different antibodies for 1 h at room temperature. After washing in 0.05% Tween 20-PBS sections were incubated with secondary antibodies. Slides were mounted using Vectashield mounting medium (Vector laboratories) with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) (Sigma) and analyzed on a Leica DMRBE fluorescence microscope equipped with a Hamamatsu C4880 charge-coupled device camera.

For the colocalization experiment, HeLa cells were lysed for 2 min in 0.5% Triton X-100 and fixed in 3% paraformaldehyde in PHEM buffer (18). They were washed three times for 5 min each in PBS and further permeabilized for 25 min in 0.1% Triton X-100 in PBS. The cells were treated with 50 mM NH_4Cl in PBS for 10 min, washed three times for 5 min each in PBS, blocked in PBS-BSA (PBS containing 0.1% BSA), and labeled with a polyclonal anti-LIS1 antibody and the monoclonal 4D3 antibodies for 1 h at 37°C . After being washed in

PBS-BSA, the cells were incubated with secondary antibodies for 45 min. The cells were postfixed in 4% formaldehyde in PBS for 16 min and treated with 50 mM NH_4Cl in PBS for 10 min. The chromosomes were stained with DAPI (Sigma) for 5 min. Coverslips were mounted using PBS-15% glycerol containing the antifading agent 1,4-diazabicyclo-(2.2.2) octane (DABCO) (Sigma) at 100 mg/ml (36). All antibodies were diluted in PBS-BSA.

For the kinetochore-targeting experiment, transfected COS-7 cells were treated with 33 μM nocodazole for 1 h just before the fixation step. The cells were lysed for 30 s in 0.5% Triton X-100 in PHEM to remove excess soluble expressed protein, fixed for 20 min in 3% paraformaldehyde in PHEM at room temperature, washed three times for 5 min each in PBS, and further permeabilized for 25 min in 0.5% Triton X-100 in PBS. The immunofluorescences were processed as described above using CREST human serum and a polyclonal anti-GFP antibody.

For enhanced green fluorescent protein (EGFP)-p50 overexpression experiments, transfected HeLa cells were treated with 10 μM nocodazole for 4 h before lysis and fixation, as described above. Cells were immunolabeled as previously described, using either anti-p150, polyclonal anti-LIS1 and CREST serum, or anti-p150, TA, and CREST.

For recruitment on MTs, transfected COS-7 cells were lysed for 30 s in 0.5% Triton X-100 in PHEM to remove excess soluble expressed protein and fixed for 20 min in 3% paraformaldehyde. The immunofluorescences were processed as described above using a polyclonal or monoclonal anti-c-myc antibody with a polyclonal anti-LIS1 antibody, the 210 monoclonal antibody, or the monoclonal anti-p150 antibody. For COS-7 cells transfected with CLIP- ΔRAC -DsRed, the immunofluorescence was processed with a monoclonal anti-EB1 antibody or the TA antibody.

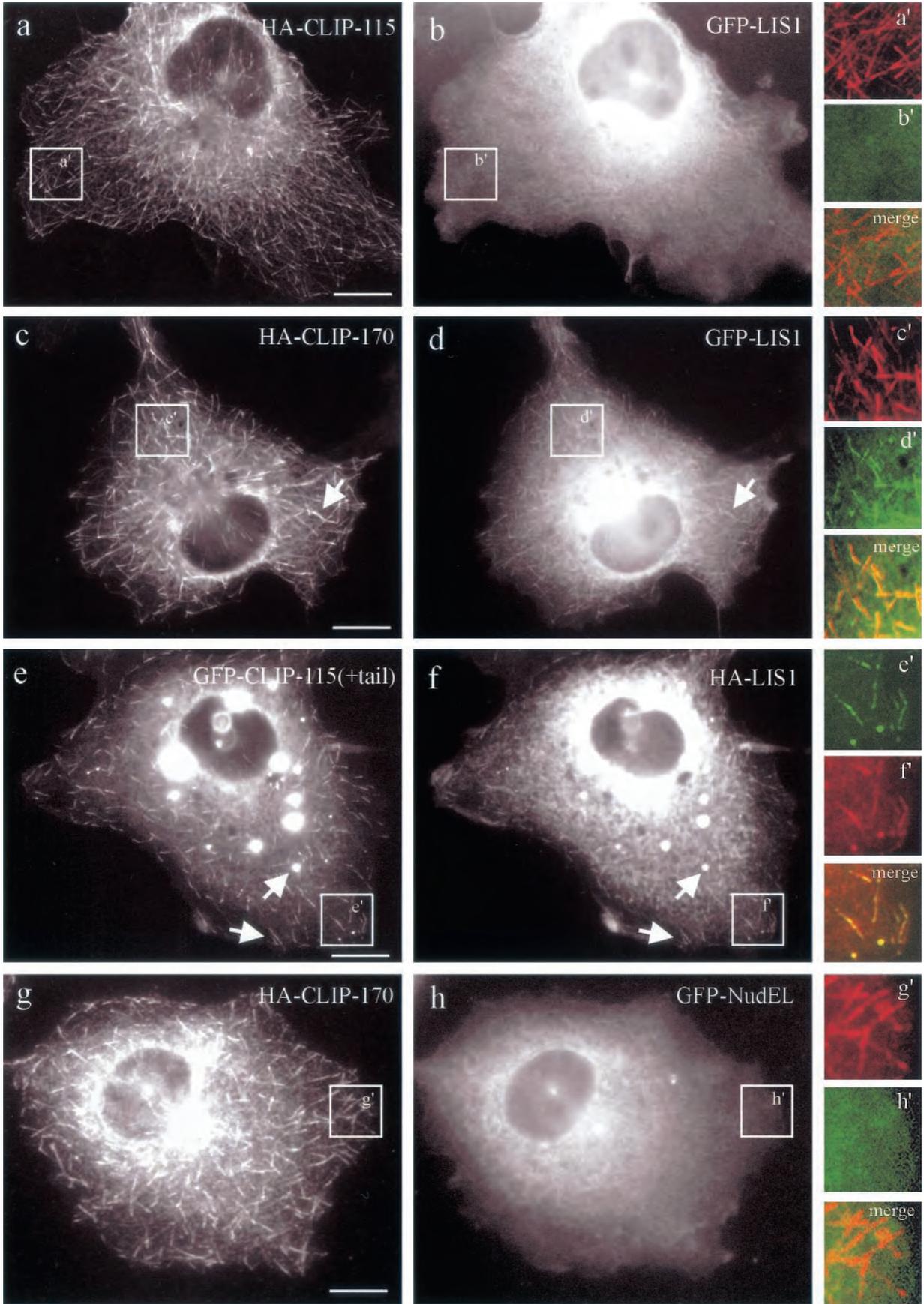
Wide-field optical sectioning fluorescence microscopy. Pictures of fixed cells were collected using a three-dimensional deconvolution imaging system, the detailed description and validation of which will be published elsewhere (J.-B. Sibarita and J. R. De Mey, unpublished data). A brief description has been published previously (61).

Protein methods. GST pull-down experiments with brain extracts and reticulocyte lysates were done as described previously (59). HeLa cells were extracted as described previously (15). For GST pull-down experiments, 100 μg of HeLa cells proteins and 10 μg of recombinant proteins on glutathione beads were used in a final volume of 500 μl . Beads were processed as described previously (59). Immunoprecipitations were done as described previously (13). Yeast two-hybrid assays were done according to the instructions of the manufacturer (Origene, Rockville, Md.).

Expression constructs. The mammalian expression vectors pEGFP-C (Clontech, Palo Alto, Calif.) were used to construct GFP-CLIP-115 and GFP-CLIP-170-br (32). These vectors were also used to construct GFP-CLIP-170(-tail), in which the last 79 amino acids of CLIP-170-br are deleted, and GFP-CLIP-115(+tail), which contains the C-terminal 159 amino acids of CLIP-170 linked in frame to CLIP-115 in front of its stop codon. GFP-LIS1 (mouse LIS1 cDNA was obtained by reverse transcription-PCR from total mouse brain RNA), GFP-NudC (mouse NudC cDNA is IMAGE clone 2646247 [accession number AW322862]), GFP-NudE (human NudE cDNA is IMAGE clone 2820974 [accession number AW249237]), and GFP-NudEL (mouse NudEL cDNA is IMAGE clone 2646029 [accession number AW322683]) were cloned by PCR into pEGFP vector. To generate HA-CLIP-115 and HA-CLIP-170-br fusions, the pMT2SM-HA vector was used; HA-LIS1 was produced by substituting GFP for the hemagglutinin (HA) tag in the corresponding fusion construct.

The plasmids encoding wild-type CLIP-170 and CLIP-170 $\Delta 55$ -346 (lacking the MT-binding regions) are referred to here as wt-CLIP-170 and ΔN -CLIP-170, respectively, and have been described elsewhere (50, 51). These fusion proteins have been tagged with a c-myc epitope at the N terminus. These cDNA constructs were a gift of T. Kreis and P. Pierre (University of Geneva, Geneva, Switzerland). The myc-tagged wt-CLIP-170 cDNA was inserted into the *EcoRI* site of the pSG5 vector. The expression of the fusion protein is under control of the simian virus 40 promoter. The C-terminal *XhoI/BamHI* fragment of CLIP-170 (corresponding to the last 156 amino acids) was inserted in the pBluescript

FIG. 5. CLIP-170, but not CLIP-115, recruits epitope-tagged LIS1 to MT distal ends. COS-1 cells were cotransfected with HA-CLIP-115 and GFP-LIS1 (a and b), HA-CLIP-170 and GFP-LIS1 (c and d), GFP-CLIP-115(+tail) and HA-LIS1 (e and f), and HA-CLIP-170 and GFP-NudEL (g and h). In the GFP-CLIP-115(+tail) construct, the zinc "knuckle"-containing domain of CLIP-170 was transferred to CLIP-115. LIS1, recruited to CLIP-positive structures, is indicated by arrows. Panels a' to h' represent colored enlargements of the areas indicated in panels a to h. The merged images of panels a' to h' demonstrate overlap (or the lack of it) at MT distal ends of the different tagged proteins. Bar, 10 μm .



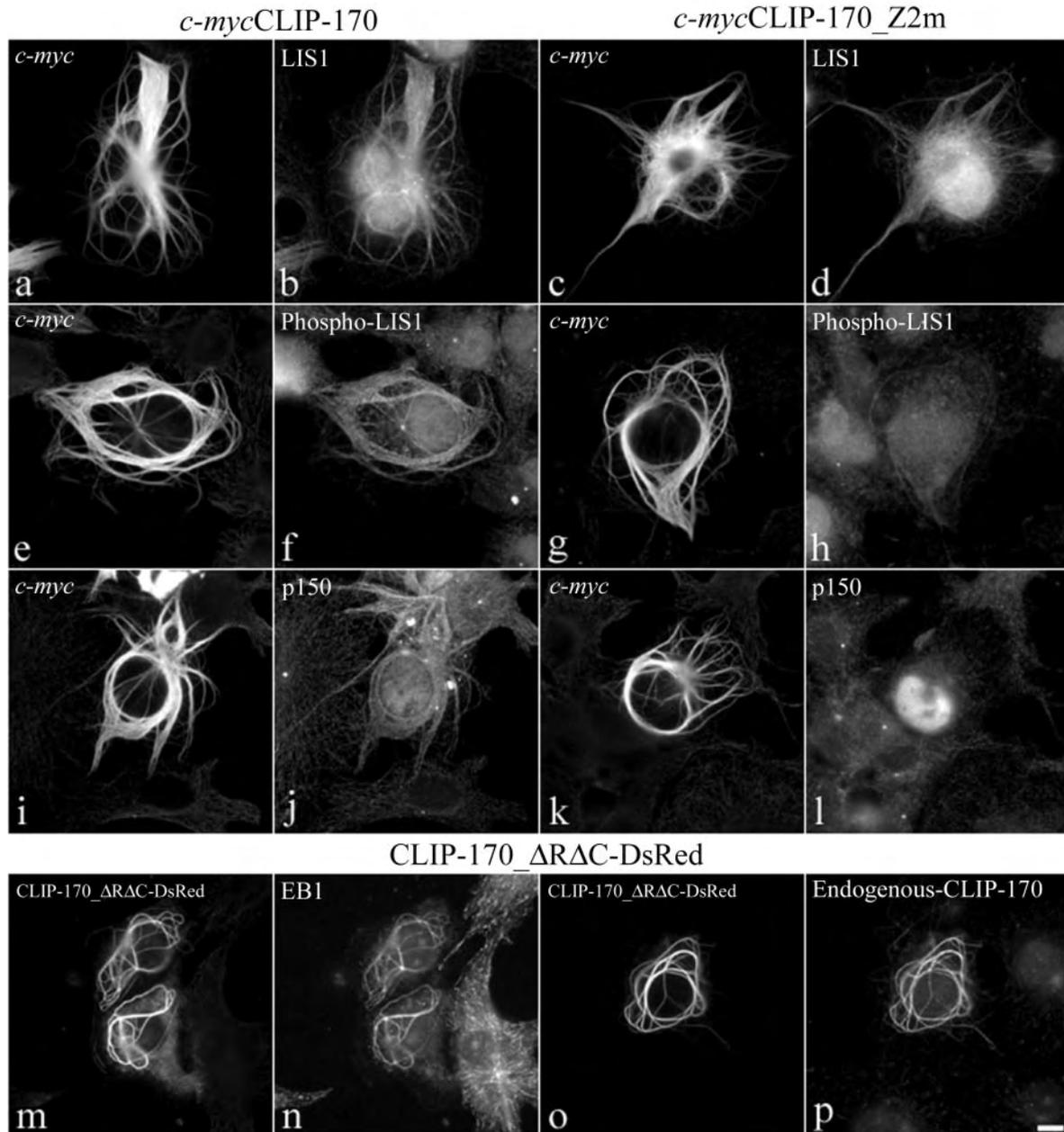


FIG. 6. Binding of a specific phospho-LIS1 isoform to CLIP-170-induced MT bundles is dependent on the second zinc finger domain of CLIP-170. COS-7 cells were transiently transfected with *c-myc*CLIP-170 (a, b, e, f, i, and j), with *c-myc*CLIP-170-Z2m (c, d, g, h, k, and l), or with CLIP- Δ RAC-DsRed (m, n, o, and p). The fixation was preceded by a brief extraction in Triton X-100. (a to d) The cells were double labeled with a polyclonal anti-*c-myc* antibody (a and c) and a polyclonal anti-LIS1 (b and d). (e to l) The cells are double labeled with the monoclonal anti-*c-myc* 9E10 antibody (e, g, i, and k) and the monoclonal anti-phospho-LIS1 210 antibody (f and h) or a monoclonal anti-p150 antibody (j and l). (m to o) The cells were labeled with a monoclonal anti-EB1 antibody (n) or the polyclonal antibody TA against the C-terminal portion of CLIP-170 (p). All of the CLIP-170 constructs give rise to the formation of thick MT bundles. LIS1 is always recruited to the bundles (b and d). A mutation in the second zinc finger domain (Z2m) diminishes the recruitment of a phospho-LIS1 isoform and p150 to the bundles (f and j versus h and l). Bar, 10 μ m.

II KS(-), pEGFPC3, pEG202 (with a modified multiple cloning site [MCS]), and pJG4-5 (with a modified MCS) vectors in phase with the GFP (Clontech) and LEXA and AD (Origene) genes, respectively. These constructs were named, respectively, pBS-Cter, pEGFP-Cter, pEG202-Cter, and pJG4-5-Cter. pBS-Cter was digested with *Xho*I and *Not*I enzymes, and the resulting *Xho*I/*Not*I fragment was inserted in pGEX4T3 at the *Sal*I and *Not*I sites to give pGEX-Cter. A C-terminal fragment corresponding to the last 64 amino acids of the CLIP-170 was generated by PCR using Δ N-CLIP170 as a template and the primers 5'T

CAAGCTCGAGCCTCGCCTCTTCTGTGACATT-3' and 5'AGATCTGGATCCGAATCCCTAGTCTGTATGT3'. This fragment was inserted in the pEGFPC3, pEG202 (with a modified MCS), and pJG4-5 (with a modified MCS) vectors to give pEGFP-Z1 + 2, pEG202-Z1 + 2, and pJG4-5-Z1 + 2.

Fusion proteins lacking the C-terminal 20 amino acids of CLIP-170 were generated as follows. Δ N-CLIP170 was used as a template to amplify by PCR the cDNA sequence of CLIP-170 and introduce a stop codon and a *Bam*HI restriction site by using the primers 5'-CTGAGAAATGAGGTCACAGT-3' and 5'T

ATTAGATCCTTAGTATGGGCGTTCCTCACC-3'. The PCR product was digested with *XhoI* and *BamHI* enzymes and was exchanged with the *XhoI/BamHI* fragment of pSG5-wt-CLIP-170, pSG5- Δ N-CLIP-170, pEGFP-C3, pEG202 (modified MCS), pJG4-5 (modified MCS), and pBluescript II KS(-). These constructs were named, respectively, Δ C2, Δ N Δ C2, pEGFP- Δ C2, pEG202- Δ C2, pJG4-5- Δ C2, and pBS- Δ C2. The pBluescript vector containing the *XhoI/BamHI* PCR product was digested with *XhoI* and *NotI*, and the resulting *XhoI/NotI* fragment was inserted in pGEX4T3 at the *SalI* and *NotI* sites to give pGEX- Δ C2.

Fusion proteins lacking the C-terminal 14 and 6 amino acids were generated as described above using the primers 5'TATTAGGATCCTTACATCTCACAG ATTTTCACAGTATGG-3' and 5'TATTAGGATCCTTAGCAGTTGGTGGCC CAGTGTCC-3' to introduce the modifications. They were named, respectively, Δ C3, Δ N Δ C3, pEGFP- Δ C3, pEG202- Δ C3, pJG4-5- Δ C3, pBS- Δ C3, pGEX- Δ C3, Δ C4, Δ N Δ C4, pEGFP- Δ C4, pBS- Δ C4, and pGEX- Δ C4.

Fusion proteins with mutations C1333M and C1336M (mutations in the first zinc finger motif) were generated using the Quick Change Kit (Stratagene, La Jolla, Calif.). The C-terminal *XhoI/BamHI* fragment of CLIP-170 cDNA subcloned in pBluescript KS(-) was used as a template with the primers 5'TGGA GATCAAAGCAGTCCATAATGTCCATGAAGAGGCGAGGTTTCTT-3' and 5'AAGAAACCTCGCCTCTTCATGGACATTATGGACTGCTTTGATCTCC A-3'. The mutated *XhoI/BamHI* fragment was exchanged with that of pSG5-wt-CLIP-170 and was inserted in pEGFP-C3, pEG202 (modified MCS), and pJG4-5 (modified MCS) to give Z1m, pEGFP-C3-Z1m, pEG202-Z1m, and pJG4-5-Z1m, respectively. The pBluescript vector containing the *XhoI/BamHI* mutated fragment was digested with *XhoI* and *NotI*, and the resulting *XhoI/NotI* fragment was inserted in pGEX4T3 at the *SalI* and *NotI* sites. The resulting construct was named pGEX-Z1m.

Fusion proteins with mutations C1373M and C1376M (mutations in the second zinc finger motif) were generated as described above using the primers 5'GGTGA GGAACGCCATACATGGAAATCATGGAGATGTTGGACAC-3' and 5'-G TGTCAAACATCTCCATGATTTCATGTATGGGCGTTCCTCACC-3'. The resulting constructs were named, respectively, Z2m, pEGFP-C3-Z2m, pEG202-Z2m, pJG4-5-Z2m, and pGEX-Z2m.

Fusion proteins with mutations C1333M, C1336M, C1373M, and C1376 M (mutations in the two zinc finger motifs) were generated as described above using the mutated C1333M and C1336M C-terminal *XhoI/BamHI* fragment of CLIP-170 cDNA subcloned in pBluescript II KS(-) as a template with the primers 5'GGTGA AGGAACGCCATACATGGAAATCATGGAGATGTTGGACAC-3' and 5'-GTGTCCAAACATCTCCATGATTTCATGTATGGGCGTTCCTCACC-3'. The resulting constructs were named, respectively, dblZm, pEGFP-C3-dblZm, pEG202-dblZm, pJG4-5-dblZm, and pGEX-dblZm.

A fusion protein corresponding to the first 361 amino acids of c-mycCLIP-170 was generated as follows. The DsRed gene was subcloned in the pVNC7 vector (modified from pVM116 [35]) at the *BamHI* and *NotI* sites to give pVNC7-DsRed. The *EcoRI/BglII* fragment of CLIP-170 was inserted into the *EcoRI* and *BglII* sites of pVNC7-DsRed. This construct was digested with *BglII* and *AgeI* enzymes and treated with Klenow polymerase. The final construct was named CLIP- Δ R Δ C-DsRed.

All PCR-amplified sequences and all translation phases of the fusion proteins have been verified by sequencing.

The expression vector pDsRed-FLAG-LIS1 was generated by site-directed mutagenesis of the stop codon, introducing an *NcoI* site, this was cloned in frame with a FLAG epitope and then into pDsRed (Clontech). Point mutations were generated using the Quick Change protocol (Stratagene). The LIS1 yeast two-hybrid construct was described previously (67).

RESULTS

Colocalization of LIS1 and CLIP-170 at MT-dependent and -independent sites. Published data indicate that LIS1 and CLIP-170 may each colocalize at sites also known to accumulate the dynein/dynactin complex (10, 18, 23, 77). In order to assess this, we used mainly HeLa cells, but comparable results were obtained in COS-7 and MDCK cells (not shown). During mitosis, colocalization of LIS1 and CLIP-170 was seen at the nuclear envelopes of prophase cells (Fig. 1a to d). In early prometaphase cells, colocalization was observed at unattached kinetochores (Fig. 1e to h). The position of the kinetochores is marked by the autoimmune CREST serum (Fig. 1h and l). The

proteins localize to kinetochores in dots that are adjacent to CREST but do not completely overlap, since anti-CREST autoimmune serum labels the centromeres (19, 20, 41) while CLIP-170 and dynein localize to the fibrous corona (18; reviewed in reference 41). In early prometaphase cells, LIS1 and CLIP-170 also colocalize at the tips of astral MTs (Fig. 1e to h) but also at the cell cortex, where sites accumulating LIS1 and CLIP-170 can be seen (Fig. 1i to l). At all of these sites, dynactin and dynein were detected (not shown). We described earlier such cortical sites accumulating dynein and dynactin in polarized MDCK cells (10). In view of their restricted topology (the belt of adherens junctions, just beneath the tight junctions) and the fact that they interact with astral MTs, we have proposed that these cortical sites play a role in spindle positioning and movements. This is the first demonstration of colocalization of LIS1 and CLIP-170 in these structures. LIS1 was shown to interact with MTs before (58, 70), but it was never seen at MT tips in interphase cells. Since some of the results described below pointed to the possibility of LIS1 binding to MT tips in a CLIP-170-dependent way, we expressed a LIS1-FLAG-DsRed-tagged form and studied its colocalization with CLIP-170. We first ascertained that this form was distributed in a manner similar to all of the known localizations of LIS1, and we also observed that under the conditions used here, it did not cause aberrant mitosis (data not shown), as described by others (23). In interphase cells, LIS1-FLAG-DsRed colocalized with endogenous CLIP-170 at MT plus ends, even in cells expressing very moderate levels (Fig. 1m to o). LIS1 was also distributed as a series of linearly arranged spots, in agreement with the usual immunostaining along MTs (58). We conclude that in mammalian cells too, LIS1 is associated with growing MT plus ends. This localization pattern resembles the dynein labeling at MT tips (77) and is consistent with LIS1 being attached to dynein (23, 60, 70). These results are also consistent with the possibility that LIS1 is being attached to any of a variety of other proteins such as dynactin or EB1; however, at present we do not have evidence supporting these possibilities. The colocalization of CLIP-170 and LIS1 prompted us to investigate further the potential physical interactions between LIS1 and CLIP-170.

Physical interactions and mapping of interaction domains.

Several assays allowed us to demonstrate an interaction between LIS1 and CLIP-170 and also to map the domains of interaction in both proteins. The yeast two-hybrid system (28) revealed LIS1 interaction with the C-terminal domain of CLIP-170 (Cter in Fig. 2e). A point mutation in the first zinc domain (Z1m in Fig. 2e) weakened the interaction as measured by a liquid β -galactosidase assay (Fig. 2a). A pull-down experiment using the purified recombinant proteins GST-Cter and 6-His-LIS1 demonstrated a direct interaction without the presence of other cellular proteins (Fig. 2d). Several deletions and mutations (C2, C3, and Z2m in Fig. 2e) abolished the interaction. Mapping of the precise interacting domain in CLIP-170 was done using GST pull-down assays with in vitro-translated LIS1 in a reticulocyte lysate extract or endogenous LIS1 from brain or HeLa cell extract (Fig. 2f). The distal zinc finger domain of CLIP-170 was shown to be necessary for LIS1 binding. Deletion of part or all of this domain (C2 and C3) (Fig. 2f) and point mutations in the second or both zinc finger motifs abolished the interaction. However, deleting the last six

amino acids that are not part of the zinc finger (C4) (Fig. 2f) did not affect LIS1 binding. Consistent with the results obtained in the yeast two-hybrid experiments, point mutations in the first zinc finger (Z1m) did not disrupt the interaction. Mapping of the interaction domain in LIS1 indicated that the full-length protein is most efficient in binding CLIP-170; nevertheless, WD5, -6, and -7, in reducing order of importance, play a role in the interaction (Fig. 2b and c). In vivo experiments also support an interaction between LIS1 and CLIP-170, as these proteins can be coimmunoprecipitated from LIS1-FLAG-DsRed-transfected cells (Fig. 2g) and from mouse embryonic brain extract (Fig. 2h). We could coprecipitate the dynein intermediate chain by using anti-FLAG antibodies from LIS1-FLAG-DsRed-transfected cells (Fig. 2g). However, dynein intermediate chain was not immunoprecipitated with anti-CLIP-170 antibodies (data not shown).

LIS1 and CLIP-170 at kinetochores. To unravel the functional importance of the LIS1–CLIP-170 interaction we have carefully examined kinetochores, where both proteins colocalize at the fibrous corona.

(i) LIS1 recruitment to kinetochores is dynein/dynactin dependent. Disruption of the dynein/dynactin protein complex by overexpression of the dynactin subunit p50 causes dissociation of cytoplasmic dynein (9, 21) and CLIP-170 (18) from prometaphase kinetochores. We demonstrate here that overexpression of p50 also results in a significant reduction of LIS1 kinetochore localization (Fig. 3g versus c and o versus k), similar to the reduction in the dynactin subunit p150 (Fig. 3f versus b) and CLIP-170 (Fig. 3n versus j). We conclude that LIS1 targeting to kinetochores is dependent upon the dynein/dynactin complex.

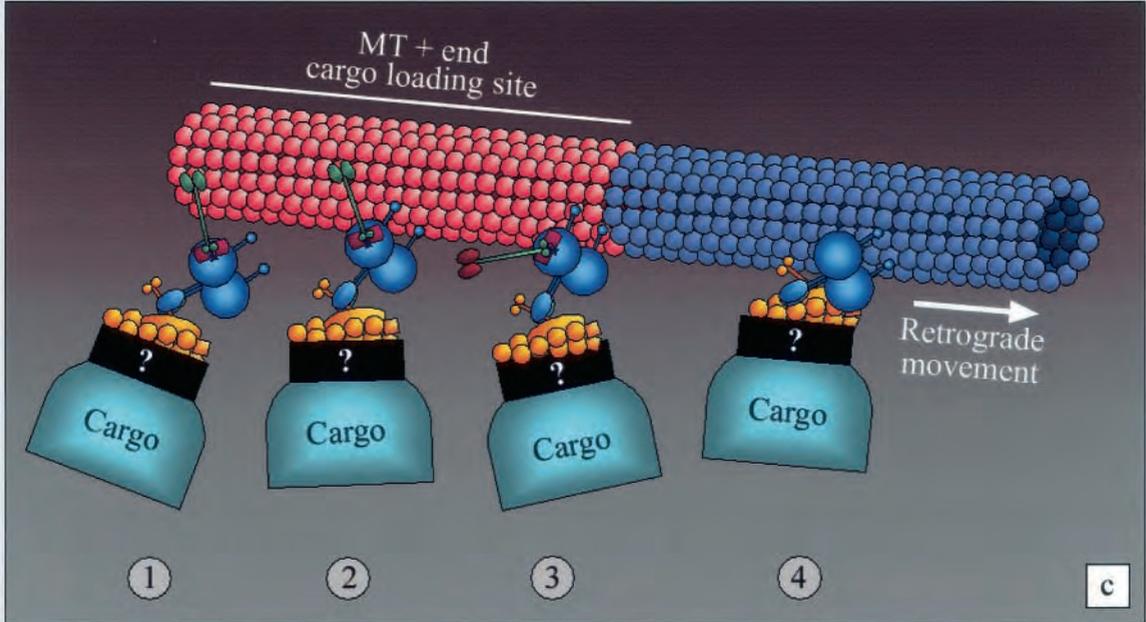
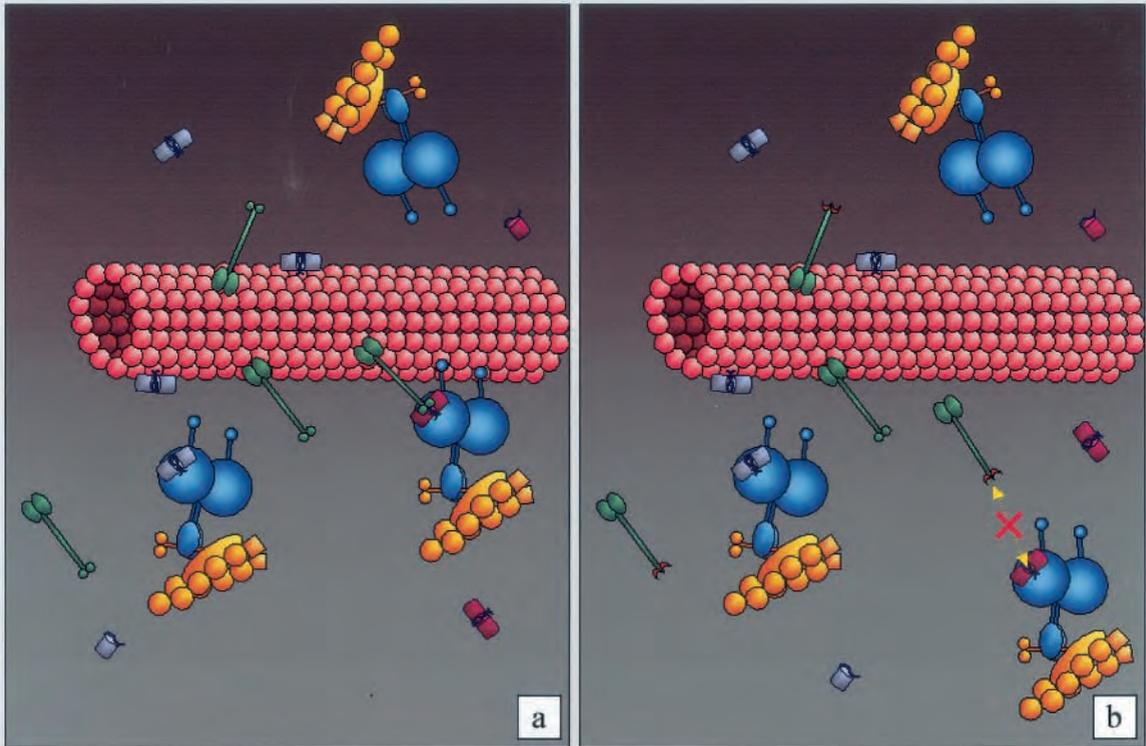
(ii) Recruitment of CLIP-170 at kinetochores depends on its LIS1-interacting domain. A GFP-tagged wild-type C-terminal fragment of CLIP-170 localizes to kinetochores (Fig. 4a to d), but deletion of the second zinc finger results in a diffuse GFP signal (Fig. 4e to h). Mutations in the first zinc finger motif reduce the CLIP-170 kinetochore signal significantly (data not shown), thus mirroring our results with yeast two-hybrid assays. Nevertheless, expression of the two zinc finger domains by themselves (Z1 + 2) is sufficient to successfully target CLIP-170 to the kinetochores (Fig. 4i to l). We cannot exclude the possibility that the second zinc finger domain interacts directly with additional proteins located at the kinetochore; however, our interpretation is based on the available data. We conclude that the LIS1 binding domain is necessary and sufficient for the recruitment of CLIP-170 to kinetochores.

Recruitment of LIS1 to MT ends in interphase cells over-

expressing CLIP-170. Overexpression of LIS1 has been shown to abolish dynactin accumulation at the MT plus ends (23). We wanted to test if overexpression of CLIP-170 or its closest mammalian homolog, CLIP-115, can influence the MT plus-end targeting of LIS1 and other proteins (NudE, NudEL, and NudC) which are implicated in the dynein/dynactin pathway as well (47, 63, 76). Overexpression of HA-CLIP-170 induced accumulation of coexpressed GFP-tagged LIS1 at the tips of MTs (Fig. 5c and d). This was not the case when HA-CLIP-115 was instead expressed at medium overexpression levels (Fig. 5a and b), suggesting that its MT binding and coiled-coil domains are not interacting with LIS1. Based on these observations, a chimeric protein consisting of GFP-CLIP-115 and the C terminus of CLIP-170 [GFP-CLIP-115(+tail)] was tested. At low levels of expression, GFP-CLIP-115(+tail) is present at MT plus ends, and at higher levels it accumulates in patchy (data not shown) or spherical (Fig. 5e) aggregates, which also recruit HA-tagged LIS1 (Fig. 5f). This demonstrates that the last 159 amino acids of CLIP-170, which include the two zinc finger motifs, are sufficient to relocate LIS1. GFP fusion proteins of NudE, NudEL, and NudC were not recruited to MTs by any of the CLIPs (either in double transfections with HA-CLIP fusions or in triple transfections with an untagged CLIP and an HA-LIS1-expressing construct) (Fig. 5g and h and data not shown). In addition, none of the NudE/EL/C constructs had an apparent influence on the localization of dynactin to MT tips (data not shown). We conclude that the LIS1-associated proteins NudE, NudEL, and NudC are not involved in CLIP-170-mediated recruitment of LIS1 to MT plus ends.

A phospho-LIS1 isoform binds to MT bundles in interphase cells in a CLIP-170-dependent way. Cells transfected with CLIP-170 constructs containing the MT binding domains form dense MT bundles (50) (Fig. 6a, c, e, g, i, and k). These bundles are formed also when CLIP-170 lacks the coiled-coil dimerization domain (CLIP-170- Δ RAC) (Fig. 6m and o). LIS1 is recruited to these bundles (Fig. 6b) also when the second zinc finger motif of CLIP-170 is mutated (Fig. 6d), or when the bundles are induced by monomeric CLIP-170- Δ RAC (data not shown). However, the second zinc finger appears to be crucial in the recruitment of a phospho-LIS1 isoform that is specifically detected by the monoclonal anti-LIS1 antiserum, clone 210 (57). Mutations in the distal zinc finger motif of CLIP-170 reduced the recruitment of this phospho-LIS1 isoform to the bundles (Fig. 6f versus h). Interestingly, the dynactin subunit p150 also is not recruited to the MT bundles formed by CLIP-170-Z2m (Fig. 6l versus h) or by CLIP-170- Δ RAC (data not shown). On the other hand, both EB1 and endogenous CLIP-

FIG. 7. A model of LIS1 mediating CLIP-170 interactions with the dynein/dynactin pathway. (a) LIS1 can bind to MT bundles; however, phospho-LIS1 (recognized by the 210 antibody) binding to MT bundles is mediated through the distal zinc finger motif of CLIP-170. (b) When the distal zinc finger motif of CLIP-170 is mutated, the phospho-LIS1 isoform can no longer bind to MT bundles. This can also explain why p150/dynactin is not recruited to the MT bundles. (c) Possible kinetics of the interactions. CLIP-170 targets the dynein/dynactin complex to the MT, using phospho-LIS1 as an adapter (step 1); the motor complex, being in the proximity of the MT, associates with it (step 2); the initial static link to the MT provided by CLIP-170 is released by its hyperphosphorylation (step 3); and the retrograde dynein/dynactin-dependent movement of the cargo (endocytic vesicle, kinetochore, etc.) takes place (step 4). Tip1p, the CLIP-170 ortholog in *S. pombe*, has been reported by Brunner and Nurse (8) to act as an anticatastrophe factor. Based on the model depicted here, it also could be that CLIP-170 plays a similar role in eukaryotic cells by targeting MT-stabilizing factors as cargo to the plus tips. The model is based on that of Rickard and Kreis (54; reviewed in references 1a, 54a, and 75).



Legend:

-  Microtubule
-  CLIP-170, hypophosphorylated
-  CLIP-170, hyperphosphorylated
-  CLIP-170, Z2m
-  Dynactin complex
-  Dynein complex
-  LIS1, non phosphorylated
-  LIS1, phosphorylated (210 epitope)

170 are recruited to the MT bundles induced by all of the MT-binding CLIP-170 forms tested (shown here is CLIP-170- Δ RAC-DsRed [Fig. 6o and p]). Taken together, these results suggest that LIS1 targeting to specific intracellular structures is regulated both by phosphorylation and by CLIP-170. These results are supported by our previous observations that another monoclonal antibody, clone 338, and clone 210 recognize distinct, but not all, phospho-epitopes of LIS1 (reference 57 and data not shown), suggesting that LIS1 exists in the cell as several pools that are differentially regulated.

DISCUSSION

Orchestrating cellular functions requires modular and dynamic interactions between proteins. Our data indicate a direct physical interaction between LIS1 and CLIP-170 *in vitro*; *in vivo* the two proteins are found in the same complex in embryonic brain and coimmunoprecipitate. GST pull-down assays and yeast two-hybrid experiments demonstrated that the CLIP-170 second zinc finger is necessary for this interaction. Overexpressed GFP-LIS1 is recruited by epitope-tagged CLIP-170 to MT tips during interphase. The experiments indicated clearly that the MT binding domains and the coiled-coil region are not mediating the interaction between CLIP-170 and LIS1, since CLIP-115 does not relocalize LIS1 to MT tips in the absence of the CLIP-170 zinc finger motifs. Yeast two-hybrid results and kinetochore targeting indicated that point mutations in the first zinc finger domain reduce the strength of interaction, suggesting a functional role for this domain as well. The regulatory role of the first zinc finger domain most likely developed during evolution, since budding and fission yeasts contain only one zinc finger domain (4, 8, 51). Within LIS1, the WD 5, -6, and -7 domains contribute to the interaction; however, it is clear that the protein as a whole interacts with CLIP-170 much better than its subdomains. Furthermore, our results suggest that specific LIS1 phosphorylation might be an *in vivo* mode of regulating its interaction with CLIP-170. Our previous results indeed indicated that LIS1 exists in the cell as several pools that are differentially regulated on several phosphorylation sites, some of which are recognized by different monoclonal antibodies (57). Endogenous LIS1 molecules bind to MTs along their length in a CLIP-170-independent manner, and therefore, the same can be assumed to hold for the LIS1 pool recognized on these bundles by our affinity-purified polyclonal antibodies. The phospho-LIS1 isoform recognized by clone 210 (57) is strongly recruited to kinetochores (not shown), and interestingly, its recruitment to MT bundles induced by overexpressed MT-binding forms of CLIP-170 is dependent on CLIP-170's distal zinc finger. Our proposed model in Fig. 7 illustrates our assumptions.

One important cellular colocalization of LIS1 and CLIP-170 is at the kinetochores, probably the best-characterized structure tethering MTs. The dynein/dynactin motor complex is present at unattached kinetochores (75), and proteins like CLIP-170 and LIS1 are thought to contribute to its functioning, in yet-unresolved ways (18, 23). The recruitment of dynein/dynactin/LIS1/CLIP-170 to the kinetochores is not dependent upon MTs, as following nocodazole treatment these proteins still accumulate at these sites (18, 30, 72; this study). In this work we demonstrate a hierarchy of interactions at the kinetochore.

The initial targeting of LIS1 to kinetochores is dynein/dynactin dependent, since overexpression of p50 results in reduction of LIS1 at these sites. Recruitment of CLIP-170 to kinetochores appears to be LIS1 dependent, since deletions or mutations in its LIS1 binding domain abolish CLIP-170 kinetochore targeting. The CLIP-170 MT binding domains play a role in chromosome congression to the equatorial plate (18). We propose that the recruitment of CLIP-170 to kinetochores via LIS1/dynein/dynactin is an important step in this process and facilitates the initial coupling of kinetochores to MTs prior to their first poleward movement.

We show here that CLIP-170 and LIS1 also colocalize at cortical sites which capture astral MTs. This further illustrates the analogy between kinetochores and the cortical sites (34). It may be hypothesized that LIS1 is involved there in MT capturing since its over- or underexpression perturbs spindle positioning in both *D. melanogaster* oogenesis and early embryos (40) and in mammalian epithelial cells (23). The regulated physical link with CLIP-170 that we report here may be involved in the molecular mechanism for tethering MTs to positional cortical cues.

Another new finding is that in interphase mammalian cells, LIS1 colocalizes with CLIP-170 at the tips of polymerizing MTs. Dynein/dynactin, which is known to regulate MT dynamics, also associates with MT tips (77). This motor complex could function via a highly regulated linker function of LIS1 connecting it to CLIP-170, but our data and those of others (74) do not yet provide direct evidence that this is indeed the case.

Overall, LIS1 phosphorylation may affect its binding to MTs, as previously suggested (57). It is likely that several phosphorylation sites regulate LIS1 activity, its cellular localization, and its binding to other interacting proteins. The monoclonal antibody 210 has provided us with unique opportunities to investigate this question. A hierarchy of interactions was exemplified by examining the MT bundles induced by CLIP-170 mutated in the distal zinc finger domain or lacking the coiled-coil and C-terminal domains, where no specific phospho-LIS1 isoform accumulated. On these bundles we detected EB1 and endogenous CLIP-170; however, p150 was not recruited there. This result is interesting in view of the finding that EB1 can associate with p150, the intermediate chain of cytoplasmic dynein, and with dynamitin (p50) (5). None of the interactions demonstrated were necessarily direct; nevertheless, within the context of these MT bundles, our results suggest that EB1 and LIS1 interact directly with MTs. The specific phospho-LIS1 isoform, however, is recruited to the bundles only via CLIP-170, and we suggest that p150 is recruited to the bundles via this phospho-LIS1 form, probably mediated by dynein. This somewhat resembles the dynactin interaction with the kinesin-related motor HsEg5, which is regulated by phosphorylation (6). In addition, very similar to the case for LIS1 and CLIP-170, the interaction of the cytoplasmic dynein intermediate chain with dynactin is regulated by serine 84 phosphorylation (78). The dynein intermediate chain is also a WD repeat protein, similar to LIS1, and contains a phosphorylation site within its N-terminal region following a coiled-coil domain (78). It is amazing to reveal such a similar pattern of regulation of interaction by phosphorylation of residues within the same protein module. This work suggests that LIS1 is a phosphorylation-

dependent linker between CLIP-170 and cytoplasmic dynein at sites involved in positional cue-MT tethering and/or in control of MT dynamics.

ACKNOWLEDGMENTS

The first two authors contributed equally to this work.

We thank Anne Moreau for technical assistance. Jean-Baptiste Sibarita is acknowledged for his expertise with image deconvolution.

This work was supported in part by the Fritz Thyssen Stiftung Foundation, HFSP grant no. RG283199 9, March of Dimes grant no. 6-FY01-5, and the Minerva Foundation (to O.R.) and by the Association pour la Recherche contre le Cancer (Villejuif, France) (to J.R.D.M.). O.R. is an Incumbent of the Aser Rothstein Career Development Chair in Genetic Diseases.

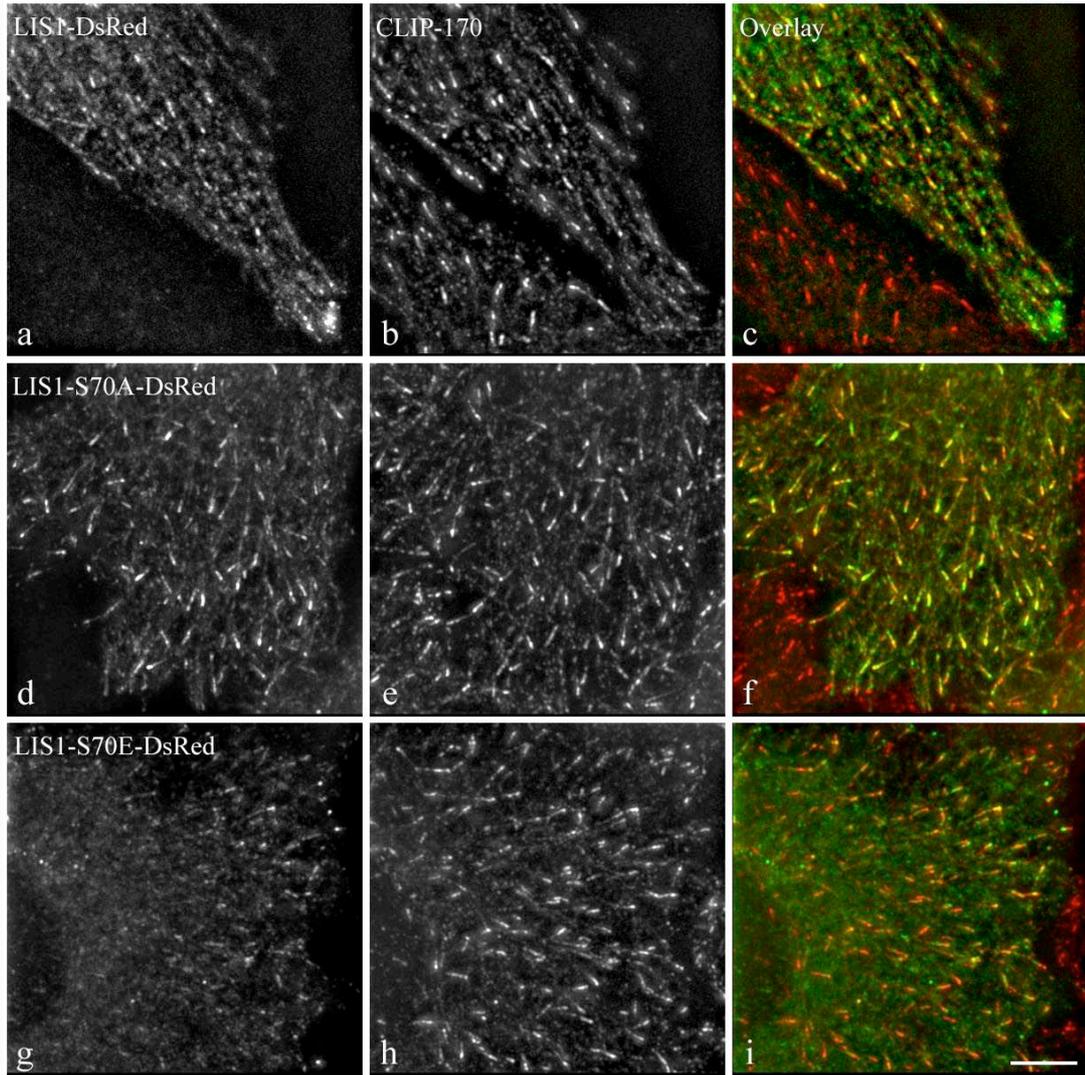
REFERENCES

- Akhmanova, A., C. C. Hoogenraad, K. Drabek, T. Stepanova, B. Dortmund, T. Verkerk, W. Vermeulen, B. M. Burgering, C. I. De Zeeuw, F. Grosveld, and N. Galjart. 2001. Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell* **104**:923–935.
- Allan, V. 1996. Motor proteins: a dynamic duo. *Curr. Biol.* **6**:630–633.
- Banks, J. D., and R. Heald. 2001. Chromosome movement: dynein-out at the kinetochore. *Curr. Biol.* **11**:R128–R31.
- Beckwith, S. M., C. H. Roghi, B. Liu, and N. Ronald Morris. 1998. The “8-kD” cytoplasmic dynein light chain is required for nuclear migration and for dynein heavy chain localization in *Aspergillus nidulans*. *J. Cell Biol.* **143**:1239–1247.
- Berlin, V., C. A. Styles, and G. R. Fink. 1990. BIK1, a protein required for microtubule function during mating and mitosis in *Saccharomyces cerevisiae*, colocalizes with tubulin. *J. Cell Biol.* **111**:2573–2586.
- Berrueta, L., J. S. Tirnauer, S. C. Schuyler, D. Pellman, and B. E. Bierer. 1999. The APC-associated protein EB1 associates with components of the dynein complex and cytoplasmic dynein intermediate chain. *Curr. Biol.* **9**:425–428.
- Blangy, A., L. Arnaud, and E. A. Nigg. 1997. Phosphorylation by p34cdc2 protein kinase regulates binding of the kinesin-related motor HsEg5 to the dynein subunit p150. *J. Biol. Chem.* **272**:19418–19424.
- Bloom, K. 2001. Nuclear migration: cortical anchors for cytoplasmic dynein. *Curr. Biol.* **11**:326–329.
- Brunner, D., and P. Nurse. 2000. CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell* **102**:695–704.
- Burkhardt, J. K., C. J. Echeverri, T. Nilsson, and R. B. Vallee. 1997. Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynein complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *J. Cell Biol.* **139**:469–484.
- Busson, S., D. Dujardin, A. Moreau, J. Dompierre, and J. R. De Mey. 1998. Dynein and dynactin are localized to astral microtubules and at cortical sites in mitotic epithelial cells. *Curr. Biol.* **8**:541–544.
- Cahana, A., T. Escamez, R. S. Nowakowski, N. L. Hayes, M. Giacobini, A. von Holst, O. Shmueli, T. Sapir, S. K. McConnell, W. Wurst, S. Martinez, and O. Reiner. 2001. Targeted mutagenesis of Lis1 disrupts cortical development and LIS1 homodimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:6429–6434.
- Carminati, J. L., and T. Stearns. 1997. Microtubules orient the mitotic spindle in yeast through dynein-dependent interactions with the cell cortex. *J. Cell Biol.* **138**:629–641.
- Caspi, M., R. Atlas, A. Kantor, T. Sapir, and O. Reiner. 2000. Interaction between LIS1 and doublecortin, two lissencephaly gene products. *Hum. Mol. Genet.* **9**:2205–2213.
- Chenn, A., J. E. Braisted, S. K. McConnell, and D. D. M. O’Leary. 1997. Development of the cerebral cortex: mechanisms controlling cell fate, laminar and areal patterning, and axonal connectivity, p. 440–473. *In* W. M. Cowan, T. M. Jessell, and S. L. Zipursky (ed.), *Molecular and cellular approaches to neural development*. Oxford University Press, New York, N.Y.
- Clark, I. B., and D. I. Meyer. 1999. Overexpression of normal and mutant Arp1alpha (centractin) differentially affects microtubule organization during mitosis and interphase. *J. Cell Sci.* **112**:3507–3518.
- De Zeeuw, C. L., C. C. Hoogenraad, E. Goedknegt, E. Hertzberg, A. Neubauer, F. Grosveld, and N. Galjart. 1997. CLIP-115, a novel brain-specific cytoplasmic linker protein, mediates the localization of dendritic lamellar bodies. *Neuron* **19**:1187–1199.
- Diamantopoulos, G. S., F. Perez, H. V. Goodson, G. Batelier, R. Melki, T. E. Kreis, and J. E. Rickard. 1999. Dynamic localization of CLIP-170 to microtubule plus ends is coupled to microtubule assembly. *J. Cell Biol.* **144**:99–112.
- Dujardin, D., U. I. Wacker, A. Moreau, T. A. Schroer, J. E. Rickard, and J. R. De Mey. 1998. Evidence for a role of CLIP-170 in the establishment of metaphase chromosome alignment. *J. Cell Biol.* **141**:849–862.
- Earnshaw, W. C., H. Ratrie III, and G. Stetten. 1989. Visualization of centromere proteins CENP-B and CENP-C on a stable dicentric chromosome in cytological spreads. *Chromosoma* **98**:1–12.
- Earnshaw, W. C., and N. Rothfield. 1985. Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma* **91**:313–321.
- Echeverri, C. J., B. M. Paschal, K. T. Vaughan, and R. B. Vallee. 1996. Molecular characterization of the 50-kD subunit of dynactin reveals function for the complex in chromosome alignment and spindle organization during mitosis. *J. Cell Biol.* **132**:617–633.
- Evan, G. I., G. K. Lewis, G. Ramsay, and J. M. Bishop. 1985. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol. Cell. Biol.* **5**:3610–3616.
- Faulkner, N. E., D. L. Dujardin, C. Y. Tai, K. T. Vaughan, C. B. O’Connell, Y. Wang, and R. B. Vallee. 2000. A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nat. Cell Biol.* **2**:784–791.
- Fujiwara, T., K. Tanaka, E. Inoue, M. Kikyo, and Y. Takai. 1999. Bni1p regulates microtubule-dependent nuclear migration through the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19**:8016–8027.
- Geiser, J. R., E. J. Schott, T. J. Kingsbury, N. B. Cole, L. J. Totis, G. Bhattacharyya, L. He, and M. A. Hoyt. 1997. *Saccharomyces cerevisiae* genes required in the absence of the CIN8-encoded spindle motor act in functionally diverse mitotic pathways. *Mol. Biol. Cell* **8**:1035–1050.
- Goode, B. L., D. G. Drubin, and G. Barnes. 2000. Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**:63–71.
- Gripovic, L., J. M. Volosky, and T. C. Keller III. 1998. Cloning and expression of chicken CLIP-170 and restin isoforms. *Gene* **206**:195–208.
- Gyuris, J., E. Golemis, H. Chertkov, and R. Brent. 1993. Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* **75**:791–803.
- Han, G., B. Liu, J. Zhang, W. Zuo, N. R. Morris, and X. Xiang. 2001. The *Aspergillus* cytoplasmic dynein heavy chain and NUDF localize to microtubule ends and affect microtubule dynamics. *Curr. Biol.* **11**:1–20.
- Hoffman, D. B., C. G. Pearson, T. J. Yen, B. J. Howell, and E. D. Salmon. 2001. Microtubule-dependent changes in assembly of microtubule motor proteins and mitotic spindle checkpoint proteins at ptk1 kinetochores. *Mol. Biol. Cell* **12**:1995–2009.
- Hoffmann, B., W. Zuo, A. Liu, and N. R. Morris. 2001. The LIS1 related protein NUDF of *Aspergillus nidulans* and its interaction partner NUDE bind directly to specific subunits of dynein and dynactin and to α - and γ -tubulin. *J. Biol. Chem.* **16**:16.
- Hoogenraad, C. C., A. Akhmanova, F. Grosveld, C. I. De Zeeuw, and N. Galjart. 2000. Functional analysis of CLIP-115 and its binding to microtubules. *J. Cell Sci.* **113**:2285–2297.
- Hyman, A. 1989. Centrosome movement in the early divisions of *Caenorhabditis elegans*: a cortical site determining centrosome position. *J. Cell Biol.* **109**:1185–1193.
- Kirschner, M., and T. Mitchison. 1986. Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell* **45**:329–342.
- Klempner, K. H., H. Arnold, and H. Biedenkapp. 1989. Activation of transcription by v-myb: evidence for two different mechanisms. *Genes Dev.* **3**:1582–1589.
- Langanger, G., J. De Mey, and H. Adam. 1983. 1,4-Diazobicyclo-(2,2,2)-octane (DABCO) retards the fading of immunofluorescence preparations. *Mikroskopie* **40**:237–241.
- Lee, L., J. S. Tirnauer, J. Li, S. C. Schuyler, J. Y. Liu, and D. Pellman. 2000. Positioning of the mitotic spindle by a cortical-microtubule capture mechanism. *Science* **287**:2260–2262.
- Lin, H., P. de Carvalho, D. Kho, C.-Y. Tai, P. Pierre, G. R. Fink and D. Pellman. 2001. Polyploids require Bik1 for kinetochore-microtubule attachment. *J. Cell Biol.* **155**:1173–1184.
- Liu, Z., R. Steward, and L. Luo. 2000. *Drosophila* Lis1 is required for neuroblast proliferation, dendritic elaboration and axonal transport. *Nat. Cell Biol.* **2**:776–783.
- Liu, Z., T. Xie, and R. Steward. 1999. Lis1, the *Drosophila* homolog of a human lissencephaly disease gene, is required for germline cell division and oocyte differentiation. *Development* **126**:4477–4488.
- Maney, T., L. M. Ginkel, A. W. Hunter, and L. Wordeman. 2000. The kinetochore of higher eucaryotes: a molecular view. *Int. Rev. Cytol.* **194**:67–131.
- McGrail, M., and T. S. Hays. 1997. The microtubule motor cytoplasmic dynein is required for spindle orientation during germline cell divisions and oocyte differentiation in *Drosophila*. *Development* **124**:2409–2419.
- Merdes, A., and J. De Mey. 1990. The mechanism of kinetochore-spindle attachment and polewards movement analyzed in PtK2 cells at the prophase-prometaphase transition. *Eur. J. Cell Biol.* **53**:313–325.
- Miller, R. K., K. K. Heller, L. Frisen, D. L. Wallack, D. Loayza, A. E. Gammie, and M. D. Rose. 1998. The kinesin-related proteins, Kip2p and Kip3p, function differently in nuclear migration in yeast. *Mol. Biol. Cell* **9**:2051–2068.
- Mimori-Kiyosue, Y., N. Shiina, and S. Tsukita. 2000. The dynamic behavior

- of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Curr. Biol.* **10**:865–868.
46. **Morris, N. R., V. P. Efimov, and X. Xiang.** 1998. Nuclear migration, nucleokinesis and lissencephaly. *Trends Cell Biol.* **8**:467–470.
 47. **Morris, S. M., U. Albrecht, O. Reiner, G. Eichele, and L.-Y. Yu-Lee.** 1998. The lissencephaly gene product Lis1, a protein involved in neuronal migration, interacts with a nuclear movement protein, NudC. *Curr. Biol.* **8**:603–606.
 48. **Ohkura, H., I. M. Hagan, and D. M. Glover.** 1995. The conserved Schizosaccharomyces pombe kinase plo1, required to form a bipolar spindle, the actin ring, and septum, can drive septum formation in G1 and G2 cells. *Genes Dev.* **9**:1059–1073.
 49. **Perez, F., G. S. Diamantopoulos, R. Stalder, and T. E. Kreis.** 1999. CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell* **96**:517–527.
 50. **Pierre, P., R. Pepperkok, and T. E. Kreis.** 1994. Molecular characterization of two functional domains of CLIP-170 in vivo. *J. Cell Sci.* **107**:1909–1920.
 51. **Pierre, P., J. Scheel, J. E. Rickard, and T. E. Kreis.** 1992. CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. *Cell* **70**:887–900.
 52. **Reiner, O.** 2000. LIS1: let's interact sometimes. . .(part 1). *Neuron* **28**:633–636.
 53. **Reiner, O., R. Carrozzo, Y. Shen, M. Whenert, F. Faustinella, W. B. Dobyns, C. T. Caskey, and D. H. Ledbetter.** 1993. Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein β -subunit-like repeats. *Nature* **364**:717–721.
 54. **Rickard, J. E., and T. E. Kreis.** 1991. Binding of pp170 to microtubules is regulated by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **266**:17597–17605.
 - 54a. **Rickard, J. E., and T. E. Kreis.** 1996. CLIPs for organelle-microtubule interactions. *Trends Cell Biol.* **6**:178–183.
 55. **Rieder, C. L., and S. P. Alexander.** 1990. Kinetochores are transported poleward along a single astral microtubule during chromosome attachment to the spindle in newt lung cells. *J. Cell Biol.* **110**:81–95.
 56. **Rieder, C. L., and E. D. Salmon.** 1998. The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends Cell Biol.* **8**:310–318.
 57. **Sapir, T., A. Cahana, R. Seger, S. Nekhai, and O. Reiner.** 1999. LIS1 is a microtubule-associated phosphoprotein. *Eur. J. Biochem.* **265**:181–188.
 58. **Sapir, T., M. Elbaum, and O. Reiner.** 1997. Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit. *EMBO J.* **16**:6977–6984.
 59. **Sapir, T., D. Horesh, M. Caspi, R. Atlas, H. A. Burgess, S. Grayer Wolf, F. Francis, J. Chelly, M. Elbaum, S. Pietrovski, and O. Reiner.** 2000. Doublecortin mutations cluster in evolutionary conserved functional domains. *Hum. Mol. Genet.* **5**:703–712.
 60. **Sasaki, S., A. Shionoya, M. Ishida, M. Gambello, J. Yingling, A. Wynshaw-Boris, and S. Hirotsune.** 2000. A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system. *Neuron* **28**:681–696.
 61. **Savino, T. M., J. Gebrane-Younes, J. De Mey, J. B. Sibarita, and D. Hernandez-Verdun.** 2001. Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. *J. Cell Biol.* **153**:1097–1110.
 62. **Scheel, J., P. Pierre, J. E. Rickard, G. S. Diamantopoulos, C. Valetti, F. G. van der Goot, M. Haner, U. Aebi, and T. E. Kreis.** 1999. Purification and analysis of authentic CLIP-170 and recombinant fragments. *J. Biol. Chem.* **274**:25883–25891.
 63. **Schroer, T. A.** 2001. Microtubules don and doff their caps: dynamic attachments at plus and minus ends. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**:92–96.
 64. **Schuyler, S. C., and D. Pellman.** 2001. Microtubule “plus-end-tracking proteins.” The end is just the beginning. *Cell* **105**:421–424.
 65. **Schuyler, S. C., and D. Pellman.** 2001. Search, capture and signal: games microtubules and centrosomes play. *J. Cell Sci.* **114**:247–255.
 66. **Shah, J. V., and D. W. Cleveland.** 2000. Waiting for anaphase: Mad2 and the spindle assembly checkpoint. *Cell* **103**:997–1000.
 67. **Sheffield, P., S. Garrard, M. Caspi, J. Aoki, K. Inoue, U. Derewenda, B. Suter, O. Reiner, and Z. S. Derewenda.** 2000. Homologues of the α - and β -subunits of mammalian brain platelet-activating factor acetylhydrolase Ib in the *Drosophila melanogaster* genome. *Proteins* **39**:1–8.
 68. **Skibbens, R. V., and P. Hieter.** 1998. Kinetochores and the checkpoint mechanism that monitors for defects in the chromosome segregation machinery. *Annu. Rev. Genet.* **32**:307–337.
 69. **Skop, A. R., and J. G. White.** 1998. The dynactin complex is required for cleavage plane specification in early *Caenorhabditis elegans* embryos. *Curr. Biol.* **8**:1110–1116.
 70. **Smith, D. S., M. Niethammer, R. Ayala, Y. Zhou, M. J. Gambello, A. Wynshaw-Boris, and L. H. Tsai.** 2000. Regulation of cytoplasmic dynein behaviour and microtubule organization by mammalian Lis1. *Nat. Cell Biol.* **2**:767–775.
 71. **Theurkauf, W. E.** 1997. Oocyte differentiation: a motor makes a difference. *Curr. Biol.* **7**:548–551.
 72. **Thrower, D. A., M. A. Jordan, and L. Wilson.** 1996. Modulation of CENP-E organization at kinetochores by spindle microtubule attachment. *Cell. Motil. Cytoskeleton* **35**:121–133.
 73. **Tirnauer, J. S., and B. E. Bierer.** 2000. EB1 proteins regulate microtubule dynamics, cell polarity, and chromosome stability. *J. Cell Biol.* **149**:761–766.
 74. **Valetti, C., D. M. Wetzel, M. Schrader, M. J. Hasbani, S. R. Gill, T. E. Kreis, and T. A. Schroer.** 1999. Role of dynactin in endocytic traffic: effects of dynactin overexpression and colocalization with CLIP-170. *Mol. Biol. Cell* **10**:4107–4120.
 75. **Vallee, R. B., and M. P. Sheetz.** 1996. Targeting of motor proteins. *Science* **271**:1539–1544.
 76. **Vallee, R. B., C. Tai, and N. E. Faulkner.** 2001. LIS1: cellular function of a disease-causing gene. *Trends Cell Biol.* **11**:155–160.
 77. **Vaughan, K. T., S. H. Tynan, N. E. Faulkner, C. J. Echeverri, and R. B. Vallee.** 1999. Colocalization of cytoplasmic dynein with dynactin and CLIP-170 at microtubule distal ends. *J. Cell Sci.* **112**:1437–1447.
 78. **Vaughan, P. S., J. D. Leszyk, and K. T. Vaughan.** 2001. Cytoplasmic dynein intermediate chain phosphorylation regulates binding to dynactin. *J. Biol. Chem.* **276**:26171–26179.
 79. **Willins, D. A., B. Liu, X. Xiang, and N. R. Morris.** 1997. Mutations in the heavy chain of cytoplasmic dynein suppress the nudF nuclear migration mutation of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **255**:194–200.
 80. **Xiang, X., S. M. Beckwith, and N. R. Morris.** 1994. Cytoplasmic dynein is involved in nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:2100–2104.
 81. **Xiang, X., G. Han, D. A. Winkelmann, W. Zuo, and N. R. Morris.** 2000. Dynamics of cytoplasmic dynein in living cells and the effect of a mutation in the dynactin complex actin-related protein Arp1. *Curr. Biol.* **10**:603–606.
 82. **Xiang, X., A. H. Osmani, S. A. Osmani, M. Xin, and N. R. Morris.** 1995. NudF, a nuclear migration gene in *Aspergillus nidulans*, is similar to the human LIS-1 gene required for neuronal migration. *Mol. Biol. Cell* **6**:297–310.
 83. **Yeaman, C., K. K. Grindstaff, and W. J. Nelson.** 1999. New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. *Physiol. Rev.* **79**:73–98.

Figure 8
(données complémentaires)

Légende de la figure 8 : Effet des mutations S70A et S70E sur le recrutement de LIS1 aux bouts (+) des MTs. Des cellules HeLa ont été transfectées transitoirement par un plasmide codant la chimère LIS1-WT-DsRed (a, b et c), la chimère LIS1-S70A-DsRed (d, e et f) ou la chimère LIS1-S70E-DsRed (g, h, i). Les cellules ont été fixées dans des conditions permettant de préserver les bouts (+) des MTs et ont été immuno-marquées par l'anticorps polyclonal TA dirigé contre la CLIP-170. Toutes les images sont des projections orthogonales, suivant la règle du pixel d'intensité maximale, de piles d'images acquises au moyen d'un microscope 3D à déconvolution. Les acquisitions ont été traitées à l'aide du logiciel « Metamorph » de façon à respecter rigoureusement les différences quantitatives observées. a, d et g : signal « DsRed » correspondant aux protéines chimériques exprimées. b, e et h : signal correspondant à la CLIP-170 endogène. c, f et i : superposition des signaux « DsRed » et TA. Noter la forte diminution du signal « DsRed » lorsque la sérine 70 est remplacée par un aspartate. Barre à 5µm.



II. Etude de mutations ponctuelles de LIS1, découvertes chez des patients atteints de lissencéphalie. (Caspi *et al.*, article en préparation)

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre III de l'introduction, LIS1 possède de multiples fonctions et semble interagir avec de nombreuses protéines. En effet, il s'agit à la fois d'une MAP, capable de réguler *in vitro* la dynamique des MTs, d'une sous-unité régulatrice du PAFAH(I) (Platelet Activating Factor Acetyl Hydrolase I) et d'un co-facteur du complexe moteur dynéine/dynactine dans un certain nombre de processus cellulaires. Par ailleurs, *LIS1* a été identifié comme un gène muté chez des patients atteints de lissencéphalie, une malformation importante du cerveau causée essentiellement par un dysfonctionnement de la migration radiale des neurones, au cours du développement du néocortex (Gupta *et al.*, 2002). L'un des enjeux majeurs de la recherche dans ce domaine est d'établir un lien entre les manifestations phénotypiques de la lissencéphalie et les diverses fonctions cellulaires de LIS1.

Il existe plusieurs degrés de sévérité de la lissencéphalie et de malformations apparentées (Dobyns *et al.*, 1999), qui pourraient dépendre du type de mutation et de la région de *LIS1* concernée par la mutation. Ces mutations sont très fréquemment des délétions de taille variable qui, dans de nombreux cas, invalident le gène. Toutefois, 5 mutations ponctuelles (substitutions), dans des régions différentes de la protéine, ont été identifiées (Leventer *et al.*, 2001; Lo Nigro *et al.*, 1997). Chacune de ces mutations conduit à une lissencéphalie plus ou moins sévère ou à une hétérotopie sub-corticale (malformation moins sévère que la lissencéphalie). L'un des projets de notre laboratoire, en collaboration avec l'équipe d'Orly Reiner, est d'identifier les propriétés de LIS1 affectées par chacune des mutations, dans le but de comprendre de quelles façons une mutation dans LIS1 conduit à une dysplasie corticale plus ou moins prononcée. Cette approche a aussi pour but de caractériser les mécanismes qui régissent la migration des neurones au cours du développement du cortex cérébral : voies de signalisation, effecteurs de ces voies et quelle place pour LIS1 ?

L'étude que nous présentons ici a consisté à analyser les propriétés biochimiques moléculaires et cellulaires de différentes protéines LIS1 portant chacune une des 5 mutations ponctuelles évoquées plus haut, de façon à corrélérer le degré de sévérité de la malformation et l'ampleur de l'altération des fonctions de LIS1. Dans cette étude, nous avons analysé la stabilité des protéines mutées, leur repliement, leurs localisations sub-cellulaires et leurs interactions avec d'autres protéines comme NudC, NUDEL, mNudE, DCX, les sous-unités catalytiques $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du PAFAH(I) la DHC et la CLIP-170.

Aucun des paramètres mesurés peut, à lui seul, nous permettre de prédire ce que sera la sévérité de la lissencéphalie. En revanche, une moyenne des différents paramètres (voir les modes de quantification dans l'article et la table 3 qui résume l'ensemble des résultats et

corrèle ceux-ci à la gravité de la malformation) permet, dans la majorité des cas, de prédire le degré de la dysplasie corticale dont souffrira le patient porteur de la mutation.

Par ailleurs, cette analyse nous a permis d'identifier les domaines de LIS1 impliqués dans l'interaction avec les MTs, NudC et $\alpha1/\alpha2$, et dans la dimérisation de la protéine. A ce propos, nous avons constaté que les 5 mutations ponctuelles affectent des sites requis pour l'interaction de LIS1 avec les MTs. Cela tend à montrer que la capacité de LIS1 d'interagir avec les MTs et les fonctions de LIS1 vis-à-vis des MTs sont importantes pour la migration des neurones au cours du développement du cortex cérébral. L'absence de localisation des protéines LIS1 mutées sur les MTs de cellules HeLa transfectées soutient cette dernière hypothèse.

ARTICLE II

LIS1 Missense Mutations: Different Pathways Leading to a Lissencephaly Phenotype

Michal Caspi ¹, Frédéric M. Coquelle², Cynthia Koifman ¹, Hiroyuki Arai ³, Junken Aoki ³, Jan R. De Mey ², and Orly Reiner ^{1*}

¹ Department of Molecular Genetics
The Weizmann Institute of Science
76100 Rehovot
Israel

² Institut Curie - Section de Recherche / C.N.R.S. - U.M.R. 146
Centre Universitaire d'Orsay
Bâtiment 110
91405 ORSAY Cedex
France

³ Graduate School of Pharmaceutical Sciences
The University of Tokyo
7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku
Tokyo 113-0033
Japan

JRDM present address:

École Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg / CNRS - UMR 7100
1, Bld Sébastien Brandt
67400 Illkirch - Graffenstaden
France

* Corresponding author: Tel: 972-8-9342319, FAX: 972-8-9344108. email: orly.reiner@weizmann.ac.il

Summary

Mutations in one allele of the human *LIS1* gene cause a severe brain malformation, lissencephaly. While most *LIS1* mutations involve large deletions, several point mutations with a single amino acid alteration were described recently. These mutations, found in lissencephaly patients reveal variable phenotypic manifestations. To understand the phenotypic consequences of these point mutations, we have analyzed their functional importance with respect to protein stability, folding, cellular localization and protein-protein interactions. In addition, we mapped protein interaction domains within LIS1. We showed that in all LIS1-protein interactions tested, several domains are involved. Intriguingly, the point mutations are located in the N-terminal region, WD2, and WD5, all of which are involved in LIS1-microtubule interaction. We demonstrated that the point mutations affect protein stability albeit at different levels, affect folding and in addition the mutated proteins do not localize properly in cells. Protein-protein interactions were also affected with some differences among the mutated proteins. Overall, no single assay could be used to predict the lissencephaly phenotype. However the averaged sum of the assays results translated to numerical values yielded a correlative phenotypic prediction with one notable exception. The protein product of a mutation S169P is expected to result in a severe phenotype, surprisingly the disease phenotype observed in the patient is much milder. It is likely therefore to assume that this patient is mosaic. Another interesting point regards the amino acid substitution of the mildest

phenotype G162S, which is completely conserved in *Saccharomyces cerevisiae* suggesting that the mutated protein may have partial activities that are preserved in yeast. Our results implicate that there are probably different biochemical and cellular mechanisms obstructed in each patient yielding the varied lissencephaly phenotypes.

Introduction

The functional complexity of the vertebrate cerebral cortex is facilitated by a complicated structural organization. The developmental details of these features are therefore of critical interest. A singular feature of cortical development is the generation of neurons at sites distant from their place of terminal differentiation. Abnormalities in the migration of neurons into the embryonic cortex lead to loss of normal convolutions of the neocortex in humans. One cause for such an acute brain malformation - known as lissencephaly, is mutation(s) in the *LIS1* gene (1). Mutations in the X-linked gene *Doublecortin* (*DCX*), can also cause classical lissencephaly (2,3). The phenotypic presentation in the *DCX* hemizygote males and *LIS1* heterozygote individual patients is very similar. However, while the frontal brain is more affected in patients with mutated *doublecortin*, the parietal and occipital cortex are more affected in the case of *LIS1* mutations (4). Lissencephaly (smooth brain) is a severe abnormality of neuronal migration characterized by absent (agyria) or decreased (pachygyria) convolutions, producing a smooth cerebral surface with thickened cortex (5). Subcortical band heterotopia (SBH) is a related disorder in which there are bilateral bands of gray matter interposed in the white matter between the cortex and the lateral ventricles (6). SBH is very common among females with mutations in *DCX* (2,3). Lissencephaly and SBH have

been observed in different regions of the same brain, indicating an ‘agyria–pachygyria-band’ spectrum. A grading system characterizes the malformations from grade 1 (most severe) to grade 6 (least severe) (7). Grades 1–4 are all lissencephalies of decreasing severity. Grade 5 is mixed pachygyria and SBH, whereas grade 6 is SBH alone.

Deletions involving *LIS1* are far more common than other mutations (8,9); 88% result in a truncated or internally deleted protein. Till now only five missense mutations were found in patients (9). Our previous analysis indicated that truncated or internally deleted LIS1 protein is unlikely to fold correctly (10). This finding was supported by a study done in cells derived from lissencephaly patients where no protein was detected from mutated alleles that were expected to result in a truncated protein (11). In addition, an internal deletion of the mouse *Lis1* produced a null allele with 50% expression of the protein in the heterozygotes (12,13). Homozygotes die at implantation stage in case of the null allele (12) but also with a hypomorphic allele (14), suggesting a fundamental role for the LIS1 protein. Based on these findings, we consider truncated or internally deleted protein the same as deletions involving the entire gene. The only exception is a short N-terminal truncation that results in a protein starting from the second methionine (reviewed (15)). Such a mutation was generated by gene-targeting and the heterozygous mice have no seizures and brain defects are not observed in the hippocampus (14). Nevertheless, obvious abnormalities in cortical development and neuronal morphology were noted (14). A similar mutation was found in one lissencephaly patient, which did not suffer from epilepsy and walked unassisted (11). The five patients with point mutations that result in single amino acid substitutions in LIS1 exhibit a variable phenotypic

manifestation. The patients are classified from grade 3a to grade 6 (16-18).

The deduced amino acid sequence places LIS1 as a member of the WD (tryptophan-aspartic acid) repeat family of proteins (1). A hallmark of this family is their involvement in multiple protein-protein interactions (19), and LIS1 is not an exception (reviewed in (20)). LIS1 contains an N-terminal region of 94 amino acids that includes a Lis-H (LIS1 homology domain amino acids 8-37) (21), a coiled-coil domain (amino acids 51-79) important for dimerization (14) and seven WD repeats. All of the five reported mutations occur in conserved domains (18). The mutation F31S is located in the Lis-H domain. The patient has grade 4a(1) lissencephaly manifested by generalized pachygyria with the additional feature of moderate hypoplasia of the cerebellar vermis, an unusual finding for patients with LIS1 mutations. Three mutations, H149R, G162S, and S169P, cluster in WD2 with variable phenotypes. The patient with mutation H149R has the most severe LIS grade and clinical phenotype of the five patients with missense mutations. He has typical grade 3a LIS with anterior pachygyria and posterior agyria, which is the most common malformation pattern for patients with intragenic mutations of LIS1. The patient with mutation G162S has an unusually mild form of LIS with pachygyria restricted to the occipitoparietal regions and normal gyration in the temporal and frontal lobes. To date, he is the only patient identified with this type of malformation due to a LIS1 mutation. He was designated as grade 4a(2), with the mildest phenotype of any reported patient with a LIS1 mutation, with a normal IQ, infrequent seizures, and mild clumsiness as his only motor deficit. The patient with mutation S169P is the only known patient with subcortical band heterotopia secondary to a LIS1 mutation and is thus classified as grade

6a. His pattern of SBH is atypical in the sense that it is posterior predominant as opposed to the diffuse or anterior predominant bands seen in patients with DCX mutations (22). Compared to others, this patient has a relatively milder clinical phenotype with mild to moderate mental retardation complicated by an intractable seizure disorder. It has been suggested that the patient exhibits somatic mosaicism, which could not be excluded by DNA dilution and PCR-restriction fragment length polymorphism (17). The fifth mutation is located in WD5 (D317H). This patient exhibits typical grade 4a(1) lissencephaly manifested by generalized pachygyria.

LIS1-protein interactions may be grouped conceptually into two classes: evolutionary conserved and relatively new interactions. Much can be learned from the interactions that are conserved throughout evolution (23). NudF, a LIS1 homolog in *Aspergillus nidulans* was identified in a screen for mutants defective in nuclear migration (24). NudC, which controls NudF levels (24) and *nudE* a multicopy suppressor of mutated *nudF* (25), both have mammalian homologs that interact with LIS1 (25-28).

Other gene products involved in the same pathway (*nudA*, *nudI* and *nudG*) are subunits of the microtubule based motor protein - dynein, and *nudK* is a part of the dynein regulatory complex dynactin (29-31). The functional interaction of LIS1 with dynein is conserved in mammalian cells (13,26,32). Furthermore, LIS1 was shown to directly interact with the dynein heavy chain (in the P1 loop region and in an N-terminal stem region) (26,33) as well as three distinct subunits of the dynein and dynactin complexes (33). Work done in *Drosophila* also suggests a genetic interaction of LIS1 with dynein/dynactin/microtubule mediated pathway (34-36). Furthermore, mutations in

nudA, nudC, nudG and nudF can be suppressed by a mutation in the alpha tubulin gene (37), suggesting a conserved relationship between LIS1 and microtubule regulation. Indeed, we have shown that LIS1 interacts with tubulin and can modulate microtubule dynamics *in vitro* (38). This interaction and probably others are regulated by phosphorylation (39). Moreover, LIS1 colocalize with NudC, NUDEL, mNudE and γ -tubulin at the centrosome and could control the microtubule nucleation (26,27,40). All these results indicate conserved mechanism from nuclear movement in the fungus and flies to neuronal migration in the brain.

An additional LIS1 interacting protein that is functioning in the dynein/dynactin pathway is CLIP-170. CLIP-170 is a plus-end tracking protein (41-43), which may act as an anticatastrophe factor (44). It has been proposed to mediate the association of dynein/dynactin to microtubule plus ends (45), and it also binds to kinetochores (46) and cortical sites (32) in a dynein/dynactin-dependent fashion. We recently demonstrated a direct interaction between LIS1 and CLIP-170 and suggested that LIS1 is a regulated adapter linking CLIP-170 to cytoplasmic dynein at sites involved in cargo-MT loading, and/or in the control of MT dynamics (47).

In addition, we detected an interaction between LIS1 and Doublecortin (DCX) (48). Our results suggest that LIS1 and DCX are coexpressed, interact and can function in the same protein complex in the developing brain (48). The recently described hippocampal phenotype in *DCX* mutant mice (49) is strikingly similar to that observed in *Lis1* mutant mice (12), thus supporting participation in a common pathway.

Another well documented interaction is between LIS1 and the two catalytic subunits ($\alpha 1$ and $\alpha 2$) of platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) Ib (50,51). LIS1 is believed to act as the regulatory part of this enzymatic complex. Based on the homologs isolated from *Drosophila* this interaction is a relatively new event in evolution. The *Drosophila*- α subunit lacks both catalytic activity and the ability to interact with *Drosophila* LIS1 (52). Interestingly, the *Drosophila* LIS1 protein does interact with mammalian PAF-AH subunits ($\alpha 1$ and $\alpha 2$) (52).

Taking into consideration our current knowledge regarding LIS1 function, we believe it is important to analyze how these five missense mutations affect protein half-life, cellular localization, and protein-protein interaction. That will promote our understanding as to how the disease is manifested in lissencephaly patients.

Results

LIS1 is an essential protein controlling multiple cellular functions through participation in different protein complexes. Understanding the precise details of the mode of LIS1-protein interactions under normal and abnormal conditions may allow us to better understand processes of neuronal migration and brain development. For this analysis the existence of several disease causing amino acid substitutions that have been described in patients with variable phenotypes were utilized. Two hypotheses may explain the variability in disease presentation: reduction or abolishment of LIS1 interaction with a specific protein(s) without affecting other interactions. Alternatively, there may be a

global effect on the LIS1 protein that is less pronounced in the case of milder mutations. Of course, it should be noted that the coexistence of these two hypotheses cannot be a priori excluded.

Several assays allowed determination of global effects of amino acid substitutions; protein folding was tested by limited trypsin cleavage, LIS1 stability was monitored by examining protein degradation, and its intracellular localization was inspected by immunostaining. To resolve whether LIS1 mutations affect specific protein interactions we first mapped domains of interaction between LIS1 and some of its protein partners. Then the described protein mutants were used to test whether they retain the ability to bind these known interacting proteins.

LIS1 Folding

It has been shown that multiple WD containing proteins (including LIS1) retain the beta-propeller-like structure similar to the β - subunits of heterotrimeric G-proteins (53). Thus the WD containing region is protected when these proteins are subjected to limited proteolytic cleavage. In the following assay, LIS1 carrying the different mutations was expressed *in vitro* in rabbit reticulocytes and labeled with S^{35} -methionine. When the lysate was subjected to limited trypsin treatment two protected bands were visible in case of the wild type LIS1 protein (fig. 1). Quite strikingly, all mutated proteins with the notable exception of the N-terminal mutation F31S, were completely degraded. The results suggest that the proteins carrying mutations in the WD domains are misfolded. The rabbit reticulocyte is an *in vitro* system and as such may not necessarily reflect all

cellular physiological conditions, therefore the fate of mutated LIS1 protein was subsequently tested in mammalian cells.

LIS1 half-life and Intracellular Localization.

Protein half-life was tested by overexpression of LIS1-FLAG-DsRed (wild type and mutated) in human 293 cells. Following transfection protein expression was allowed to proceed for 48 hours and then the translational inhibitor cycloheximide was added to the cells. Cells were harvested at increasing time points, and protein lysates were subjected to Western blot analysis and quantitation (table 1). The results demonstrate that LIS1 is a stable protein and even 10 hours after cycloheximide addition protein levels were not reduced (table 1, LIS1). LIS1 mutated in WD5, D317H, showed the least effect as after 10 hours there was only a 15% reduction of the protein in the cells. LIS1 mutated in G162S was not affected during the first 6 hours, however after 8 and 10 hours protein level were reduced in 30%. Mutation H149R, which causes the most severe phenotype revealed an observable drop in the protein levels (88% - 74%) starting as soon as 2 hours after inhibition of protein translation. LIS1 mutated in S169P exhibited a relatively short half-life of 4 hours (table 1). Thus the biochemical prediction of this specific mutation will suggest a severe phenotype than actually seen in this patient. A possible explanation that was already raised (18) is mosaicism, suggesting the presence of wild type cells in the brain. This would alleviate the effect of the mutated protein as it is expressed only in a subset of cells. The LIS1 N-terminal mutation F31S is unique in the sense that it aggregates when overexpressed in Hela cells (fig. 2a). Indeed the mutated protein started to degrade almost as soon as cycloheximide was added and at 10 hours the level drops to

56%. Interestingly, co-transfection of GFP-PAF-AH α 1 subunit rescued this phenotype to some degree and the protein is stable for the first 10 hours after which it starts to degrade (table 1, fig. 3a). The solubilization of LIS1 F31S aggregates following expression of the α 1 PAF-AH catalytic subunit was striking as observed by biochemical extractions (fig. 3b), but also by examination of live cells (fig. 2, compare a and c).

All the mutated LIS1 proteins examined were not found in the usual LIS1 intracellular localizations. Most specifically those localization that are related to structures that are associated with dynein/dynactin or CLIP-170, as microtubule-tips, spindles, centrosome, kinetochores, and some structures that are not associated with microtubule as cortical sites. In addition, a significant portion of the wild-type LIS1 is found soluble in the cell cytoplasm and most LIS1 mutated proteins are detected as soluble cytoplasmic proteins. Several representative examples are shown since the results obtained were very similar for all the mutations. While usually LIS1 localizes to the tips of microtubules and colocalizes with CLIP-170 (47), and with EB1 (fig. 4 a-c) it is not observed in the case of the D317H mutant protein (fig. 4 e-g, see also insets). In addition to localizing to microtubule tips, LIS1 exhibits a known strong association with the centrosome (13,32) (demonstrated in fig. 4 a-d), however mutated LIS1 (D317H) did not localize to the centrosome (fig 4. e-h). During mitosis, LIS1 localizes strongly to the spindle poles, the kinetochores (fig 4 i-l and q-t), and the cortical sites (fig 4 q-t) while mutant LIS1 (G162S and/or D317H) does not (fig. 4. m-p and u-x). An additional notable feature that was observed with all these mutated proteins is that the level of expression was less than

the wild-type protein (not shown). Thus, likely reflecting the reduced stability of the mutated proteins.

Mapping LIS1-Protein Interaction domains

An important aspect of deciphering LIS1 role in the cell is mapping the involvement of the known domains participating in the different LIS1-protein interactions. This task was addressed by dissecting LIS1 to its seven WD domains and the N-terminal region containing both the LIS-H and the coiled-coil motifs.

The different WD repeats, the N-terminal domain and the full length LIS1 were expressed in rabbit reticulocytes labeled with S³⁵-methionine. These labeled LIS1 fragments were used in pulldown assays with recombinant tagged (GST- or 6XHis-) NudC, NudE, NudEL, PAF-AH catalytic subunits α 1/2, and LIS1 proteins (table 2). The pulldown experiments were conducted by including the indicated labeled peptides with the tested recombinant protein followed by addition of the suitable beads (glutathione- or Nickel- agarose). After extensive washes the reaction was analyzed on SDS- PAGE. To calculate the relative contribution of interactions, 5% of the input was loaded for each WD fragment and quantification was performed accordingly. Several conclusions were evident from these experiments; in case of all the interactions tested no one single domain can be indicated to account for the complete interaction. LIS1 interaction with NudC was rather unique in comparison with other interacting proteins since WD domains 5 and 7 interacted with NudC better than the full length LIS1. It is possible that other interactions of stronger affinity influence the binding of NudC to the LIS1 protein. In case of NudE

and NudEL, both proteins interacted strongly with the full length LIS1 but no specific domain of LIS1 can be attributed to these interactions. This finding may suggest that perhaps the globular dimeric structure of the LIS1 protein is required for these specific interactions. Also, comparing the mode of interaction of these two similar proteins reveals that NudEL has a higher affinity towards LIS1 than NudE. The PAF-AH catalytic subunits $\alpha 1$ and $\alpha 2$ are cytosolic proteins and it seems as though the interaction with LIS1 is of lower affinity in comparison with other proteins (% of interaction of the catalytic subunits versus for example NudE is 16% versus 54%, table 2). However, it may be conceived that within the reticulocyte lysate there are endogenous unlabeled PAF-AH α subunits that are competing with the labeled ones. Furthermore, in other types of assays (examples; co-purification of the PAF-AH subunits with LIS1 (50) & see figs 6, 7 and 8) the interaction with the PAF-AH catalytic subunits is strong. Examining the different domains, the WD2, 3 and 7 appear as more important for $\alpha 1/\alpha 2$ -LIS1 interaction. The dimerization property of LIS1 is mediated via WD3, 6 and the N-terminal region (the importance of the N-terminal region for dimerization was reported by us previously (14)).

Based on these results is it difficult to conclude whether these interactions are competitive. However, in the case of NudE/EL and DCX we have supporting data (not shown) that precludes competition over LIS1 binding site.

The domain important for interaction with the microtubule cytoskeleton was determined by binding of the different WDs to preassembled microtubules (fig. 5b). Taxol was used to stabilize microtubules and as a control nocodazole was used to block polymerization. The mixture was then incubated with the S³⁵-methionine labeled domains and centrifuged

to create soluble and insoluble fractions. In fig. 5b only the insoluble fractions treated with taxol or nocodazole are shown. The taxol insoluble fraction will be enriched for proteins that bind microtubules. Tubulin, of course, can be found in this fraction whereas it is depleted from the nocodazole control pellet (panel b lower gel). Some of the labeled proteins are still found in the pellet, however this fraction may represent unfolded proteins that aggregates and pellets in a non-specific way. By subtracting the nocodazole treated fraction from the taxol treated one it can be determined if a protein is specifically bound to the microtubule cytoskeleton. Thus, the WD domains that are indicated as involved in microtubules binding are WD2, 5,6,7, and the N-terminal domain (fig. 5b). Interestingly, all the patients mutations are found in domains that are involved in binding to microtubules (the N-terminus, WD2, and 5). In addition, immunostaining suggested a marked reduction in the localization of mutated LIS1 in cellular structures that are associated with microtubules (fig. 4).

Interaction of mutated LIS1 proteins with known partners

LIS1 is known to interact with a plethora of proteins in different locations within the cell. For instance, sequestering to microtubule tips is mediated via the CLIP-170 protein, whereas cytoplasmic localization is probably accompanied by PAF-AH subunits binding. We hypothesize that the different interactions play a crucial role in targeting LIS1 to its required localizations. Therefore, we decided to test whether the different mutations hinder the binding of LIS1 to some of its known partners.

Pulldown experiments with recombinant proteins.

LIS1-FLAG-DsRed (wild type and mutated) was expressed in 293 cells and the extracts were used for pulldown experiments (fig. 6a and b). Pulldown assays using GST- CLIP-170 (the C-terminal region), -DHC (LIS1 interaction portion), -NudC, or-DCX indicated that all mutations interact with the recombinant proteins to some degree (fig. 6a). In a similar manner pulldown assays were preformed using 6XHis tagged NudE and NudEL (fig. 6b). Again, all mutations were pulled down, however some differences were noted while comparing the results obtained with NudE or with NudEL. The interaction of wild type LIS1 with NudEL is noticeably stronger than the interaction with NudE (first lane in panel b). Such a stronger interaction was previously noted while conducting the interaction domain analysis (table 2). In addition, the mode of interaction differs between the two proteins, only in case of NudE the endogenous LIS1 is competed out by the expressed LIS1-FLAG-DsRed protein. These two phenomena can be explained by a stronger affinity of NudEL to the LIS1 protein (not affected by any mutation). In addition, the DsRed is known to form tetramers (54,55), thus it may be possible that while NudEL is capable of binding both monomeric and dimeric forms of LIS1, NudE requires at least a dimeric form of LIS1 for efficient binding.

The different mutations were also expressed in rabbit reticulocytes and the lysate was used for GST-pulldown with PAF-AH catalytic subunits: alpha 1 (not shown, but the results were identical to those with alpha 2), and alpha 2 recombinant proteins (fig. 6c). In this assay it is clear that the normal LIS1 binds alpha 2 much stronger than the mutated proteins. This result is in contrast with other data that demonstrated interaction of the

alpha subunits with mutation F31S (co-immunoprecipitation assay and two hybrid system) and G162S (two hybrid system only).

Yeast two hybrid.

LIS1 (wild type and mutated) was expressed as a bait protein in yeast cells together with lac-Z reporter and the preys – NudEL, CLIP-170 (the C-terminal region) and alpha1/2. In this system CLIP-170 interacts only with the normal LIS and no obvious interaction is detected with all the mutations (fig. 7, left panel). Alpha 1 and 2 (only alpha 1 shown) interacts with normal LIS1 and much weaker with the mutations F31S and G162S (middle panel). NudEL interacts with normal LIS1 but also with the same strength with the mutated LIS1 F31S and G162S (right panel). It is possible that other proteins found in the yeast cell influence the final structure of these two mutated LIS1 forms enabling them to bind to the alpha subunits (to some degree) and to NudEL.

Co-immunoprecipitation.

For testing the possible interactions in mammalian cells, the different proteins were co-expressed with each of the LIS1-FLAG-DsRed proteins (wild type and mutated) in 293 cells (GFP-alpha1, myc-DHC (LIS1 interacting region), Myc-NudE, myc-NudEL, GFP-CLIP (C-terminal domain); fig. 8b, d, e,f,g respectively). In other cases only the LIS1-FLAG-DsRed proteins (wild type and mutated) were expressed and the interactions with endogenous LIS1 or NudC were examined by immunoprecipitation (fig. 8a and c). The corresponding anti-FLAG (panel a, b, d, e, f, and g) or anti-LIS1 (panel c) antibodies were used for all the experiments.

All the mutated proteins are capable of co-precipitating with the endogenous LIS1 (fig. 8a). Therefore, while interpreting the immunoprecipitations results, it must be accounted that the endogenous protein is present in these immunocomplexes and is capable of interaction with all LIS1 partners. Thus, the few examples where interactions with partners were abolished are remarkable. The interaction with the PAF-AH catalytic subunit was tested by co-expression of GFP-alpha 1 with the different LIS1-FLAG-DsRed proteins. Here, it can be noted that only the normal LIS1 and the F31S mutation interact with alpha1, albeit the fact that all proteins were immunoprecipitated by the anti-FLAG antibodies (fig. 8 panel b, lower gel). This result is in agreement with data showing that GFP-alpha 1 solubilizes the particulate-like aggregates seen with this particular mutation (fig. 2). In yeast cells, the interaction with F31S mutation was observed to be weaker than with the normal LIS1 protein (fig. 7 middle panel). In case of LIS1- NudC no interaction was detected with the N-terminal mutation F31S (fig. 8c upper panel). Note however, that the N-terminal region was not indicated to be involved in NudC binding (table 1). It could be postulated that this specific interaction is sensitive to the mutated protein format (large aggregates) so binding is hindered. The additional interactions indicated that the mutated forms of LIS1 interacted with the tested proteins probably due to the presence of the endogenous LIS1. The tested proteins include LIS1 interacting domain of DHC (fig. 8 d), NudE or NudEL (fig. 8 e and f) the C-terminal portion of CLIP-170 (fig. 8 g).

All the results described here suggest that a general mechanism reflected in different biochemical pathways lead to the variable phenotypes seen in the patients.

Discussion

The identification of variable manifestation of the lissencephaly syndrome has opened a wide field for investigating of neuronal migration disorders. The fact that a single amino acid substitution can result in different phenotypes may help us to address the complicated task of elucidating the mechanisms behind brain development. Indeed, the biochemical outcomes of these mutations reflect a variety of possibilities as to how LIS1 is involved in processes in the developing cortex.

We tested five different missense mutations for their gross biochemical properties as well as their ability to retain interactions with known protein partners. A summary of all the experimental results are presented in table 3. Clearly, no single assay can point out to the predicted lissencephaly severity. Instead, a sum of all the assays used can provide an accurate disease profile. This result is probably reflecting the fact that the basic biochemical and cellular pathways affected by each mutation are different. Interestingly, none of the mutated proteins localized to cellular subdomains that are associated with dynein/dynactin, and CLIP-170, as the centrosome, the kinetochores, the cortical sites, and the microtubule tips. Since no differences are observed among the mutations, it may be possible to raise the question that perhaps other pathways such as involving NudEL interaction may play a more important role in determining the final phenotypic outcome. Unfortunately, our current information of the functional consequences of some of LIS1 interactions are rather limited and will clearly be an active field of future research. The accumulated interaction data gathered from three different experimental methods reveals some discrepancies between the results. This may indeed reflect the differences in the

physiologic conditions present in the different systems. Mammalian cells for example, may contain chaperones not found in yeast cells and vice versa. Furthermore, it is evident that the reticulocyte system is the most restricted one presenting biochemical properties of the “bare” protein, reflected in results of the folding assay. Even though most of the mutated proteins were completely degraded by trypsin, still they maintain their ability of several interactions. No doubt that the global view can be attained only when observing the full spectrum of experimental methods. Mutation H149R causes the most severe phenotype among the lissencephaly patients analyzed in this study. The biochemical profile of the mutated protein can provide the explanation. The protein was completely degraded in the trypsin assay indicating that its folding was most likely incorrect. The stability score was 2 since the protein level was reduced to 77% after six hours from cyclohexamide addition. Combined with the summation of all interaction experiments, it is clear that the mutated protein can barely function. Hence, the substitution of residue 149 from histidine to arginine resulted in such a devastating malformation seen in the patient. Two of the mutations – F31S and D317H cause the same lissencephalic grade (4a1). However, looking closely at the experimental data reveals different biochemical properties, suggesting that diverse mechanism are responsible for the observed phenotypes. Mutation F31S resides in the N-terminal region of LIS1 protein (Fig. 5a) within the recently described LIS-H domain (21). The N-terminal region is predicted to remain external to the β -propeller structure characterized of WD proteins.

It is therefore not surprising that the mutated protein was partially protected from trypsin cleavage as the globular WD domain is most likely still intact. However, the mutation severely affects protein stability (scored 1) and interaction abilities are reduced. The

aggregates that are formed in cells may suggest nonfunctional mutated protein. Protein aggregation and deposition of abnormal protein is a common theme in many neurodegenerative disorders as diverse as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, prion diseases, Huntington's disease, frontotemporal dementia, and motor neuron disease (reviewed in (56)). Here we reported such protein aggregations of LIS1 mutated in F31S. The failure of polypeptides to adopt their proper structure is a major threat to cell function and viability. It can result in a toxic gain of function or associated with a loss of function. In the case of the F31S mutation, we propose a loss of function mechanism since the aggregated mutated protein does not interact with several cellular proteins. It is well known that molecular chaperones promote correct folding and prevent harmful interactions. Indeed, the PAF-AH catalytic subunit was identified here as a potential LIS1-chaperone. Even so, once the aggregates are solubilized, the mutated LIS1 still does not properly localize and does not interact with other normal interacting proteins. The unfolded proteins are degraded primarily by the ubiquitin-proteasome system and failure to detect and eliminate misfolded proteins may contribute to the pathogenesis of neurodegenerative disease or in this case to lissencephaly.

Although exhibiting the same lissencephaly phenotype the obstructed pathway in case of the D317H mutation is different. Mutation D317H is located in WD5 (fig.5a), which is unique among the WD repeats of LIS1 as it contains a hinge region – rich in serine residues. The mutated protein is most likely missfolded (scored 0) though the half life assay may imply that some chaperone aid helps a portion of the protein to avoid degradation in the cell (stability score 4). The interaction information reveals a probable defect that can obstruct the binding of other proteins, though not as bad as mutation F31S

(sum of 28 versus 25). Evidently, the two mutated proteins behave in a different biochemical and cellular context. But, each of the two separate pathways eventually leads to the same lissencephaly phenotype. Mutation G162S located in the WD2 repeat of LIS1 manifests a rather mild phenotype exhibited by the patient. This outcome is supported by the biochemical data. Even though the protein is probably missfolded *in vitro* (score 0 in folding assay), it clearly maintains its stability as after six hours from cycloheximide addition 91% of the protein still remains intact. Furthermore, interactions with other proteins were only slightly affected giving the highest interaction score. Overall, the results presented here are consistent with the weak manifestation of lissencephalic syndrome. Mutation S169P is the only substitution that is in clear contrast to the observed phenotype. The biochemical profile is as defective as the one seen in mutation H149R. The mutated protein is folded incorrectly and its stability is extremely reduced (52% after six hours – scored 0). The interaction data is the same as mutation D317H, which results in a much severe phenotype. These results can only be settled if we accept the biochemical predictions (17) and the authors' (17) notion that the patient is a mosaic. In such a case the severely defected protein (substitution of residue 169 from serine to proline) is expressed in only some of the cell population of the brain. In other cells the expression of wild type LIS1 protein can diminish the resulted malformation.

Among the five point mutations analyzed, three (H149, S169, D317) are conserved in all species that contain a LIS1 homolog including *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, *Dictyostelium discoideum*, *Aspergillus nidulans*, and *Saccharomyces cerevisiae*. The N-terminal region (where mutation F31S resides) is somewhat less conserved and in

Aspergillus nidulans, and *Saccharomyces cerevisiae* the phenylalanine residue is changed to leucine. Glycine in position 162 in the patient is asparagine in *Aspergillus nidulans* but is a serine residue in *Saccharomyces cerevisiae* thus identical to the mutation found in the patient with the least severe phenotype. Therefore, it could be expected that the LIS1 protein G162S should be capable to supporting the functions of LIS1 that are conserved in yeast.

The discovering of different disease phenotypes within lissencephaly patients opens a window to new insights regarding the processes in which the human brain is evolving. By investigating the mutated proteins we have gained one step further in understanding these processes and elucidating their meaning.

Material and Methods

Cell culture

Culturing and transfection of HeLa cells were performed as described previously (47).

Immunological methods

Cells were fixed in 100% methanol-1 mM EGTA for 10 min at -20°C , followed by 15 min in 4% paraformaldehyde in PHEM buffer (60 mM Pipes, 25 mM Hepes, 10 mM EGTA, 2mM magnesium acetate, pH6.9). They were washed three times for 5 min each in PBS (phosphate-buffer saline) and further permeabilized for 25 min in 0.1% Triton X-100 in PBS. The cells were treated with 50 mM NH_4Cl in PBS for 10 min, washed three

times for 5 min each in PBS, blocked in PBS-BSA (PBS containing 0.1% BSA), and labeled with the polyclonal anti-CLIP-170 antibody, TA (47), or with a monoclonal anti-EB1 antibody (Transduction Laboratories, E46420/Lot 1) for 1h at 37°C. After being washed in PBS-BSA, the cells were incubated with the ALEXA-488 secondary antibodies (Molecular Probes) for 45 min at 37°C. The cells were post-fixed in 4% formaldehyde in PBS for 16 min and treated with 50 mM NH₄Cl for 10 min. The chromosomes were stained with DAPI (Sigma) for 5 min. Coverslips were mounted using PBS-15% glycerol containing antifading agent 1,4-diazabicyclo-(2.2.2) octane (DABCO, Sigma) at 100 mg.ml⁻¹. Pictures of fixed cells were collected using a three-dimensional deconvolution imaging system (J.R. De Mey, unpublished data).

Constructs

Site directed mutagenesis was performed using PCR in DsRed-FLAG-LIS1 or pAGA-LIS1 vectors. Based on the patients' mutations (16-18), we synthesized the following oligonucleotides - **F31S**: 5' gaggcattatcagtttctaaaaaggaagctgaat. **H149R**: 5' cgaactttaaaggacgtacagactctgtacag. **G162S**: 5' catttcattcgaccacagcagcaagcttctggttcc. **S169P**: 5' gcttct ggcttctgtctctg cagatatgacc. **D317H**: 5' cttgctgtctggatccagacacaagactattaagatgtg. The point mutations were introduced using PCR mutagenesis. A domain of the dynein heavy chain (DHC) previously reported to interact with LIS1 (26) was produced by RT-PCR using the following primers: forward- 5' gaggaattcacgccctcactgaccgttg, reverse- 5' ctctcgaggaagagtccgtctgtccac. All PCR products were fully sequenced. PCR products were cloned into the pGEX and pCDNA3 vectors into EcoRI and XhoI sites. All LIS1 mutations were introduced into the bait

vector of the two hybrid system (pEG-202 plasmid - OriGene Technologies, Inc.), using Eco RI and Xho I sites. The interacting proteins were subcloned to the prey vector (pJG4-5 plasmid - OriGene Technologies, Inc.). WD constructs were described previously (48).

Protein half-life assay

293 cells were transfected by FLAG-DsRed-LIS1 (wild type or mutations) in 6-well plates using the CaCl₂ method. Cyclohexamide (20 µg/ml) was added to the cells 48 hours post transfection. The cells were then harvested in 200 µl IP buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100), supplemented with protease inhibitors (Sigma, Rehovot, Israel). Ten time points were picked – 0, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 hours. The cells were vortexed vigorously and centrifuged for 15 min. Samples of 5-10µl were loaded on SDS-PAGE gels, blotted and analyzed with anti-LIS1 antibodies (210) (38).

Trypsin cleavage

LIS1 protein (wild-type and mutations) were translated in Rabbit Reticulocyte TnT System (Promega, Madison, WI) with S³⁵-methionine. A portion of the labeled reaction (10 µl) was used for tryptic cleavage as described (10).

GST pull down assay

GST fusion proteins were used for pulldown experiments with either transfected 293 cell - extracts or rabbit reticulocyte lysate.

Cell extracts were prepared in T-T buffer (20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Triton-X), supplemented with protease inhibitors (Sigma, Rehovot, Israel). The rabbit reticulocyte TnT System (Promega, Madison, WI) was used to translate LIS1 (wild type or mutated) and the different WD peptides labeled with S³⁵-methionine. In each pulldown experiment 500-1000 µg of total extract or 10 µl of the labeled lysate were used. Pulldown assay was performed as described (48).

6xHis pull down assay

Recombinant 6xHis proteins were incubated with transfected 293 cell extracts (prepared as described) or rabbit reticulocyte lysate. Pulldown assay was performed as described (48).

Immunoprecipitation assay

Immunoprecipitation was performed in 293 cells using M2 beads (Sigma, Rehovot, Israel). Cells were co-transfected with FLAG-DsRed-LIS1 (wild-type or mutated) and each of the interacting protein. Transfected cell extracts were prepared in IP buffer, supplemented with protease inhibitors (Sigma, Rehovot, Israel). Each 10 cm. plate was washed with PBS, put on ice and scraped with 1 ml of cold IP buffer. The cells were incubated on ice for 15 min. and were vortexed for 10 sec. every 5 min. After centrifugation at 9000 rpm for 15 min. at 4°C sample buffer was added and the beads were boiled. The samples were separated by SDS-PAGE and Western blotted with the suitable combination of antibodies (α -LIS1 (monoclonal clone 210), α -FLAG (M2 clone

from Sigma, Rehovot, Israel), α -myc (E910 clone from Sigma, Rehovot, Israel), α -PAF-AH- α 1 antibodies, monoclonal clone 9C9).

Yeast two hybrid

Yeast transformation and detection of interactions were performed according to manual (OriGene Technologies, Inc.), briefly, three plasmids were transformed into the yeast strain EGY48; pEG-202-bait, pJG4-5-prey and pSH18-34-LacZ (from the DupLEX-A system, OriGene Technologies, Inc.). The baits were LIS1 – wild type or one of the 5 mutations and the preys were PAF-AH α 1, PAF-AH α 2, CLIP-170 and NudEL.

The yeast cells were grown to O.D. 600 of 0.6-0.8, harvested at 1500g for 3 min. and resuspended in TE (1/3 of initial volume). The cells were then pelleted again, resuspended in the same volume of TE/LiOAc and rotated slowly at 30°C for 2h. Afterwards, the cells were pelleted and resuspended in TE/0.1M LiOAc (100 μ l per transformation). The desired bait and prey plasmids plus the LacZ plasmid and 10 μ g salmon sperm DNA were added to the cells. After 10 min. incubation at 30°C 500 μ l of TE/0.1M LiOAc/50% PEG-3350 was added to each tube and the cells were incubated for 45 more min. Heat shock was performed at 42°C for 5 min. and the cells were then spun down, resuspended in TE and plated on glucose based plates lacking His, Trp and Ura (SD-H-T-U). The plates were incubated at 30°C 2-3 days until colonies appeared. From each interaction 4-5 colonies were streaked on galactose based plates (SG-H-T-U) containing 1mg/ml X-gal and incubated overnight at 30°C till the appearance of a blue color.

WD's binding to microtubules

Phosphocellulose-purified tubulin was assembled into microtubules with addition of taxol (final concentration 30 μ M) or nocodazole (10 μ g/ml) as described (57). The assembled microtubules were mixed with 10 μ l of S³⁵-methionine labeled proteins (LIS1 and the different WD peptides) translated in the rabbit reticulocyte TnT System (Promega, Madison, WI). The mixtures were incubated at 37°C for 10 min. and separated into two fractions as described (57). The insoluble fractions (pellets) of each experiment were ran on 15% SDS-PAGE gels and stained with Coomassie Brilliant Blue (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). After destaining the gels were washed with H₂O for 20 min. and the signal was enhanced by 30 min. wash with sodium salicylate solution (16%) at room temp.

Acknowledgments: Thanks to Jim Dompierre for help with picture imaging. Supported by HFSP grant No: RG283199 9, March of Dimes grant No: 6-FY01-5 and Minerva Foundation, to O.R.. Association pour la Recherche sur le Cancer (Villejuif, France) to J.R.D.M.. F.M.C was supported by a doctoral fellowship from the French Ministry of Research and from the Association pour la Recherche sur le Cancer (Villejuif, France).

References

1. Reiner, O., Carrozzo, R., Shen, Y., Whenert, M., Faustinella, F., Dobyns, W.B., Caskey, C.T. and Ledbetter, D.H. (1993) Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein β -subunit-like repeats. *Nature* **364**, 717-

- 721.
2. des Portes, V., Pinard, J.M., Billuart, P., Vinet, M.C., Koulakoff, A., Carrie, A., Gelot, A., Dupuis, E., Motte, J., Berwald-Netter, Y., Catala, M., Kahn, A., Beldjord, C. and Chelly, J. (1998) A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. *Cell* **92**, 51-61.
 3. Gleeson, J.G., Allen, K.M., Fox, J.W., Lamperti, E.D., Berkovic, S., Scheffer, I., Cooper, E.C., Dobyns, W.B., Minnerath, S.R., Ross, M.E. and Walsh, C.A. (1998) *doublecortin*, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell* **92**, 63-72.
 4. Pilz, D.T., Matsumoto, N., Minnerath, S., Mills, P., Gleeson, J.G., Allen, K.M., Walsh, C.A., Barkovich, A.J., Dobyns, W.B., Ledbetter, D.H. and Ross, M.E. (1998) LIS1 and XLIS (DCX) mutations cause most classical lissencephaly, but different patterns of malformation. *Hum Mol Genet* **7**, 2029-2037.
 5. Dobyns, W.B., Reiner, O., Carrozzo, R. and Ledbetter, D.H. (1993) Lissencephaly: a human brain malformation associated with deletion of the LIS1 gene located at chromosome 17p13. *J Am med Ass* **270**, 2838-2842.
 6. Barkovich, A.J., Guerrini, R., Battaglia, G., Kalifa, G., N'Guyen, T., Parmeggiani, A., Santucci, M., Giovanardi-Rossi, P., Granata, T. and D'Incerti, L. (1994) Band heterotopia: correlation of outcome with magnetic resonance imaging parameters. *Ann Neurol* **36**, 609-17.
 7. Dobyns, W.B., Truwit, C.L., Ross, M.E., Matsumoto, N., Pilz, D.T., Ledbetter,

- D.H., Gleeson, J.G., Walsh, C.A. and Barkovich, A.J. (1999) Differences in the gyral pattern distinguish chromosome 17-linked and X-linked lissencephaly. *Neurology* **53**, 270-7.
8. Pilz, D.T., Macha, M.E., Precht, K.S., Smith, A.C., Dobyns, W.B. and Ledbetter, D.H. (1998) Fluorescence in situ hybridization analysis with LIS1 specific probes reveals a high deletion mutation rate in isolated lissencephaly sequence. *Genet Med* **1**, 29-33.
 9. Cardoso, C., Leventer, R.J., Dowling, J.J., Ward, H.L., Chung, J., Petras, K.S., Roseberry, J.A., Weiss, A.M., Das, S., Martin, C.L., Pilz, D.T., Dobyns, W.B. and Ledbetter, D.H. (2002) Clinical and molecular basis of classical lissencephaly: Mutations in the LIS1 gene (PAFAH1B1). *Hum Mutat* **19**, 4-15.
 10. Sapir, T., Eisenstein, M., Burgess, H.A., Horesh, D., Cahana, A., Aoki, J., Hattori, M., Arai, H., Inoue, K. and Reiner, O. (1999) Analysis of lissencephaly-causing LIS1 mutations. *Eur J Biochem* **266**, 1011-1020.
 11. Fogli, A., Guerrini, R., Moro, F., Fernandez-Alvarez, E., Livet, M.O., Renieri, A., Cioni, M., Pilz, D.T., Veggiotti, P., Rossi, E., Ballabio, A. and Carrozzo, R. (1999) Intracellular levels of the LIS1 protein correlate with clinical and neuroradiological findings in patients with classical lissencephaly. *Ann Neurol* **45**, 154-61.
 12. Hirotsune, S., Fleck, M.W., Gambello, M.J., Bix, G.J., Chen, A., Clark, G.D., Ledbetter, D.H., McBain, C.J. and Wynshaw-Boris, A. (1998) Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Nat Genet* **19**, 333-339.

13. Smith, D.S., Niethammer, M., Ayala, R., Zhou, Y., Gambello, M.J., Wynshaw-Boris, A. and Tsai, L.H. (2000) Regulation of cytoplasmic dynein behaviour and microtubule organization by mammalian Lis1. *Nat Cell Biol* **2**, 767-775.
14. Cahana, A., Escamez, T., Nowakowski, R.S., Hayes, N.L., Giacobini, M., von Holst, A., Shmueli, O., Sapir, T., McConnell, S.K., Wurst, W., Martinez, S. and Reiner, O. (2001) Targeted mutagenesis of Lis1 disrupts cortical development and LIS1 homodimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6429-6434.
15. Reiner, O., Cahana, A., Escamez, T. and Martinez, S. (2002) LIS1-no more no less. *Mol Psychiatry* **7**, 12-6.
16. Lo Nigro, C.L., Chong, C.S., Smith, A.C., Dobyns, W.B., Carozzo, R. and Ledbetter, D.H. (1997) Point mutations and an intragenic deletion in LIS1, the lissencephaly causative gene in isolated lissencephaly sequence and Miller-Dieker syndrome. *Hum Mol Genet* **6**, 157-164.
17. Pilz, D.T., Kuc, J., Matsumoto, N., Bodurtha, J., Bernadi, B., Tassinari, C.A., Dobyns, W.B. and Ledbetter, D.H. (1999) Subcortical band heterotopia in rare affected males can be caused by missense mutations in DCX (XLIS) or LIS1. *Hum Mol Genet* **8**, 1757-1760.
18. Leventer, R.J., Cardoso, C., Ledbetter, D.H. and Dobyns, W.B. (2001) LIS1 missense mutations cause milder lissencephaly phenotypes including a child with normal IQ. *Neurology* **57**, 416-422.
19. Neer, E.J., Schmidt, C.J., Nambudripad, R. and Smith, T.F. (1994) The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* **371**, 297-300.
20. Reiner, O. (2000) LIS1: Let's Interact Sometimes...(part 1). *Neuron* **28**, 633-636.

21. Emes, R.D. and Ponting, C.P. (2001) A new sequence motif linking lissencephaly, Treacher Collins and oral-facial-digital type 1 syndromes, microtubule dynamics and cell migration. *Hum Mol Genet* **10**, 2813-2820.
22. Matsumoto, N., Leventer, R.J., Kuc, J.A., Mewborn, S.K., Dudliceck, L.L., Ramocki, M.B., Pilz, D.T., Mills, P.L., Das, S., Ross, M.E., Ledbetter, D.H. and Dobyns, W.B. (2001) Mutation analysis of the DCX gene and genotype/phenotype correlation in subcortical band heterotopia. *Eur J Hum Genet* **9**, 5-12.
23. Morris, N.R., Efimov, V.P. and Xiang, X. (1998) Nuclear migration, nucleokinesis and lissencephaly. *Trends Cell Biol* **8**, 467-70.
24. Xiang, X., Osmani, A.H., Osmani, S.A., Xin, M. and Morris, N.R. (1995) NudF, a nuclear migration gene in *Aspergillus nidulans*, is similar to the human LIS-1 gene required for neuronal migration. *Mol Biol Cell* **6**, 297-310.
25. Efimov, V.P. and Morris, N.R. (2000) The LIS1-related NUDF protein of *Aspergillus nidulans* interacts with the coiled-coil domain of the NUDE/RO11 protein. *J Cell Biol* **150**, 681-8.
26. Sasaki, S., Shionoya, A., Ishida, M., Gambello, M., Yingling, J., Wynshaw-Boris, A. and Hirotsune, S. (2000) A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system. *Neuron* **28**, 681-696.
27. Niethammer, M., Smith, D.S., Ayala, R., Peng, J., Ko, J., Lee, M.-S., Morabito, M. and Tsai, L.-H. (2000) Nudel is a novel Cdk5 substrate that associates with Lis1 and cytoplasmic dynein. *Neuron* **28**, 697-711.
28. Kitagawa, M., Umezu, M., Aoki, J., Koizumi, H., Arai, H. and Inoue, K. (2000)

- Direct association of LIS1, the lissencephaly gene product, with a mammalian homologue of a fungal nuclear distribution protein, rNUDE. *FEBS Lett* **479**, 57-62.
29. Beckwith, S.M., Roghi, C.H., Liu, B. and Ronald Morris, N. (1998) The "8-kD" cytoplasmic dynein light chain is required for nuclear migration and for dynein heavy chain localization in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Biol* **143**, 1239-47.
 30. Xiang, X., Beckwith, S.M. and Morris, N.R. (1994) Cytoplasmic dynein is involved in nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2100-4.
 31. Xiang, X., Han, G., Winkelmann, D.A., Zuo, W. and Morris, N.R. (2000) Dynamics of cytoplasmic dynein in living cells and the effect of a mutation in the dynactin complex actin-related protein Arp1. *Curr Biol* **10**, 603-6.
 32. Faulkner, N.E., Dujardin, D.L., Tai, C.Y., Vaughan, K.T., O'Connell, C.B., Wang, Y. and Vallee, R.B. (2000) A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nat Cell Biol* **2**, 784-791.
 33. Tai, C.Y., Dujardin, D.L., Faulkner, N.E. and Vallee, R.B. (2002) Role of dynein, dynactin, and CLIP-170 interactions in LIS1 kinetochore function. *J Cell Biol* **11**, 11.
 34. Liu, Z., Xie, T. and Steward, R. (1999) Lis1, the *Drosophila* homolog of a human lissencephaly disease gene, is required for germline cell division and oocyte differentiation. *Development* **126**, 4477-4488.
 35. Swan, A., Nguyen, T. and Suter, B. (1999) *Drosophila* Lissencephaly-1 functions with Bic-D and dynein in oocyte determination and nuclear positioning. *Nat Cell*

- Biolog* **1**, 444-449.
36. Lei, Y. and Warrior, R. (2000) The drosophila lissencephaly1 (DLis1) gene is required for nuclear migration. *Dev Biol* **226**, 57-72.
 37. Willins, D.A., Xiang, X. and Morris, N.R. (1995) An alpha tubulin mutation suppresses nuclear migration mutations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **141**, 1287-1298.
 38. Sapir, T., Elbaum, M. and Reiner, O. (1997) Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit. *EMBO J* **16**, 6977-6984.
 39. Sapir, T., Cahana, A., Seger, R., Nekhai, S. and Reiner, O. (1999) LIS1 is a microtubule-associated phosphoprotein. *Eur J Biochem* **265**, 181-188.
 40. Feng, Y., Olson, E.C., Stukenberg, P.T., Flanagan, L.A., Kirschner, M.W. and Walsh, C.A. (2000) LIS1 regulates CNS lamination by interacting with mNudE, a central component of the centrosome. *Neuron* **28**, 665-679.
 41. Pierre, P., Scheel, J., Rickard, J.E. and Kreis, T.E. (1992) CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. *Cell* **70**, 887-900.
 42. Diamantopoulos, G.S., Perez, F., Goodson, H.V., Batelier, G., Melki, R., Kreis, T.E. and Rickard, J.E. (1999) Dynamic localization of CLIP-170 to microtubule plus ends is coupled to microtubule assembly. *J Cell Biol* **144**, 99-112.
 43. Perez, F., Diamantopoulos, G.S., Stalder, R. and Kreis, T.E. (1999) CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell* **96**, 517-27.
 44. Brunner, D. and Nurse, P. (2000) CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell* **102**, 695-704.

45. Valetti, C., Wetzel, D.M., Schrader, M., Hasbani, M.J., Gill, S.R., Kreis, T.E. and Schroer, T.A. (1999) Role of dynactin in endocytic traffic: effects of dynamin overexpression and colocalization with CLIP-170. *Mol Biol Cell* **10**, 4107-20.
46. Dujardin, D., Wacker, U.I., Moreau, A., Schroer, T.A., Rickard, J.E. and De Mey, J.R. (1998) Evidence for a role of CLIP-170 in the establishment of metaphase chromosome alignment. *J Cell Biol* **141**, 849-62.
47. Coquelle, F.M., Caspi, M., Cordelieres, F.P., Dompierre, J.P., Dujardin, D.L., Koifman, C., Martin, P., Hoogenraad, C.C., Akhmanova, A., Galjart, N., De Mey, J.R. and Reiner, O. (2002) LIS1, CLIP-170's key to the dynein/dynactin pathway. *Mol Cell Biol* **22**, 3089-102.
48. Caspi, M., Atlas, R., Kantor, A., Sapir, T. and Reiner, O. (2000) Interaction between LIS1 and doublecortin, two lissencephaly gene products. *Hum Mol Genet* **9**, 2205-2213.
49. Corbo, J.C., Deuel, T.A., Long, J.M., LaPorte, P., Tsai, E., Wynshaw-Boris, A. and Walsh, C.A. (2002) Doublecortin is required in mice for lamination of the hippocampus but not the neocortex. *J Neurosci* **22**, 7548-57.
50. Hattori, M., Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, N. and Inoue, K. (1994) Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor. *Nature* **370**, 216-218.
51. Manyá, H., Aoki, J., Watanabe, M., Adachi, T., Asou, H., Inoue, Y., Arai, H. and Inoue, K. (1998) Switching of platelet-activating factor acetylhydrolase catalytic subunits in developing rat brain. *J Biol Chem* **273**, 18567-18572.
52. Sheffield, P., Garrard, S., Caspi, M., Aoki, J., Inoue, K., Derewenda, U., Suter, B.,

- Reiner, O. and Derewenda, Z.S. (2000) Homologues of the α - and β -subunits of mammalian brain platelet-activating factor acetylhydrolase Ib in the *Drosophila melanogaster* genome. *Proteins* **39**, 1-8.
53. Garcia-Higuera, I., Fenoglio, J., Li, Y., Lewis, C., Panchenko, M.P., Reiner, O., Smith, T.F. and Neer, E.J. (1996) Folding of proteins with WD-repeats: comparison of six members of the WD-repeat superfamily to the G protein β subunit. *Biochemistry* **35**, 13985-13994.
54. Yarbrough, D., Wachter, R.M., Kallio, K., Matz, M.V. and Remington, S.J. (2001) Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 462-7.
55. Baird, G.S., Zacharias, D.A. and Tsien, R.Y. (2000) Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11984-9.
56. Taylor, J.P., Hardy, J. and Fischbeck, K.H. (2002) Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* **296**, 1991-5.
57. Horesh, D., Sapir, T., Francis, F., Caspi, M., Grayer Wolf, S., Elbaum, M., Chelly, J. and Reiner, O. (1999) Doublecortin, a stabilizer of microtubules. *Hum Mol Genet* **8**, 1599-1610.

Figure 1. **Tryptic cleavage.** LIS1 and the five point mutations were expressed in a rabbit reticulocyte system (TnT, Promega) labeled with S³⁵-methionine. The lysate was then subjected to limited trypsin cleavage. It can be noted that all mutated proteins except the N-terminal mutation F31S were completely degraded.

Table 1. **Protein half-life.** Cells were transfected with LIS1-FLAG-DsRed (wild type and mutated versions) and the proteins were expressed for 48 hours. Cyclohexamide was added as described in the methods section for the time points indicated. Cell lysates were separated on SDS-PAGE and Western blotted. The intensity of the bands was quantified in comparison to time point 0 which is represented as a 100% of protein level. LIS1 is stable for at least the first ten hours after cycloheximide addition while mutated proteins were less stable. Interestingly, co-transfection of GFP- α 1 stabilized the F31S mutation.

Table 2. **Interactions of LIS1 domains with different protein partners.** The WD domains, N-terminal and full length LIS1 were translated in reticulocyte system in the presence of S³⁵-methionine. The labeled fragments were then subjected to pulldown experiments with recombinant NudC, NudE, NudEL, α 1/2 and LIS1. NudE and NudEL interact mainly with the full-length protein and no region seems to be crucial for the interaction. In the case of NudC on the other hand, WD5 and 7 are involved in the interaction and bind even stronger than the whole protein. PAF-AH catalytic subunits α 1 and 2 interact weakly with LIS1 via WD2, 3 and 7 whereas dimerization is mediated through WD3, 6 and the N-terminal region. The regions that appear more important for interactions are marked in bold.

Figure 2. **α 1 effect on LIS1(F31S) solubilization.** HeLa cells were transiently transfected with plasmids encoding LIS1(F31S)-Flag-DsRed (a and b) or transiently co-transfected with plasmids encoding LIS1(F31S)-Flag-DsRed and GFP- α 1 (c and d). Panels a and c show the DsRed signal. Panels b and d show the GFP signal. LIS1(F31S)-Flag-DsRed overexpression gives rise to the formation of aggregates (a). GFP- α 1 overexpression promotes LIS1(F31S)-Flag-DsRed solubilization, while aggregates were still unaffected (c, compare to a). Bar, 10 μ m.

Figure 3. **a. Protein half-life.** Gel presentation of a half-life assay of LIS1 with mutation F31S in the presence and absence of GFP- α 1. The addition of the α 1 protein increased notably the stability of the mutated LIS1 form. **b. Solubilization of the aggregated LIS1 mutation F31S by overexpression of PAF-AH α 1.** Western blot analysis of the corresponding supernatant and pellet cells extracts transfected with LIS1 (F31S) in the presence and absence of GFP- α 1. Note that mutation F31S was partially insoluble but the addition of GFP- α 1 resulted in a soluble protein.

Figure 4. **Localization of LIS1 mutant proteins in HeLa cells.** HeLa cells were transiently transfected with plasmids encoding LIS1-Flag-DsRed (a, i and q), LIS1(D317H)-Flag-DsRed (e and m) or LIS1(G162S)-Flag-DsRed (u). The cells were labeled with the monoclonal anti-EB1 antibody (b, f, j and n) or with the anti-CLIP-170 TA antibody (r and v). Panels c, g, k, o, s and w are superimpositions of LIS1-Flag-DsRed (red) and EB1 or CLIP-170 (green) signals. Panels d, h, l, p, t and x correspond to DAPI signal. The insets show the co-localization of LIS1-Flag-DsRed and EB1 on microtubule tips. As expected, LIS1-Flag-DsRed is localized on centrosomes (arrows)

and microtubule tips in prophase (a-d), on spindle poles (see arrows) and kinetochores in prometaphase (i-l and q-t), and on cortical sites in late prometaphase (q-t, arrows). Unlike wild type LIS1, mutant proteins do not localize on centrosomes (e-h, arrows), microtubule tips (e-h), kinetochores (i-l), spindle poles (i-l and q-t) and cortical sites (u-x, arrows). All images are maximal-intensity projections of x/y optical section stacks, acquired by three-dimensional deconvolution microscopy. Bars, 5 μm .

Figure 5. **a. Schematic presentation of mutations.** LIS1 domains with the position of the mutations are shown schematically. LIS1 is composed of an N-terminal region of 95 amino acids that includes a Lis-H (LIS1 homology domain amino acids 8-37) and a coiled-coil domain (amino acids 51-79) important for dimerization. **b. Interactions of LIS1 domains with microtubules.** Binding to pre assembled tubulin was performed as described. The regions that are involved in the interaction are WD2, 5,6,7 and the N-terminal region. N= nocodazole treated, T= taxol treated, T-N = nocodazole treated subtracted from taxol treated.

Figure 6. **Pulldown assays.** FLAG-DsRed-LIS1 wild type or mutated were expressed in 293 cells (a and b). Alternatively, LIS1 and the other mutations were translated in rabbit reticulocyte lysate labeled with S^{35} -methionine (c). Cell extract or reticulocyte lysate were subjected to pulldown experiments using recombinant fusion proteins. **a.** GST pulldown with CLIP-170 (C-terminal region only), dynein heavy chain (DHC), NudC or DCX. In general all mutated LIS1 proteins interact with their partners to some degree. **b.** 6XHis-NudE and NudEL were used for the pulldown assay and both recombinant proteins interacted with all the mutated LIS1 forms. **c.** *In vitro* translated LIS1 (wild type

and mutated) was pulled down by GST- α 2. Note that only the normal LIS1 protein interacted with its enzymatic-catalytic partner.

Figure 7. **Yeast two hybrid.** Yeast transformation was performed as described using normal LIS1 and the five mutations as baits. The interaction was checked for α 1, CLIP-170 (C-terminal region), and NudEL. CLIP-170 clearly interacted with the normal form only. The α 1 protein interacted weakly with mutations F31S and G162S. NudEL also shows interaction with these same mutations however the binding is as strong as with the wild type LIS1.

Figure 8. **Co-Immunoprecipitation.** FLAG-DsRed-LIS1 wild type or mutated were expressed in 293 cells alone (a and c) or together with each of the tested partners (b, d, e, f and g). Co-immunoprecipitation was done with α -FLAG antibodies (a, b, d, e, f and g) or with α -LIS1 antibody (polyclonal) (c). **a.** Endogenous LIS1 was tested for dimerization with the transfected LIS1 (wild type and mutants). **b.** The interactions between GFP- α 1 and the different LIS1 forms were examined as described. **c.** Endogenous NudC was used to check the interactions with the different LIS1 forms. **d.** A portion of the dynein heavy chain fused to a myc-tag was used to assay its interaction with FLAG-DsRed-LIS1 wild type or mutated. **e** and **f.** Myc-tagged NudE and NudEL were co-transfected together with the different LIS1 forms in order to test the interactions with them. **g.** The C-terminal portion of CLIP-170 fused to GFP was used to examine its interaction with FLAG-DsRed-LIS1 wild type or mutated.

Table 3. **Summary of LIS1 mutations properties.** All experimental results of the biochemical properties of mutated LIS1 proteins are listed. The different binding assays were scored according to band intensity in the autoradiograms or color intensity in the two hybrid system (arbitrary units). No interaction = 0 and interaction is graded from 1 (weakest) to 4 (strongest). Protein folding was estimated by the trypsin cleavage data were full protection = 4 (LIS1), partial protection = 3 (F31S) and degradation = 0 (all the other mutations). The stability of the different LIS1 forms was measured by protein half life assay. Scoring was done according to protein levels six hours after cyclohexamide addition (percentage of time point 0 hours): 50-60% = 0, 61-70% = 1, 71-80% = 2, 81-90% = 3, 91-100% = 4.

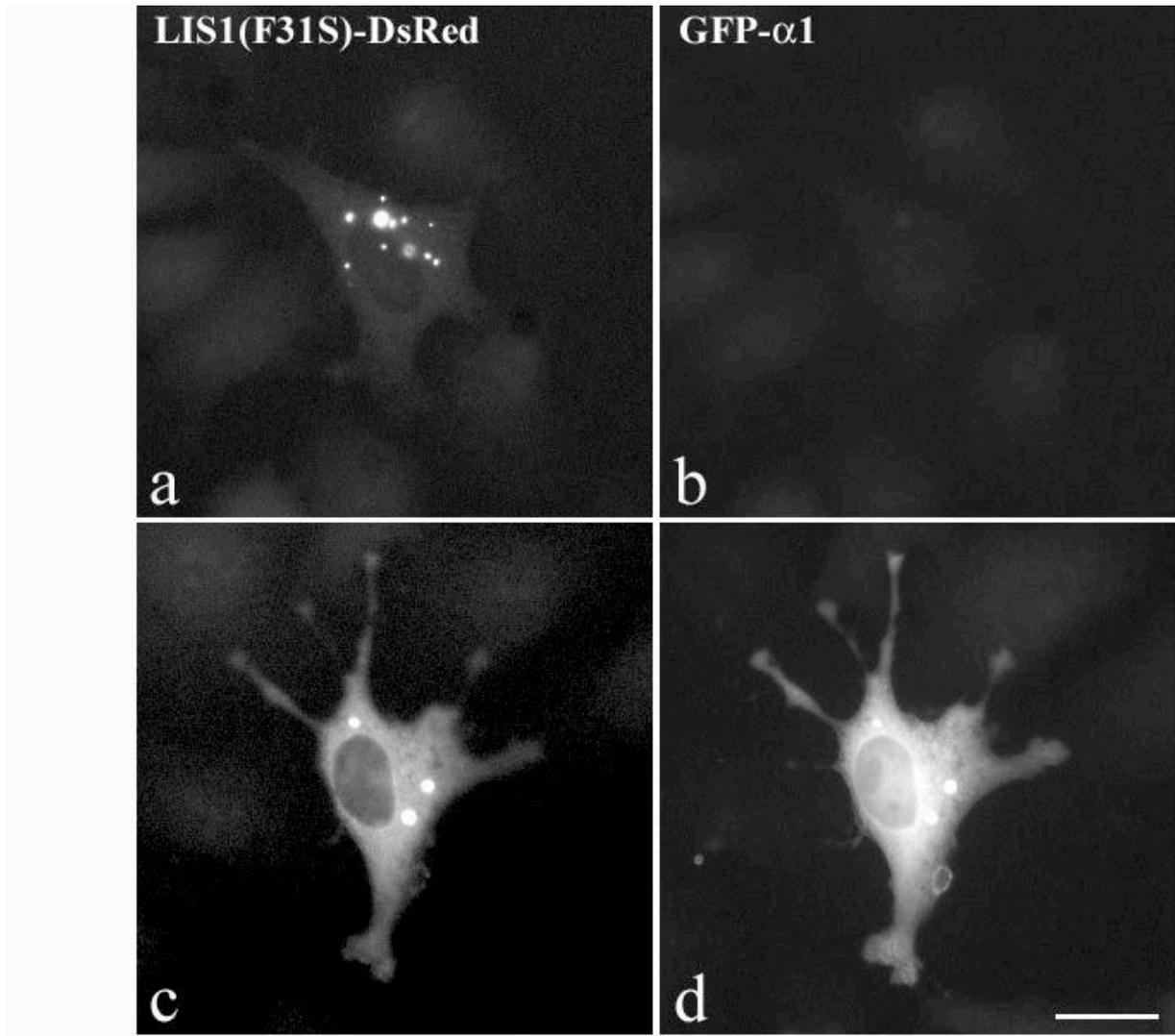
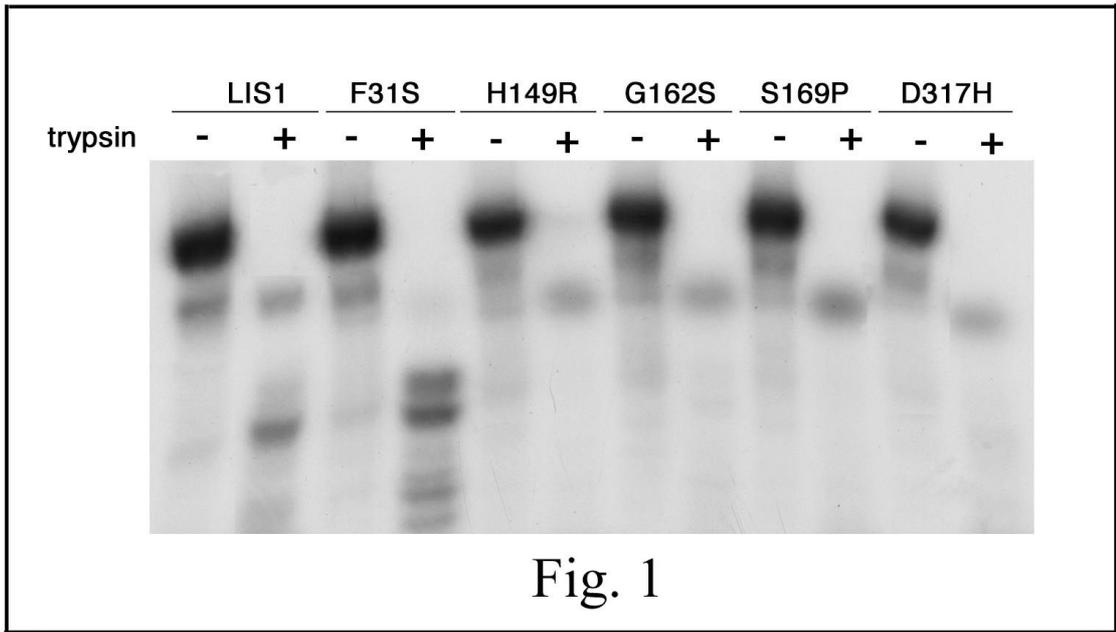
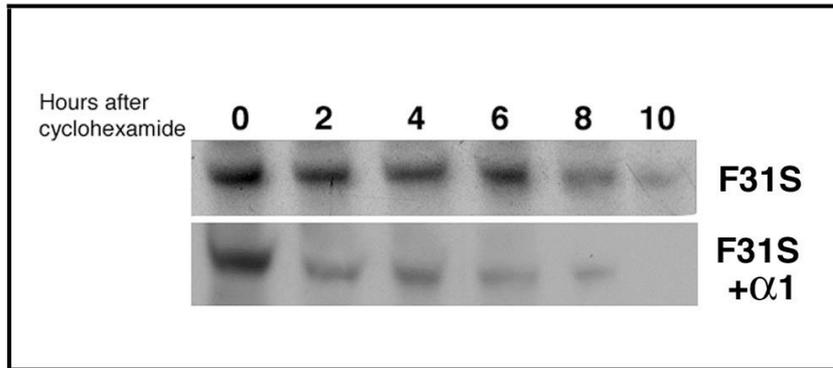


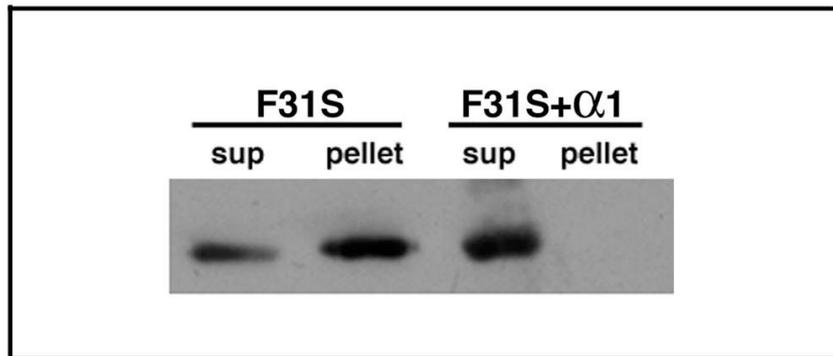
Fig. 2

Fig. 3

a



b



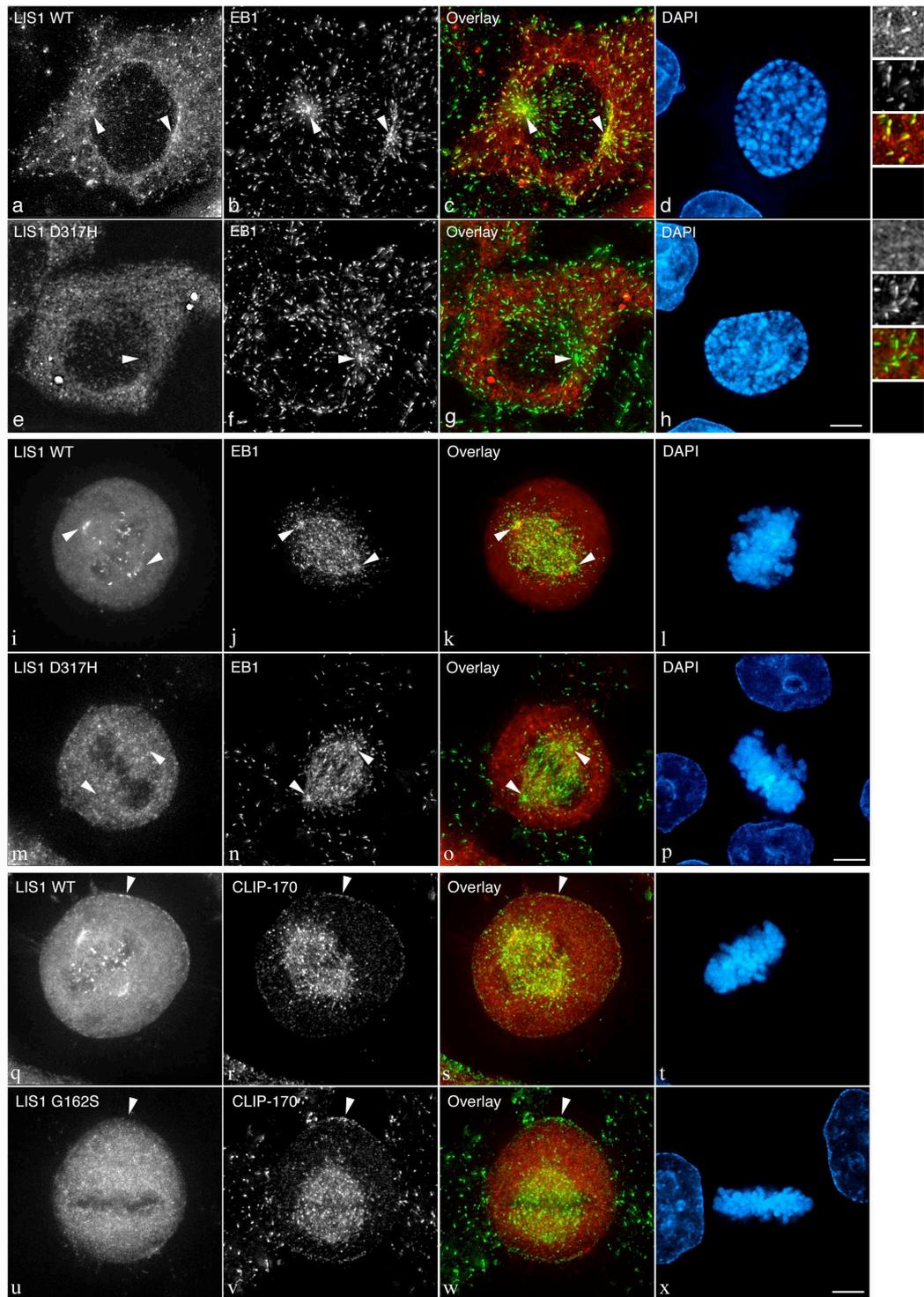
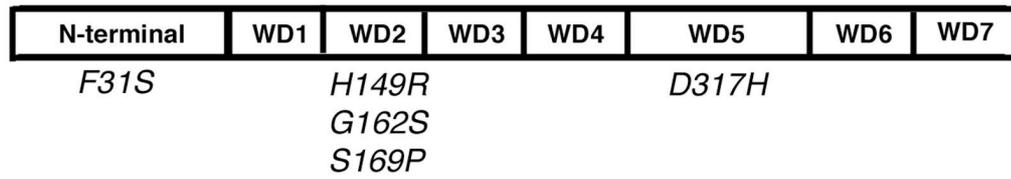


Fig. 4

a

LIS1



b

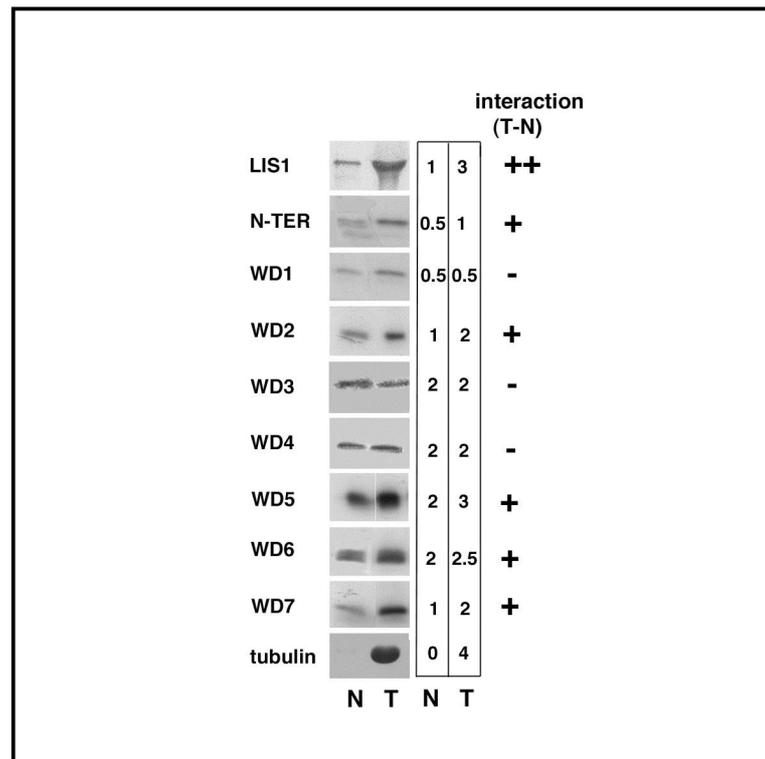


Fig. 5

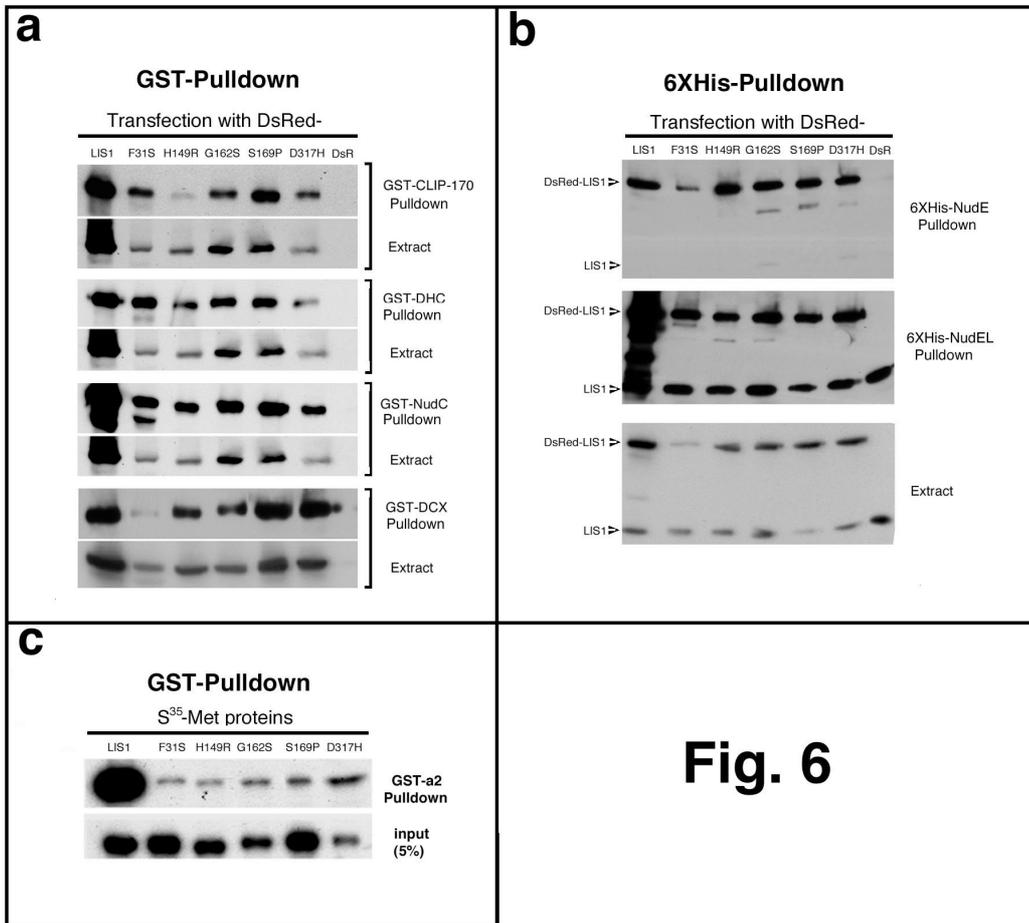
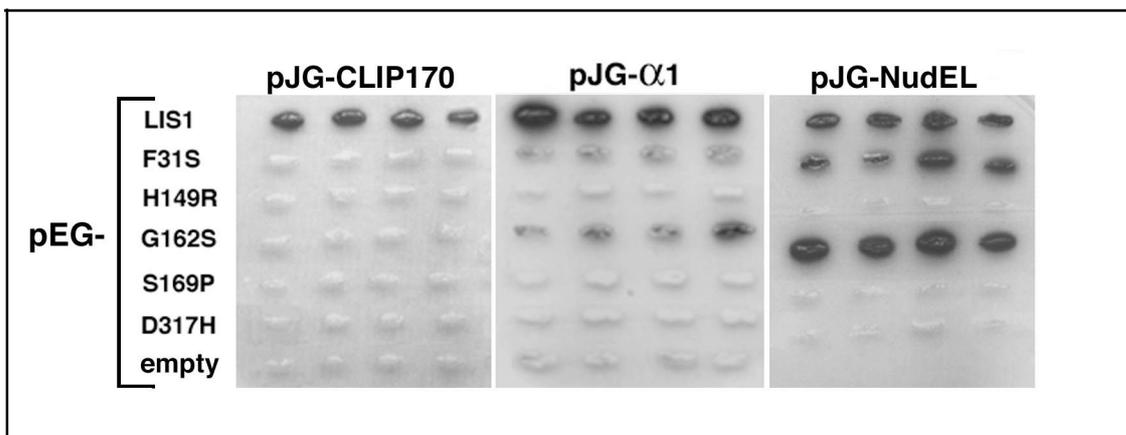


Fig. 7



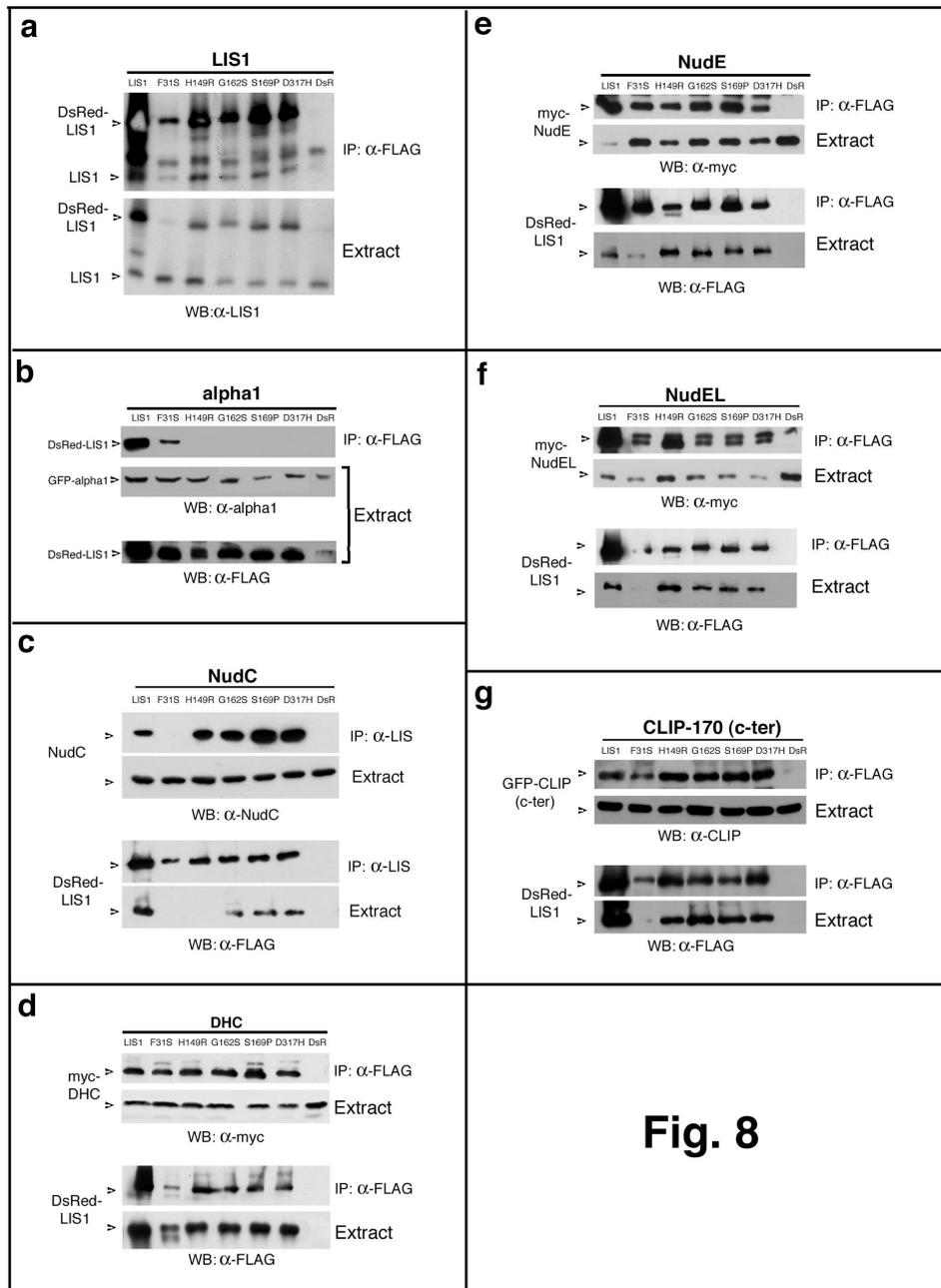


Fig. 8

Table 1

| | Grade* | 0 hours | 2 hours | 4 hours | 6 hours | 8 hours | 10 hours |
|---------------------------------------|------------|---------|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| LIS1 | WT | 100 | 98 ± 14.1 | 111 ± 4.9 | 110 ± 2.8 | 101 ± 15.5 | 105 ± 7 |
| F31S | 4a1 | 100 | 82.5 ± 17 | 77 ± 5.6 | 69.5 ± 9.1 | 61 ± 4.2 | 56.5 ± 2.1 |
| H149R | 3a | 100 | 88 ± 5.6 | 80 ± 4.2 | 77 ± 0 | 74 ± 4.2 | |
| G162S | 4a2 | 100 | 94 ± 8.5 | 92 ± 7.4 | 91 ± 12 | 77 ± 7.8 | 71.4 ± 1.4 |
| S169P | 6a | 100 | 64 ± 2.5 | 53 ± 0 | 51.9 ± 1 | 52 ± 8 | |
| D317H | 4a1 | 100 | 97 ± 5 | 96 ± 1 | 93 ± 4 | 86 ± 1 | 86 ± 1 |
| F31S+α 1 | NA | 100 | 99 ± 3 | 93 ± 1 | 102 ± 6 | 91 ± 9 | 76 ± 0 |

* LIS grade according to Leventer *et al.*, 2001

Table 2

| | LIS1 | WD1 | WD2 | WD3 | WD4 | WD5 | WD6 | WD7 | N-Ter |
|-------------------|------------|------|------------|------------|-------|------------|------------|--------------|------------|
| NudC | 13% | 19% | 6% | 10% | 15% | 32% | 16% | 35% | 12% |
| NudE | 54% | 4% | 2% | 7% | 4% | 4% | 3% | 3% | 0% |
| NudEL | 81% | 8% | 2% | 7% | 3.5% | 4% | 3.5% | 3% | 0% |
| $\alpha 1/2$ | 16% | 15% | 18% | 17% | 0% | 12% | 12% | 18% | 10% |
| LIS1 | 87% | 25% | 16% | 60% | 0% | 0% | 55% | 19% | 74% |
| ¹ DCX | 78% | 6.8% | 6.8% | 6% | 17.7% | 6.9% | 5.4% | 34.3% | 2.8% |
| ² CLIP | 82% | 2.8% | 11.6% | 5.9% | 18.5% | 9.3% | 6.8% | 2.4% | 3.2% |

1. Caspi *et al.*, 2000
2. Coquelle *et al.*, 2002

Table 3

| | Binding assays | LIST1 | $\alpha 1/2$ | DCX | NudC | Nude | Nudel | DHC | CLIP | folding | stability | total | grade |
|-------|----------------|-------|--------------|-----|------|------|-------|-----|------|---------|-----------|-------|-------|
| LIS1 | 2H | NA | 3 | NA | NA | NA | 3 | NA | 3 | 4 | 4 | 51 | WT |
| | CO-IP | 3 | 3 | NA | 2 | 2 | 3 | 1 | 1 | | | | |
| | PD | NA | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 2 | 3 | | | | |
| F31S | 2H | NA | 1 | NA | NA | NA | 3 | NA | 0 | 3 | 1 | 29 | 4a1 |
| | CO-IP | 2 | 1 | NA | 0 | 2 | 2 | 2 | 1 | | | | |
| | PD | NA | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | | | | |
| H149R | 2H | NA | 0 | NA | NA | NA | 0 | NA | 0 | 0 | 2 | 28 | 3a |
| | CO-IP | 3 | 0 | NA | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | | | | |
| | PD | NA | 1 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 1 | | | | |
| G162S | 2H | NA | 1 | NA | NA | NA | 3 | NA | 0 | 0 | 4 | 37 | 4a2 |
| | CO-IP | 3 | 0 | NA | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | | | | |
| | PD | NA | 1 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | | | | |
| S169P | 2H | NA | 0 | NA | NA | NA | 0 | NA | 0 | 0 | 0 | 28 | 6a |
| | CO-IP | 3 | 0 | NA | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | | | | |
| | PD | NA | 1 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | | | | |
| D317H | 2H | NA | 0 | NA | NA | NA | 0 | NA | 0 | 0 | 4 | 32 | 4a1 |
| | CO-IP | 3 | 0 | NA | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | | | | |
| | PD | NA | 1 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | | | | |

DISCUSSION

et

PERSPECTIVES

DISCUSSION et PERSPECTIVES

1) LIS1 est un adaptateur entre la CLIP-170 et le complexe moteur dynéine cytoplasmique – dynactine (D/D)

Nos résultats indiquent sans ambiguïté une interaction directe entre la CLIP-170 et LIS1 *in vitro* et *in vivo*. Cette interaction met en jeu principalement le motif de type « doigt de zinc » (ou boîte CCHC) distal de la CLIP-170 et, dans une moindre mesure, le motif proximal. Cela confirme la capacité que possède la boîte CCHC, que l'on trouve aussi, par exemple, dans la protéine NCp7 du virus HIV1 (Berg, 1986), d'interagir avec d'autres protéines (de Rocquigny *et al.*, 1997). A ce propos, compte tenu de la remarquable conservation des deux boîtes CCHC entre la CLIP-170 et la protéine NCp7, il est fort probable que celle-ci interagisse directement avec LIS1. Il serait donc intéressant de tester cette interaction et, le cas échéant, d'étudier le rôle que pourrait avoir le complexe D/D dans la physiologie de ce rétrovirus (infection, transport vers le noyau, multiplication, etc...).

Dans le passé, un certain nombre de données indirectes suggéraient l'existence d'un lien fonctionnel étroit entre la CLIP-170 et le complexe moteur D/D. Cela avait conduit le groupe de Thomas Kreis puis le nôtre à proposer un modèle selon lequel la CLIP-170 devait faciliter la prise en charge d'un organite (endosome et kinétochore) par le complexe D/D (voir chapitre IV) (Dujardin *et al.*, 1998; Rickard et Kreis, 1996). Nos travaux ont permis de faire enfin la preuve de l'existence d'un lien physique entre le complexe D/D et la CLIP-170. Ce lien est la protéine LIS1, dont certaines mutations sont connues pour perturber la migration des neurones au cours du développement du néocortex (Reiner *et al.*, 2002). La nature de ce lien n'est pas sans importance au regard de la régulation de la dynéine cytoplasmique et de la dynactine. En effet, la protéine LIS1 n'est vraisemblablement pas un co-facteur « permanent » de la dynéine cytoplasmique comme semble l'être la dynactine, et elle peut interagir avec plusieurs éléments du complexe moteur (Reiner, 2000). LIS1 peut effectivement interagir directement avec la dynamitine, avec la DIC et avec deux domaines distincts de la DHC (Tai *et al.*, 2002) ; le premier est responsable de l'homodimérisation de la DHC et du recrutement des DICs et des LICs, et le second est la région motrice (P1-loop). Aussi, en interagissant avec LIS1, la CLIP-170 pourrait participer à la régulation du complexe moteur en « renseignant », par exemple, la région motrice de la présence ou non d'un organite à

transporter. Réciproquement, LIS1 pourrait « renseigner » la CLIP-170 de l'état du complexe D/D. Elle pourrait, par exemple, participer à l'inhibition de l'interaction de la CLIP-170 avec le MT lorsque le moteur est prêt à générer le transport, c'est-à-dire au moment où la dynactine interagit avec le cargo et la dynéine cytoplasmique avec les MTs. Ces deux hypothèses ne sont pas nécessairement mutuellement exclusives et placeraient LIS1 au cœur de la régulation de complexe moteur D/D.

De nombreuses investigations seront encore nécessaires pour comprendre de quelles façons sont régulées toutes les interactions de LIS1 que nous connaissons. Par exemple, un point intéressant serait de savoir avec quelles autres protéines LIS1 peut interagir lorsqu'elle est, par ailleurs, associée à la CLIP-170.

2) Fonctions de la CLIP-170 au kinétochore.

Nous avons montré que la CLIP-170 et LIS1 se co-localisent sur la corona des kinétochores en prémétaphase, comme le complexe D/D (Echeverri *et al.*, 1996) et de façon indépendante des MTs. Le travail présenté dans cette thèse a permis aussi d'établir la hiérarchie des interactions entre la dynéine cytoplasmique, la dynactine, LIS1 et la CLIP-170 sur le kinétochore. En effet, la sur-expression de la dynamitine provoque une délocalisation partielle de la dynactine et une disparition presque totale de tout signal correspondant à la dynéine cytoplasmique, à la CLIP-170 et à LIS1. De plus, le recrutement de la CLIP-170 sur les kinétochores dépend de son domaine d'interaction avec LIS1. Sachant, en outre que LIS1 interagit directement avec la CLIP-170 et avec le complexe D/D, ce dernier devrait recruter en premier lieu LIS1 qui, à son tour, recruterait la CLIP-170. Cependant, nous ne savons toujours pas si ces protéines sont recrutées séquentiellement sur le kinétochore ou comme un large complexe assemblé au préalable dans le cytosol. Nous envisageons, pour répondre à cette question, de suivre en vidéo-microscopie tri-dimensionnelle le comportement de chacune des protéines dont on vient de parler au cours de la mitose.

Une incohérence vient toutefois ternir le tableau. En effet, l'équipe de Richard Vallee a publié récemment une étude qui montre notamment que la sur-expression d'un fragment amino-terminal de LIS1, contenant le domaine « coiled coil », dans des cellules COS7 déplace la protéine LIS1 endogène du kinétochore mais pas la CLIP-170 (Tai *et al.*, 2002). Cela dit, cette équipe semble avoir utilisé, dans cette étude, un anticorps phospho-spécifique dirigé contre LIS1 ce qui rend difficile l'interprétation (voir plus loin, paragraphe à propos de la phosphorylation).

Les deux domaines d'interaction avec les MTs de la CLIP-170 jouent un rôle important dans la congression des chromosomes sur la plaque équatoriale (Dujardin *et al.*, 1998). Aussi, il est envisageable que le recrutement de la CLIP-170 sur les kinétochores par le complexe LIS1-dynéine cytoplasmique-dynactine constitue une étape clef de ce processus. En effet, la CLIP-170 pourrait permettre une interaction initiale et transitoire entre les kinétochores et les MTs facilitant le déclenchement des premiers mouvements rapides des chromosomes vers les pôles. Toutefois, nous ne savons pas si la dynéine cytoplasmique joue effectivement un rôle dans la mono-orientation (mouvement rapide initial vers un pôle sur la paroi d'un MT, chapitre I.C.2). Des études sont en cours au laboratoire visant à suivre dans le temps et en trois dimensions les mouvements des chromosomes au cours de la mitose, dans un contexte moléculaire modifié (siRNA contre la CLIP-170, micro-injection d'anticorps contre différentes régions de la CLIP-170, etc...). Cela devrait nous permettre d'identifier l'étape (ou les étapes) à laquelle la dynéine cytoplasmique et la CLIP-170 interviennent. Toutefois, l'expérience montre qu'il est difficile d'étudier une telle fonction de la dynéine cytoplasmique dans le contexte d'une cellule. En effet, ce moteur moléculaire a de multiples fonctions tant en interphase qu'en mitose et perturber son fonctionnement dans une cellule revient à perturber de nombreux processus cellulaires en même temps, ce qui résulte en un phénotype complexe difficile à analyser. C'est pourquoi nous avons entrepris, au début de cette thèse, de réaliser un système acellulaire dont le but était de réduire, *in vitro*, les fonctions de la dynéine cytoplasmique à celles qu'elle exerce sur le kinétochore. Plus précisément, nous souhaitons assembler *in vitro* des kinétochores fonctionnels en incubant des noyaux de cellules HeLa purifiés dans un extrait soluble de cellules HeLa bloquées en mitose. Nous sommes parvenus à réaliser un système acellulaire « humain » permettant de provoquer *in vitro* la rupture de l'enveloppe nucléaire et la condensation de la chromatine. Cependant, les défauts de reproductibilité de cette expérience nous ont contraint à abandonner provisoirement le projet. Néanmoins, en l'associant à des tests fonctionnels *in vitro* (mouvements des kinétochores le long de MTs stabilisés...), ce système constituerait un moyen prometteur d'analyser très précisément la (ou les) fonction(s) du complexe D/D au kinétochore (en s'affranchissant des autres fonctions de ce moteur) et de révéler surtout la nature de la contribution respective des co-facteurs avérés ou présumés de ce moteur comme LIS1, la CLIP-170 et peut-être le couple EB1/APC. Par exemple, il serait intéressant de savoir si la CLIP-170 quitte le complexe D/D lorsque le mouvement est amorcé, car cela nous permettrait de mieux connaître la séquence

des événements menant au déplacement d'organites et d'approcher le mode de fonctionnement précis du complexe moteur.

3) La CLIP-170 s'accumule aux sites corticaux et pourrait ainsi participer à l'orientation du fuseau de division

Chez de nombreux organismes, le complexe D/D est impliqué dans le positionnement et l'orientation du fuseau de division, tant en mitose qu'au cours de la méiose. De façon remarquable, les études réalisées chez la levure bourgeonnante ont permis de montrer que les MTs astériens glissent le long du cortex du bourgeon, lors de l'ultime étape menant au positionnement du fuseau dans l'encolure du bourgeon (Adames et Cooper, 2000; Carminati et Stearns, 1997). Les auteurs de ce travail ont montré également que la dynéine cytoplasmique est nécessaire à ce glissement sans pour autant réussir à détecter ce moteur moléculaire au cortex du bourgeon. Cela dit, par analogie avec le transport de vésicules le long de la paroi des MTs, il est aisé d'imaginer que le complexe D/D ancré au cortex puisse se mouvoir le long des MTs astériens, conduisant au glissement de ces derniers et au déplacement du fuseau vers le cortex. Cela est d'autant plus probable que la dynéine cytoplasmique interagit avec Num1p, une protéine corticale dont l'intégrité est nécessaire aux glissements dont nous venons de parler.

Chez les mammifères, la phénoménologie est moins claire, toutefois notre équipe a démontré dans le passé que la dynéine cytoplasmique et la dynactine se localisent sur les MTs astériens et s'accumulent au cortex de cellules épithéliales MDCK, sous les jonctions serrées, au même niveau que l'axe du fuseau de division métaphasique (Busson *et al.*, 1998). Cette dernière localisation correspond à ce que l'on nomme maintenant dans la littérature : les sites corticaux. Les sites corticaux dépendent de l'intégrité de l'actine et des MTs. De plus, lors de cette même étude, il a été montré que les MTs astériens entrent en contact avec les sites corticaux dans ces cellules, suggérant leur implication dans le processus d'orientation du fuseau. Cela dit, cette étude n'avait pas permis de décrire avec précision le mode d'interaction (latérale « end-on », etc...) faute d'une analyse faite sur des cellules vivantes. Toutefois, une nouvelle étude, non encore publiée, réalisée dans notre laboratoire, sur des cellules MDCK en culture exprimant stablement du chimère GFP-tubuline, n'a pas permis d'observer de glissement de MT le long du cortex (Dompierre, J.P, *et al.*, en préparation).

Récemment, l'équipe de Richard Vallee a montré une co-localisation de LIS1 et du complexe D/D sur les sites corticaux. De plus, la sur-expression de LIS1 dans les cellules

MDCK, provoque une désorganisation de ces sites corticaux corrélés à une désorganisation des MTs astériens et à un dysfonctionnement du processus d'orientation du fuseau de division (Faulkner *et al.*, 2000). Ce travail constituait la première démonstration du rôle du complexe moteur D/D, localisé au cortex cellulaire, dans l'orientation du fuseau mitotique.

Nous avons montré, au cours de cette thèse, que la CLIP-170 se co-localise également avec LIS1 aux sites corticaux. Aussi, compte tenu de sa localisation aux bouts (+) des MTs, de ces fonctions dans le contrôle de la dynamique des MTs et de son interaction avec LIS1, la CLIP-170 pourrait être impliqué dans les mécanismes de guidage, d'ancrage et de stabilisation transitoire des MTs astériens aux sites corticaux. Ainsi, nous pouvons imaginer un modèle qui impliquerait l'interaction entre la CLIP-170 et LIS1 comme un événement initial permettant la capture d'un MT aux sites corticaux. De façon analogue au modèle décrit pour le transport des vésicules d'endocytose (Rickard et Kreis, 1996), la dynéine cytoplasmique prendrait ensuite le relais et générerait une force de traction sur les MTs, conduisant au déplacement du fuseau mitotique. Dans ce modèle, LIS1 est encore au cœur du dispositif, puisqu'il participerait au recrutement des MTs au cortex et pourrait constituer un relais d'informations entre le complexe D/D et la CLIP-170.

A défaut d'un glissement, la capture des MTs aux sites corticaux pourrait provoquer la dépolymérisation des MTs, tout en maintenant l'ancrage, de façon similaire à la première étape du mécanisme de positionnement de fuseau mitotique, chez la levure *S. cerevisiae*, qui implique le couple Bim1p-Kar9p (chapitre I.C.2.).

Le gène *par-1* code une kinase de type sérines/thréonines qui se localise au cortex postérieur des embryons de *Caenorhabditis elegans* au stade une cellule. Cette kinase est impliquée dans l'établissement de la polarité des embryons (Guo et Kemphues, 1995). MARK1 et MARK2, les orthologues de PAR-1 chez les mammifères, sont impliquées dans la phosphorylation de certaines MAPs, comme Tau, MAP4 et MAP2C, sur des sites consensuels du type KXGS (X, correspondant à n'importe quel résidu aminoacide). La phosphorylation de ces MAPs par les MARKs entraîne leur détachement des MTs et provoque l'augmentation de la dynamique de ces derniers (Drewes *et al.*, 1995). De plus, la sur-expression de MARK1 ou de MARK2 dans des cellules CHO provoque une altération importante du réseau de MTs (phénotype moins sévère dans le cas de MARK1) (Drewes *et al.*, 1997). Aussi, chez *C. elegans*, PAR-1 pourrait localement (pôle postérieur de l'embryon) déstabiliser les MTs et participer, de cette façon, aux déplacements polarisés du fuseau de division vers le cortex. Ce mécanisme pourrait être conservé chez les mammifères. En effet, mPAR-1, un orthologue de

PAR-1 chez les mammifères découvert parallèlement, se localise exclusivement sur le domaine latéral des cellules MDCK, comme les sites corticaux, et semble contrôler la localisation de la E-cadhérine dans ces cellules (Bohm *et al.*, 1997). Dans ce contexte, le complexe D/D pourrait maintenir les MTs ancrés au cortex et mPAR-1 pourrait déclencher la dépolymérisation conduisant au déplacement du fuseau de division. L'existence d'un site KXGS dans la CLIP-170, en amont du premier motif CAP-GLY, suggère que la CLIP-170 pourrait être un substrat des MARKs et constituerait ainsi un effecteur de ces kinases dans un mécanisme de déstabilisation locale des MTs. Ce mécanisme pourrait contribuer aussi à l'orientation des MTs. Nous avons généré des mutants ponctuels de la CLIP-170 au niveau du motif KXGS, mais leur sur-expression, dans des cellules HeLa ou COS7, ne semble pas affecter le réseau de MTs. L'étude de la dynamique des MTs dans ces cellules sur-exprimantes nous permettra probablement de tester plus avant cette hypothèse.

Il reste à identifier les mécanismes qui permettent l'assemblage et la localisation des sites corticaux à la *zonula adherens*, ainsi que les voies de signalisation impliquées. Compte tenu de l'implication de la petite GTPase Cdc42 dans la réorientation du MTOC vers le front de migration dans les astrocytes et les fibroblastes, il est envisageable que l'orientation (et positionnement) du fuseau de division, qui peut se résumer à la réorientation de deux centrosomes, dépendent de la même voie de signalisation (Chapitre I.C.1) (Etienne-Manneville et Hall, 2001; Palazzo *et al.*, 2001). Ceci est d'autant plus plausible que la dynéine cytoplasmique est clairement en aval de Cdc42 dans les cellules en migration.

4) LIS1 est probablement une +TIP qui recrute le complexe D/D sur les bouts (+) des MTs

Contrairement à NUDF, son orthologue chez *A. nidulans*, LIS1 n'avait jamais été détecté sur les bouts (+) des MTs (chapitre III). Nous avons démontré que, dans des cellules HeLa transfectées, la chimère LIS1-Flag-DsRed se co-localise avec la CLIP-170 sur les bouts (+) des MTs. Nous avons aussi montré que ce recrutement de LIS1 sur les bouts (+) des MTs dépend du domaine carboxy-terminal de la CLIP-170, contenant les deux motifs CCHC.

Plusieurs études ont montré, par ailleurs, que le recrutement de la dynactine sur les bouts (+) des MTs est également dépendant du domaine carboxy-terminal de la CLIP-170 (Hoogenraad *et al.*, 2002; Komarova *et al.*, 2002; Valetti *et al.*, 1999). De plus, la sur-expression de LIS1 dans des cellules COS7 déplace la p150Glued des bouts (+) des MTs (Faulkner *et al.*, 2000). Cela laisse supposer que la CLIP-170 recrute la dynactine sur les

bouts (+) des MTs par l'intermédiaire de LIS1. Toutefois, l'équipe de Kevin Vaughan a publié récemment un article visant notamment à montrer que la p150^{Glued} peut être recruté sur les bouts (+) des MTs indépendamment de la CLIP-170 et d'EB1. Pour conclure cela, cette équipe a comparé le signal d'une GFP-p150^{Glued} aux signaux correspondant aux protéines CLIP-170 et EB1 endogènes. En effet, le signal aux bouts (+) des MTs de la chimère GFP-p150^{Glued}, exprimée dans des cellules COS7, est relativement différent de ceux qui correspondent à la CLIP-170 et à EB1 endogènes : d'une part, le signal « GFP » recouvre une longueur plus importante à l'extrémité des MTs que les protéines endogènes EB1 et CLIP-170 et, d'autre part, le marquage correspondant à la CLIP-170 et à EB1 est ponctué, tandis que le signal « GFP » est continu. Cependant, les auteurs comparent un signal issu de la transfection d'un plasmide codant pour une chimère GFP à des signaux correspondant à des protéines endogènes révélées par une expérience d'immunofluorescence indirecte. Bien que les auteurs aient recherché des cellules exprimant faiblement la chimère GFP-p150^{Glued}, il ne s'agit pas moins d'une transfection transitoire dont on ne peut pas maîtriser le niveau d'expression. p150^{Glued} est capable d'interagir directement, par l'intermédiaire de son domaine CAP-GLY, avec les MTs, mais nous persistons à penser que le recrutement dynamique de cette protéine aux bouts (+) des MTs se fait par l'intermédiaire de la CLIP-170. Cela dit, il n'est pas complètement impossible que la p150^{Glued} existe sous différentes formes dans la cellule : une forme isolée capable de se comporter comme une +TIP et d'être recruté directement aux bouts (+) des MTs ou de se co-polymériser avec les dimères de tubuline ; et une autre forme associée au complexe dynactine qui dépendrait de la CLIP-170 pour son recrutement à ces mêmes bouts (+) des MTs.

Le recrutement de LIS1 aux bouts (+) des MTs doit probablement participer au transport d'organelles depuis la périphérie des cellules vers le centre. La CLIP-170 pourrait « charger » l'organelle sur l'extrémité des MTs pour ensuite permettre au moteur moléculaire d'initier le transport. LIS1 pourrait là encore servir de relais entre le complexe D/D et la CLIP-170.

Implications dans le contrôle de la dynamique des MTs :

La CLIP-170 est une +TIP dont l'activité semble permettre d'augmenter la fréquence de sauvetage des MTs (Komarova *et al.*, 2002). Cela constitue très probablement, une fonction directe que possède la CLIP-170, et peut-être d'autres CLIPs comme la CLIP-115,

vis-à-vis des MTs. Néanmoins, en interagissant avec des protéines corticales comme IQGAP1 (Fukata *et al.*, 2002) ou des protéines localisées au voisinage du front de migration comme les CLASPs (Akhmanova *et al.*, 2001), la CLIP-170 semble capable de stabiliser les MTs en empêchant leur dépolymérisation. Cette stabilisation apparaît transitoire, au moins dans le cas d'IQGAP1, et pourrait faciliter la prise en charge de cette stabilisation par des mécanismes durables (Coiffe, cf. chapitre I.C.1). De cette façon, l'activité de facteur anti-catastrophe de Tip1p (Brunner et Nurse, 2000), l'orthologue de la CLIP-170 chez *S. pombe*, semble conciliable avec l'activité de promotion des événements de sauvetage mise en évidence pour la CLIP-170 (Komarova *et al.*, 2002).

Nos résultats suggèrent que la CLIP-170 est capable d'interagir à la fois avec les bouts (+) des MTs et les accumulations corticales de dynéine cytoplasmique/dynactine *via* certainement LIS1. Aussi, par ce biais, la CLIP-170 pourrait stabiliser transitoirement les MTs d'une façon analogue aux couples CLIPs-CLASPs et au couple CLIP-170-IQGAP1.

Pour tester cette hypothèse, il faudra analyser la dynamique des MTs *in vitro* et *in vivo* en présence ou non des différentes protéines que l'on vient d'évoquer, c'est-à-dire IQGAP1, les CLASPs et LIS1.

5) La phosphorylation de LIS1 pourrait réguler son interaction avec la CLIP-170

La sur-expression de la CLIP-170 dans des cellules COS7, provoque la formation de faisceaux de MTs épais. Ceux-ci sont recouverts de CLIP-170 exogènes et endogènes, de dynactine (p150Glued et Arp1), LIS1 et d'une sous population de protéines LIS1 phosphorylées (phospho-LIS1), reconnue par l'anticorps 210. Si l'on sur-exprime une CLIP-170 dont le site d'interaction avec LIS1 est invalidé, le recrutement de phospho-LIS1 et de la dynactine sur les MTs est considérablement diminué.

Ces expériences tendent à confirmer que la CLIP-170 recrute la dynactine sur les MTs, probablement par l'intermédiaire de phospho-LIS1. Elles montrent aussi que phospho-LIS1, contrairement à LIS1 non phosphorylé, est recruté sur les MTs par la CLIP-170. Cela suggère donc que l'interaction entre LIS1 et la CLIP-170 est régulée par la phosphorylation de LIS1. Plus précisément, la phosphorylation de LIS1 sur un ou plusieurs résidus contenus dans l'épitope de 210 permettrait l'interaction avec la CLIP-170

En cherchant les sites de phosphorylation impliqués dans cette interaction, nous nous sommes rendu à l'évidence que, parmi les trois sites de phosphorylations potentiels, seule la

sérine 70 semble jouer un rôle dans le recrutement de LIS1 sur les bouts (+) des MTs et pourrait donc réguler l'interaction entre LIS1 et la CLIP-170. Cela étant, c'est la mutation S70E, mimant la phosphorylation, qui inhibe le recrutement de LIS1 au bouts (+) des MTs et non S70A. Toutefois les mutants S70A et S70E ainsi que la protéine WT sont recrutées de la même façon aux kinétochores (données non montrées).

Plusieurs hypothèses sont envisageables. La régulation de l'interaction entre LIS1 et la CLIP-170 pourrait dépendre d'une combinaison de phosphorylations que nous n'avons pas encore étudiée. Par exemple, il est possible que la phosphorylation des sérines 70 et 81 et de la thréonine 80 permettent le recrutement sur les bouts (+) des MTs alors que la seule phosphorylation de la sérine 70 l'empêche. De façon non exclusive, l'anticorps 210 pourrait reconnaître un épitope conformationnel plutôt qu'un phospho-épitope. Cette conformation locale spécifique reconnue par le 210 serait alors sous le contrôle de phosphorylations qui ne seraient pas forcément toutes localisées dans la région reconnue par l'anticorps 210. Alternativement, en substituant la sérine 70 par un acide glutamique, nous avons peut-être changé artificiellement la conformation locale ou générale de LIS1 et empêché ainsi son interaction avec la CLIP-170 et avec peut-être d'autres protéines.

Dans un proche avenir, nous envisageons de rechercher la ou les kinases responsables de la phosphorylation de LIS1, capables de contrôler son association avec la CLIP-170. Dans le chapitre III, nous évoquons deux kinases susceptibles de phosphoryler LIS1 : une kinase de 50 kDa associée aux MTs et la caséine kinase II (Sapir *et al.*, 1999). Notre attention sera portée plus avant sur ces deux candidats.

La CLIP-170 est aussi une phosphoprotéine. La phosphorylation de certains résidus sérines au voisinage des deux CAP-GLY, par une kinase inconnue associée aux MTs, inhibe l'interaction de la CLIP-170 avec les MTs (Rickard et Kreis, 1991). En revanche, la phosphorylation par la kinase FRAP de certains résidus situés dans le domaine amino-terminal de la CLIP-170 a un effet opposé (chapitre IV) (Choi *et al.*, 2002). Par ailleurs, il existe dans la CLIP-170 de nombreux sites consensuels, très conservés, de phosphorylation par des kinases connues. Néanmoins, nous ne connaissons pas la (ou les) fonctions de ces phosphorylations, si elles existent. Il existe notamment un site consensuel de phosphorylation par CDK1 (p34Cdc2), situé juste avant le « coiled-coil », très conservé depuis les levures jusque chez l'humain. Dans la plupart des CLIPs, on peut trouver aussi un site consensuel phosphorylable par AKT (pKB) très conservé dans le domaine en « coiled-coil ». Nous envisageons dans un proche avenir d'étudier ses sites plus en détail, en générant

tout d'abord des mutants dits de phosphorylation afin d'étudier leurs fonctions *in vitro* et *in vivo*. A l'entrée en mitose, la CDK1 est très active et provoque une augmentation importante de la dynamique des MTs. Aussi, compte tenu de sa capacité de contrôler la fréquence de sauvetage, la CLIP-170 pourrait constituer l'un des effecteurs de CDK1 en mitose et contribuer à l'augmentation de la dynamique des MTs. Cela faciliterait le processus qualifié de « recherche et capture » qui semble essentiel à l'assemblage du fuseau de division (chapitre I.C.2.).

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abraham, R. T. (1998). Mammalian target of rapamycin: immunosuppressive drugs uncover a novel pathway of cytokine receptor signaling, *Curr Opin Immunol* *10*, 330-6.
- Adames, N. R., and Cooper, J. A. (2000). Microtubule interactions with the cell cortex causing nuclear movements in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Cell Biol* *149*, 863-74.
- Aepfelbacher, M., Essler, M., Huber, E., Czech, A., and Weber, P. C. (1996). Rho is a negative regulator of human monocyte spreading, *J Immunol* *157*, 5070-5.
- Afshar, K., Barton, N. R., Hawley, R. S., and Goldstein, L. S. (1995). DNA binding and meiotic chromosomal localization of the *Drosophila nod* kinesin-like protein, *Cell* *81*, 129-38.
- Ahmad, F. J., Echeverri, C. J., Vallee, R. B., and Baas, P. W. (1998). Cytoplasmic dynein and dynactin are required for the transport of microtubules into the axon, *J Cell Biol* *140*, 391-401.
- Akhmanova, A., Hoogenraad, C. C., Drabek, K., Stepanova, T., Dortland, B., Verkerk, T., Vermeulen, W., Burgering, B. M., De Zeeuw, C. I., Grosveld, F., and Galjart, N. (2001). CLASPs Are CLIP-115 and -170 Associating Proteins Involved in the Regional Regulation of Microtubule Dynamics in Motile Fibroblasts, *Cell* *104*, 923-935.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., and Watson, J. D. (1994). *Molecular Biology of the Cell*, 3rd ed., Garland Publishing, New York.
- Allan, V. (1996). Motor proteins: a dynamic duo, *Curr Biol* *6*, 630-3.
- Allan, V. (2000). Dynactin, *Curr Biol* *10*, R432.
- Allan, V. J. (1995). Protein phosphatase 1 regulates the cytoplasmic dynein-driven formation of endoplasmic reticulum networks in vitro, *J Cell Biol* *128*, 879-91.
- Allan, V. J., and Vale, R. (1994). Movement of membrane tubules along microtubules in vitro: evidence for specialised sites of motor attachment., *Journal of cell science* *107*, 1885-97.
- Allen, W. E., Jones, G. E., Pollard, J. W., and Ridley, A. J. (1997). Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages, *J Cell Sci* *110*, 707-20.
- Alvarez, L. A., Yamamoto, T., Wong, B., Resnick, T. J., Llana, J. F., and Moshe, S. L. (1986). Miller-Dieker syndrome: a disorder affecting specific pathways of neuronal migration, *Neurology* *36*, 489-93.
- Andersen, S. S. (2000). Spindle assembly and the art of regulating microtubule dynamics by MAPs and Stathmin/Op18, *Trends Cell Biol* *10*, 261-7.
- Andersen, S. S., Ashford, A. J., Tournebize, R., Gavet, O., Sobel, A., Hyman, A. A., and Karsenti, E. (1997). Mitotic chromatin regulates phosphorylation of Stathmin/Op18, *Nature* *389*, 640-3.
- Andersen, S. S., Buendia, B., Dominguez, J. E., Sawyer, A., and Karsenti, E. (1994). Effect on microtubule dynamics of XMAP230, a microtubule-associated protein present in *Xenopus laevis* eggs and dividing cells, *J Cell Biol* *127*, 1289-99.
- Andersen, S. S., and Karsenti, E. (1997). XMAP310: a *Xenopus* rescue-promoting factor localized to the mitotic spindle, *J Cell Biol* *139*, 975-83.
- Andrieux, A., Salin, P. A., Vernet, M., Kujala, P., Baratier, J., Gory-Faure, S., Bosc, C., Pointu, H., Proietto, D., Schweitzer, A., Denarier, E., Klumperman, J., and Job, D. (2002). The suppression of brain cold-stable microtubules in mice induces synaptic defects associated with neuroleptic-sensitive behavioral disorders, *Genes Dev* *16*, 2350-64.
- Aniento, F., Emans, N., Griffiths, G., and Gruenberg, J. (1993). Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes, *J Cell Biol* *123*, 1373-87.
- Anton, E. S., Kreidberg, J. A., and Rakic, P. (1999). Distinct functions of alpha3 and alpha(v) integrin receptors in neuronal migration and laminar organization of the cerebral cortex, *Neuron* *22*, 277-89.

- Arai, H., Koizumi, H., Aoki, J., and Inoue, K. (2002). Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase (PAF-AH), *J Biochem (Tokyo)* *131*, 635-40.
- Arnal, I., Karsenti, E., and Hyman, A. A. (2000). Structural transitions at microtubule ends correlate with their dynamic properties in *Xenopus* egg extracts, *J Cell Biol* *149*, 767-74.
- Asai, D. J., and Koonce, M. P. (2001). The dynein heavy chain: structure, mechanics and evolution, *Trends Cell Biol* *11*, 196-202.
- Askham, J. M., Moncur, P., Markham, A. F., and Morrison, E. E. (2000). Regulation and function of the interaction between the APC tumour suppressor protein and EB1, *Oncogene* *19*, 1950-8.
- Askham, J. M., Vaughan, K. T., Goodson, H. V., and Morrison, E. E. (2002). Evidence That an Interaction between EB1 and p150(Glued) Is Required for the Formation and Maintenance of a Radial Microtubule Array Anchored at the Centrosome, *Mol Biol Cell* *13*, 3627-45.
- Aumais, J. P., Tunstead, J. R., McNeil, R. S., Schaar, B. T., McConnell, S. K., Lin, S. H., Clark, G. D., and Yu-Lee, L. Y. (2001). NudC associates with Lis1 and the dynein motor at the leading pole of neurons, *J Neurosci* *21*, RC187.
- Baas, P. W. (1999). Microtubules and neuronal polarity: lessons from mitosis, *Neuron* *22*, 23-31.
- Bajer, A. S., Cypher, C., Mole-Bajer, J., and Howard, H. M. (1982). Taxol-induced anaphase reversal: evidence that elongating microtubules can exert a pushing force in living cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* *79*, 6569-73.
- Bamburg, J. R., Bray, D., and Chapman, K. (1986). Assembly of microtubules at the tip of growing axons, *Nature* *321*, 788-90.
- Banks, J. D., and Heald, R. (2001). Chromosome movement: Dynein-out at the kinetochore, *Curr Biol*, R128-31.
- Barkalow, K., Hamasaki, T., and Satir, P. (1994). Regulation of 22S dynein by a 29-kD light chain, *J Cell Biol* *126*, 727-35.
- Bashour, A. M., Fullerton, A. T., Hart, M. J., and Bloom, G. S. (1997). IQGAP1, a Rac- and Cdc42-binding protein, directly binds and cross-links microfilaments, *J Cell Biol* *137*, 1555-66.
- Bayer, S. A., and Altman, J. (1991). Development of the endopiriform nucleus and the claustrum in the rat brain, *Neuroscience* *45*, 391-412.
- Bayer, S. A., Altman, J., Russo, R. J., Dai, X. F., and Simmons, J. A. (1991). Cell migration in the rat embryonic neocortex, *J Comp Neurol* *307*, 499-516.
- Beck, K. A., Buchanan, J. A., Malhotra, V., and Nelson, W. J. (1994). Golgi spectrin: identification of an erythroid beta-spectrin homolog associated with the Golgi complex, *J Cell Biol* *127*, 707-23.
- Beck, K. A., Buchanan, J. A., and Nelson, W. J. (1997). Golgi membrane skeleton: identification, localization and oligomerization of a 195 kDa ankyrin isoform associated with the Golgi complex, *J Cell Sci* *110 (Pt 10)*, 1239-49.
- Beckwith, S. M., Roghi, C. H., Liu, B., and Ronald Morris, N. (1998). The "8-kD" cytoplasmic dynein light chain is required for nuclear migration and for dynein heavy chain localization in *Aspergillus nidulans*, *J Cell Biol* *143*, 1239-47.
- Behrens, R., and Nurse, P. (2002). Roles of fission yeast tealp in the localization of polarity factors and in organizing the microtubular cytoskeleton, *J Cell Biol* *157*, 783-93.
- Bellugi, U., Bihrlé, A., Jernigan, T., Trauner, D., and Doherty, S. (1990). Neuropsychological, neurological, and neuroanatomical profile of Williams syndrome, *Am J Med Genet Suppl* *6*, 115-25.
- Belmont, L. D., and Mitchison, T. J. (1996). Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules, *Cell* *84*, 623-31.
- Benashski, S. E., Harrison, A., Patel-King, R. S., and King, S. M. (1997). Dimerization of the highly conserved light chain shared by dynein and myosin V, *J Biol Chem* *272*, 20929-35.
- Berg, J. M. (1986). Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins, *Science* *232*, 485-7.

- Berg, J. M. (1990). Zinc fingers and other metal-binding domains. Elements for interactions between macromolecules, *J Biol Chem* *265*, 6513-6.
- Berlin, V., Styles, C. A., and Fink, G. R. (1990). BIK1, a protein required for microtubule function during mating and mitosis in *Saccharomyces cerevisiae*, colocalizes with tubulin, *J Cell Biol* *111*, 2573-86.
- Bernat, R. L., Borisy, G. G., Rothfield, N. F., and Earnshaw, W. C. (1990). Injection of anticentromere antibodies in interphase disrupts events required for chromosome movement at mitosis, *J Cell Biol* *111*, 1519-33.
- Bernat, R. L., Delannoy, M. R., Rothfield, N. F., and Earnshaw, W. C. (1991). Disruption of centromere assembly during interphase inhibits kinetochore morphogenesis and function in mitosis, *Cell* *66*, 1229-38.
- Berrueta, L., Kraeft, S. K., Tirmauer, J. S., Schuyler, S. C., Chen, L. B., Hill, D. E., Pellman, D., and Bierer, B. E. (1998). The adenomatous polyposis coli-binding protein EB1 is associated with cytoplasmic and spindle microtubules, *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 10596-601.
- Berrueta, L., Tirmauer, J. S., Schuyler, S. C., Pellman, D., and Bierer, B. E. (1999). The APC-associated protein EB1 associates with components of the dynactin complex and cytoplasmic dynein intermediate chain, *Curr Biol* *9*, 425-8.
- Bershadsky, A., Chausovsky, A., Becker, E., Lyubimova, A., and Geiger, B. (1996). Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction, *Curr Biol* *6*, 1279-89.
- Bershadsky, A. D., Vaisberg, E. A., and Vasiliev, J. M. (1991). Pseudopodial activity at the active edge of migrating fibroblast is decreased after drug-induced microtubule depolymerization, *Cell Motil Cytoskeleton* *19*, 152-8.
- Bilbe, G., Delabie, J., Brügggen, J., Richener, H., Asselbergs, F. A. M., Cerletti, N., Sorg, C., Odink, K., Tarcsay, L., Wiesendanger, W., DeWolf-Peeters, C., and Shipman, R. (1992). Restin: a novel intermediate filament-associated protein highly expressed in the Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease, *EMBO journal* *11*, 2103-13.
- Blangy, A., Arnaud, L., and Nigg, E. A. (1997). Phosphorylation by p34cdc2 protein kinase regulates binding of the kinesin-related motor HsEg5 to the dynactin subunit p150, *J Biol Chem* *272*, 19418-24.
- Blocker, A., Severin, F. F., Burkhardt, J. K., Bingham, J. B., Yu, H., Olivo, J. C., Schroer, T. A., Hyman, A. A., and Griffiths, G. (1997). Molecular requirements for bi-directional movement of phagosomes along microtubules, *J Cell Biol* *137*, 113-29.
- Bobinnec, Y., Khodjakov, A., Mir, L. M., Rieder, C. L., Edde, B., and Bornens, M. (1998). Centriole disassembly in vivo and its effect on centrosome structure and function in vertebrate cells, *J Cell Biol* *143*, 1575-89.
- Bornens, M. (2002). Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms, *Curr Opin Cell Biol* *14*, 25-34.
- Bosc, C., Denarier, E., andrieux, A., and Job, D. (1999). STOP proteins, *Cell Struct Funct* *24*, 393-399.
- Bowman, A. B., Patel-King, R. S., Benashski, S. E., McCaffery, J. M., Goldstein, L. S., and King, S. M. (1999). *Drosophila* roadblock and *Chlamydomonas* LC7: a conserved family of dynein-associated proteins involved in axonal transport, flagellar motility, and mitosis, *J Cell Biol* *146*, 165-80.
- Bray, D., Thomas, C., and Shaw, G. (1978). Growth cone formation in cultures of sensory neurons, *Proc Natl Acad Sci U S A* *75*, 5226-9.
- Brittis, P. A., Meiri, K., Dent, E., and Silver, J. (1995). The earliest patterns of neuronal differentiation and migration in the mammalian central nervous system, *Exp Neurol* *134*, 1-12.
- Browning, H., Hayles, J., Mata, J., Aveline, L., Nurse, P., and McIntosh, J. R. (2000). Tea2p Is a Kinesin-like Protein Required to Generate Polarized Growth in Fission Yeast, *J Cell Biol* *151*, 15-28.
- Brunet, S., and Vernos, I. (2001). Chromosome motors on the move: From motion to spindle checkpoint activity, *EMBO Rep* *2*, 669-73.
- Brunner, D., and Nurse, P. (2000). CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast, *Cell* *102*, 695-704.

- Bruno, K. S., Tinsley, J. H., Minke, P. F., and Plamann, M. (1996). Genetic interactions among cytoplasmic dynein, dynactin, and nuclear distribution mutants of *Neurospora crassa*, *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 4775-80.
- Bu, W., and Su, L. K. (2001). Regulation of microtubule assembly by human EB1 family proteins, *Oncogene* *20*, 3185-92.
- Budde, P. P., Kumagai, A., Dunphy, W. G., and Heald, R. (2001). Regulation of Op18 during spindle assembly in *Xenopus* egg extracts, *J Cell Biol* *153*, 149-58.
- Burkhardt, J. K., Echeverri, C. J., Nilsson, T., and Vallee, R. B. (1997). Overexpression of the dynamin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution, *J Cell Biol* *139*, 469-84.
- Burns, R. G. (1991). Alpha-, beta-, and gamma-tubulins: sequence comparisons and structural constraints, *Cell Motil Cytoskeleton* *20*, 181-9.
- Busson, S., Dujardin, D., Moreau, A., Dompierre, J., and De Mey, J. R. (1998). Dynein and dynactin are localized to astral microtubules and at cortical sites in mitotic epithelial cells, *Current biology* *8*, 541-544.
- Cahana, A., Escamez, T., Nowakowski, R. S., Hayes, N. L., Giacobini, M., von Holst, A., Shmueli, O., Sapir, T., McConnell, S. K., Wurst, W., Martinez, S., and Reiner, O. (2001). Targeted mutagenesis of *Lis1* disrupts cortical development and LIS1 homodimerization, *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 6429-34.
- Cahana, A., and Reiner, O. (1999). LIS1 and platelet-activating factor acetylhydrolase (Ib) catalytic subunits, expression in the mouse oocyte and zygote, *FEBS Lett* *451*, 99-102.
- Campbell, K. S., Cooper, S., Dessing, M., Yates, S., and Buder, A. (1998). Interaction of p59^{fyn} kinase with the dynein light chain, Tctex-1, and colocalization during cytokinesis, *J Immunol* *161*, 1728-37.
- Campbell, M. S., and Gorbsky, G. J. (1995). Microinjection of mitotic cells with the 3F3/2 anti-phosphoepitope antibody delays the onset of anaphase, *J Cell Biol* *129*, 1195-204.
- Canman, J. C., Hoffman, D. B., and Salmon, E. D. (2000). The role of pre- and post-anaphase microtubules in the cytokinesis phase of the cell cycle, *Curr Biol* *10*, 611-4.
- Caplow, M., and Shanks, J. (1996). Evidence that a single monolayer tubulin-GTP cap is both necessary and sufficient to stabilize microtubules, *Mol Biol Cell* *7*, 663-75.
- Cardoso, C., Leventer, R. J., Dowling, J. J., Ward, H. L., Chung, J., Petras, K. S., Roseberry, J. A., Weiss, A. M., Das, S., Martin, C. L., Pilz, D. T., Dobyns, W. B., and Ledbetter, D. H. (2002). Clinical and molecular basis of classical lissencephaly: Mutations in the LIS1 gene (PAFAH1B1), *Hum Mutat* *19*, 4-15.
- Carlier, M. F. (1989). Role of nucleotide hydrolysis in the dynamics of actin filaments and microtubules, *Int Rev Cytol* *115*, 139-70.
- Carlier, M. F., and Pantaloni, D. (1981). Kinetic analysis of guanosine 5'-triphosphate hydrolysis associated with tubulin polymerization, *Biochemistry* *20*, 1918-24.
- Carminati, J. L., and Stearns, T. (1997). Microtubules orient the mitotic spindle in yeast through dynein-dependent interactions with the cell cortex, *J Cell Biol* *138*, 629-41.
- Casella, J. F., Craig, S. W., Maack, D. J., and Brown, A. E. (1987). Cap Z(36/32), a barbed end actin-capping protein, is a component of the Z-line of skeletal muscle, *J Cell Biol* *105*, 371-9.
- Caspi, M., Atlas, R., Kantor, A., Sapir, T., and Reiner, O. (2000). Interaction between LIS1 and doublecortin, two lissencephaly gene products, *Hum Mol Genet* *9*, 2205-2213.
- Cassimeris, L. (1993). Regulation of microtubule dynamic instability, *Cell Motil Cytoskeleton* *26*, 275-81.
- Cassimeris, L. (2002). The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers, *Curr Opin Cell Biol* *14*, 18-24.
- Cassimeris, L., Rieder, C. L., and Salmon, E. D. (1994). Microtubule assembly and kinetochore directional instability in vertebrate monopolar spindles: implications for the mechanism of chromosome congression, *J Cell Sci* *107*, 285-97.

- Cassimeris, L., and Salmon, E. D. (1991). Kinetochore microtubules shorten by loss of subunits at the kinetochores of prometaphase chromosomes, *J Cell Sci* *98*, 151-8.
- Caudron, N., Valiron, O., Usson, Y., Valiron, P., and Job, D. (2000). A reassessment of the factors affecting microtubule assembly and disassembly in vitro, *J Mol Biol* *297*, 211-20.
- Centonze, V. E., and Borisy, G. G. (1991). Pole-to-chromosome movements induced at metaphase: sites of microtubule disassembly, *J Cell Sci* *100*, 205-11.
- Charrasse, S., Schroeder, M., Gauthier-Rouviere, C., Ango, F., Cassimeris, L., Gard, D. L., and Larroque, C. (1998). The TOGp protein is a new human microtubule-associated protein homologous to the Xenopus XMAP215, *J Cell Sci* *111*, 1371-83.
- Chen, R. H., Waters, J. C., Salmon, E. D., and Murray, A. W. (1996). Association of spindle assembly checkpoint component XMAP2 with unattached kinetochores, *Science* *274*, 242-6.
- Chenn, A., and McConnell, S. K. (1995). Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis, *Cell* *82*, 631-41.
- Choi, J. H., Adames, N. R., Chan, T. F., Zeng, C., Cooper, J. A., and Zheng, X. F. (2000). TOR signaling regulates microtubule structure and function, *Curr Biol* *10*, 861-4.
- Choi, J. H., Bertram, P. G., Drenan, R., Carvalho, J., Zhou, H. H., and Zheng, X. F. (2002). The FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) is a CLIP-170 kinase, *EMBO Rep* *13*, 13.
- Chong, S. S., Pack, S. D., Roschke, A. V., Tanigami, A., Carrozzo, R., Smith, A. C., Dobyns, W. B., and Ledbetter, D. H. (1997). A revision of the lissencephaly and Miller-Dieker syndrome critical regions in chromosome 17p13.3, *Hum Mol Genet* *6*, 147-55.
- Chong, S. S., Tanigami, A., Roschke, A. V., and Ledbetter, D. H. (1996). 14-3-3 epsilon has no homology to LIS1 and lies telomeric to it on chromosome 17p13.3 outside the Miller-Dieker syndrome chromosome region, *Genome Res* *6*, 735-41.
- Chou, T. B., and Perrimon, N. (1996). The autosomal FLP-DFS technique for generating germline mosaics in *Drosophila melanogaster*, *Genetics* *144*, 1673-9.
- Chretien, D., Fuller, S. D., and Karsenti, E. (1995). Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates, *J Cell Biol* *129*, 1311-28.
- Chuang, J. Z., Milner, T. A., and Sung, C. H. (2001). Subunit heterogeneity of cytoplasmic dynein: Differential expression of 14 kDa dynein light chains in rat hippocampus, *J Neurosci* *21*, 5501-12.
- Clark, S. W., and Meyer, D. I. (1992). Centractin is an actin homologue associated with the centrosome, *Nature* *359*, 246-50.
- Clark, S. W., Staub, O., Clark, I. B., Holzbaur, E. L., Paschal, B. M., Vallee, R. B., and Meyer, D. I. (1994). Beta-centractin: characterization and distribution of a new member of the centractin family of actin-related proteins, *Mol Biol Cell* *5*, 1301-10.
- Compton, D. A. (2000). Spindle assembly in animal cells, *Annu Rev Biochem* *69*, 95-114.
- Cook, T. A., Nagasaki, T., and Gundersen, G. G. (1998). Rho guanosine triphosphatase mediates the selective stabilization of microtubules induced by lysophosphatidic acid, *J Cell Biol* *141*, 175-85.
- Cooke, C. A., Bazett-Jones, D. P., Earnshaw, W. C., and Rattner, J. B. (1993). Mapping DNA within the mammalian kinetochore, *J Cell Biol* *120*, 1083-91.
- Cooke, C. A., Bernat, R. L., and Earnshaw, W. C. (1990). CENP-B: a major human centromere protein located beneath the kinetochore, *J Cell Biol* *110*, 1475-88.
- Cooke, C. A., Schaar, B., Yen, T. J., and Earnshaw, W. C. (1997). Localization of CENP-E in the fibrous corona and outer plate of mammalian kinetochores from prometaphase through anaphase, *Chromosoma* *106*, 446-55.
- Criswell, P. S., Ostrowski, L. E., and Asai, D. J. (1996). A novel cytoplasmic dynein heavy chain: expression of DHC1b in mammalian ciliated epithelial cells, *J Cell Sci* *109*, 1891-8.

- Cunniff, J., Chiu, Y. H., Morris, N. R., and Warrior, R. (1997). Characterization of DnudC, the *Drosophila* homolog of an *Aspergillus* gene that functions in nuclear motility, *Mech Dev* *66*, 55-68.
- Curmi, P. A., Andersen, S. S., Lachkar, S., Gavet, O., Karsenti, E., Knossow, M., and Sobel, A. (1997). The stathmin/tubulin interaction in vitro, *J Biol Chem* *272*, 25029-36.
- Daub, H., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Sobel, A., and Hall, A. (2001). Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16, *J Biol Chem* *276*, 1677-80.
- Dawe, A. L., Caldwell, K. A., Harris, P. M., Morris, N. R., and Caldwell, G. A. (2001). Evolutionarily conserved nuclear migration genes required for early embryonic development in *Caenorhabditis elegans*, *Dev Genes Evol* *211*, 434-41.
- De Rocquigny, H., Caneparo, A., Dong, C. Z., Delaunay, T., and Roques, B. P. (2000). Generation of monoclonal antibodies specifically directed against the proximal zinc finger of HIV type 1 NCp7, *AIDS Res Hum Retroviruses* *16*, 1259-67.
- de Rocquigny, H., Petitjean, P., Tanchou, V., Decimo, D., Drouot, L., Delaunay, T., Darlix, J. L., and Roques, B. P. (1997). The zinc fingers of HIV nucleocapsid protein NCp7 direct interactions with the viral regulatory protein Vpr, *J Biol Chem* *272*, 30753-9.
- De Zeeuw, C. I., Hertzberg, E. L., and Mugnaini, E. (1995). The dendritic lamellar body: a new neuronal organelle putatively associated with dendrodendritic gap junctions, *J Neurosci* *15*, 1587-604.
- De Zeeuw, C. I., Hoogenraad, C. C., Goedknecht, E., Hertzberg, E., Neubauer, A., Grosveld, F., and Galjart, N. (1997). CLIP-115, a novel brain-specific cytoplasmic linker protein, mediates the localization of dendritic lamellar bodies, *Neuron* *19*, 1187-99.
- Denarier, E., Fourest-Lieuvin, A., Bosc, C., Pirollet, F., Chapel, A., Margolis, R. L., and Job, D. (1998). Nonneuronal isoforms of STOP protein are responsible for microtubule cold stability in mammalian fibroblasts, *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 6055-60.
- Dennis, P. B., Fumagalli, S., and Thomas, G. (1999). Target of rapamycin (TOR): balancing the opposing forces of protein synthesis and degradation, *Curr Opin Genet Dev* *9*, 49-54.
- Dennis, P. B., and Thomas, G. (2002). Quick guide: target of rapamycin, *Curr Biol* *12*, R269.
- Desai, A., Verma, S., Mitchison, T. J., and Walczak, C. E. (1999). Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes, *Cell* *96*, 69-78.
- Devarajan, P., Stabach, P. R., De Matteis, M. A., and Morrow, J. S. (1997). Na,K-ATPase transport from endoplasmic reticulum to Golgi requires the Golgi spectrin-ankyrin G119 skeleton in Madin Darby canine kidney cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 10711-6.
- Devarajan, P., Stabach, P. R., Mann, A. S., Ardito, T., Kashgarian, M., and Morrow, J. S. (1996). Identification of a small cytoplasmic ankyrin (AnkG119) in the kidney and muscle that binds beta I sigma spectrin and associates with the Golgi apparatus, *J Cell Biol* *133*, 819-30.
- Diamantopoulos, G. S., Perez, F., Goodson, H. V., Batelier, G., Melki, R., Kreis, T. E., and Rickard, J. E. (1999). Dynamic localization of CLIP-170 to microtubule plus ends is coupled to microtubule assembly, *Journal of cell biology* *144*, 99-112.
- Diamantopoulos, G. S., Scheel, J., Kreis, T. E., and Rickard, J. E. (1998). Purification and assay of CLIP-170, *Methods Enzymol* *298*, 197-206.
- Dick, T., Ray, K., Salz, H. K., and Chia, W. (1996). Cytoplasmic dynein (ddlc1) mutations cause morphogenetic defects and apoptotic cell death in *Drosophila melanogaster*, *Mol Cell Biol* *16*, 1966-77.
- Dillman 3rd, J. F., Dabney, L. P., Karki, S., Paschal, B. M., Holzbaur, E. L., and Pfister, K. K. (1996). Functional analysis of dynactin and cytoplasmic dynein in slow axonal transport, *J Neurosci* *16*, 6742-52.
- Dillman, J. F., 3rd, and Pfister, K. K. (1994). Differential phosphorylation in vivo of cytoplasmic dynein associated with anterogradely moving organelles, *J Cell Biol* *127*, 1671-81.
- Dobles, M., Liberal, V., Scott, M. L., Benezra, R., and Sorger, P. K. (2000). Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2, *Cell* *101*, 635-45.

- Dobyns, W. B., Reiner, O., Carrozzo, R., and Ledbetter, D. H. (1993). Lissencephaly. A human brain malformation associated with deletion of the LIS1 gene located at chromosome 17p13, *Jama* *270*, 2838-42.
- Drechsel, D. N., and Kirschner, M. W. (1994). The minimum GTP cap required to stabilize microtubules, *Curr Biol* *4*, 1053-61.
- Drewes, G., Ebner, A., and Mandelkow, E. M. (1998). MAPs, MARKs and microtubule dynamics, *Trends Biochem Sci* *23*, 307-11.
- Dujardin, D., Wacker, U. I., Moreau, A., Schroer, T. A., Rickard, J. E., and De Mey, J. R. (1998). Evidence for a role of CLIP-170 in the establishment of metaphase chromosome alignment, *J Cell Biol* *141*, 849-62.
- Dujardin, D. L., and Vallee, R. B. (2002). Dynein at the cortex, *Curr Opin Cell Biol* *14*, 44-9.
- Dulabon, L., Olson, E. C., Taglienti, M. G., Eisenhuth, S., McGrath, B., Walsh, C. A., Kreidberg, J. A., and Anton, E. S. (2000). Reelin binds alpha3beta1 integrin and inhibits neuronal migration, *Neuron* *27*, 33-44.
- Earnshaw, W. C., and Cooke, C. A. (1991). Analysis of the distribution of the INCENPs throughout mitosis reveals the existence of a pathway of structural changes in the chromosomes during metaphase and early events in cleavage furrow formation, *J Cell Sci* *98*, 443-61.
- Echeverri, C. J., Paschal, B. M., Vaughan, K. T., and Vallee, R. B. (1996). Molecular characterization of the 50-kD subunit of dynactin reveals function for the complex in chromosome alignment and spindle organization during mitosis, *J Cell Biol* *132*, 617-33.
- Eckley, D. M., Ainsztein, A. M., Mackay, A. M., Goldberg, I. G., and Earnshaw, W. C. (1997). Chromosomal proteins and cytokinesis: patterns of cleavage furrow formation and inner centromere protein positioning in mitotic heterokaryons and mid-anaphase cells, *J Cell Biol* *136*, 1169-83.
- Eckley, D. M., Gill, S. R., Melkonian, K. A., Bingham, J. B., Goodson, H. V., Heuser, J. E., and Schroer, T. A. (1999). Analysis of dynactin subcomplexes reveals a novel actin-related protein associated with the arpl minifilament pointed end, *J Cell Biol* *147*, 307-20.
- Edmondson, J. C., and Hatten, M. E. (1987). Glial-guided granule neuron migration in vitro: a high-resolution time-lapse video microscopic study, *J Neurosci* *7*, 1928-34.
- Efimov, V. P., and Morris, N. R. (2000). The LIS1-related NUDF protein of *Aspergillus nidulans* interacts with the coiled-coil domain of the NUDE/RO11 protein, *J Cell Biol* *150*, 681-8.
- Engelender, S., Sharp, A. H., Colomer, V., Tokito, M. K., Lanahan, A., Worley, P., Holzbaaur, E. L., and Ross, C. A. (1997). Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) interacts with the p150Glued subunit of dynactin, *Hum Mol Genet* *6*, 2205-12.
- Erickson, H. P. (1998). Atomic structures of tubulin and FtsZ, *Trends Cell Biol* *8*, 133-7.
- Erickson, H. P., and Stoffer, D. (1996). Protofilaments and rings, two conformations of the tubulin family conserved from bacterial FtsZ to alpha/beta and gamma tubulin, *J Cell Biol* *135*, 5-8.
- Eshel, D., Urrestarazu, L. A., Vissers, S., Jauniaux, J. C., van Vliet-Reedijk, J. C., Planta, R. J., and Gibbons, I. R. (1993). Cytoplasmic dynein is required for normal nuclear segregation in yeast, *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 11172-6.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2001). Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta, *Cell* *106*, 489-98.
- Fan, S. S., and Ready, D. F. (1997). Glued participates in distinct microtubule-based activities in *Drosophila* eye development, *Development* *124*, 1497-507.
- Farkasovsky, M., and Kuntzel, H. (2001). Cortical Num1p interacts with the dynein intermediate chain Pac11p and cytoplasmic microtubules in budding yeast, *J Cell Biol* *152*, 251-62.
- Farshori, P., and Holzbaaur, E. L. (1997). Dynactin phosphorylation is modulated in response to cellular effectors, *Biochem Biophys Res Commun* *232*, 810-6.
- Fath, K. R., Trimbur, G. M., and Burgess, D. R. (1994). Molecular motors are differentially distributed on Golgi membranes from polarized epithelial cells, *J Cell Biol* *126*, 661-75.

- Faulkner, N. E., Dujardin, D. L., Tai, C. Y., Vaughan, K. T., O'Connell, C. B., Wang, Y., and Vallee, R. B. (2000). A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function, *Nat Cell Biol* 2, 784-91.
- Feng, Y., Olson, E. C., Stukenberg, P. T., Flanagan, L. A., Kirschner, M. W., and Walsh, C. A. (2000). LIS1 regulates CNS lamination by interacting with mNudE, a central component of the centrosome, *Neuron* 28, 665-79.
- Feuerstein, R., Wang, X., Song, D., Cooke, N. E., and Liebhaber, S. A. (1994). The LIM/double zinc-finger motif functions as a protein dimerization domain, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10655-9.
- Field, C., Li, R., and Oegema, K. (1999). Cytokinesis in eukaryotes: a mechanistic comparison, *Curr Opin Cell Biol* 11, 68-80.
- Fishkind, D. J., and Wang, Y. L. (1995). New horizons for cytokinesis, *Curr Opin Cell Biol* 7, 23-31.
- Fleck, M. W., Hirotsune, S., Gambello, M. J., Phillips-Tansey, E., Soares, G., Mervis, R. F., Wynshaw-Boris, A., and McBain, C. J. (2000). Hippocampal abnormalities and enhanced excitability in a murine model of human lissencephaly, *J Neurosci* 20, 2439-50.
- Fodde, R., Kuipers, J., Rosenberg, C., Smits, R., Kielman, M., Gaspar, C., van Es, J. H., Breukel, C., Wiegant, J., Giles, R. H., and Clevers, H. (2001). Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability, *Nat Cell Biol* 3, 433-8.
- Friederich, E., Vancompernelle, K., Huet, C., Goethals, M., Finidori, J., Vandekerckhove, J., and Louvard, D. (1992). An actin-binding site containing a conserved motif of charged amino acid residues is essential for the morphogenic effect of villin, *Cell* 70, 81-92.
- Fuchs, E., and Karakesisoglou, I. (2001). Bridging cytoskeletal intersections, *Genes Dev* 15, 1-14.
- Fuchs, E., and Yang, Y. (1999). Crossroads on cytoskeletal highways, *Cell* 98, 547-50.
- Fujiwara, T., Tanaka, K., Inoue, E., Kikyo, M., and Takai, Y. (1999). Bni1p regulates microtubule-dependent nuclear migration through the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Cell Biol* 19, 8016-27.
- Fukata, M., and Kaibuchi, K. (2001). Rho-family GTPases in cadherin-mediated cell-cell adhesion, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 887-97.
- Fukata, M., Kuroda, S., Fujii, K., Nakamura, T., Shoji, I., Matsuura, Y., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kikuchi, A., and Kaibuchi, K. (1997). Regulation of cross-linking of actin filament by IQGAP1, a target for Cdc42, *J Biol Chem* 272, 29579-83.
- Fukata, M., Kuroda, S., Nakagawa, M., Kawajiri, A., Itoh, N., Shoji, I., Matsuura, Y., Yonehara, S., Fujisawa, H., Kikuchi, A., and Kaibuchi, K. (1999a). Cdc42 and Rac1 regulate the interaction of IQGAP1 with beta-catenin, *J Biol Chem* 274, 26044-50.
- Fukata, M., Nakagawa, M., Kuroda, S., and Kaibuchi, K. (1999b). Cell adhesion and Rho small GTPases, *J Cell Sci* 112 (Pt 24), 4491-500.
- Fukata, M., Watanabe, T., Noritake, J., Nakagawa, M., Yamaga, M., Kuroda, S., Matsuura, Y., Iwamatsu, A., Perez, F., and Kaibuchi, K. (2002). Rac1 and Cdc42 Capture Microtubules through IQGAP1 and CLIP-170, *Cell* 109, 873-85.
- Gaglio, T., Dionne, M. A., and Compton, D. A. (1997). Mitotic spindle poles are organized by structural and motor proteins in addition to centrosomes, *J Cell Biol* 138, 1055-66.
- Gaglio, T., Saredi, A., Bingham, J. B., Hasbani, M. J., Gill, S. R., Schroer, T. A., and Compton, D. A. (1996). Opposing motor activities are required for the organization of the mammalian mitotic spindle pole, *J Cell Biol* 135, 399-414.
- Gaglio, T., Saredi, A., and Compton, D. A. (1995). NuMA is required for the organization of microtubules into aster-like mitotic arrays, *J Cell Biol* 131, 693-708.
- Gagnon, C., White, D., Cosson, J., Huitorel, P., Edde, B., Desbruyeres, E., Paturle-Lafanechere, L., Multigner, L., Job, D., and Cibert, C. (1996). The polyglutamylated lateral chain of alpha-tubulin plays a key role in flagellar motility, *J Cell Sci* 109, 1545-53.

- Garces, J. A., Clark, I. B., Meyer, D. I., and Vallee, R. B. (1999). Interaction of the p62 subunit of dynactin with Arp1 and the cortical actin cytoskeleton, *Curr Biol* 9, 1497-500.
- Garcia-Higuera, I., Fenoglio, J., Li, Y., Lewis, C., Panchenko, M. P., Reiner, O., Smith, T. F., and Neer, E. J. (1996). Folding of proteins with WD-repeats: comparison of six members of the WD-repeat superfamily to the G protein beta subunit, *Biochemistry* 35, 13985-94.
- Gard, D. L. (1991). Organization, nucleation, and acetylation of microtubules in *Xenopus laevis* oocytes: a study by confocal immunofluorescence microscopy, *Dev Biol* 143, 346-62.
- Gard, D. L., and Kirschner, M. W. (1987). Microtubule assembly in cytoplasmic extracts of *Xenopus* oocytes and eggs, *J Cell Biol* 105, 2191-201.
- Gee, M. A., Heuser, J. E., and Vallee, R. B. (1997). An extended microtubule-binding structure within the dynein motor domain, *Nature* 390, 636-9.
- Geiser, J. R., Schott, E. J., Kingsbury, T. J., Cole, N. B., Totis, L. J., Bhattacharyya, G., He, L., and Hoyt, M. A. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* genes required in the absence of the CIN8- encoded spindle motor act in functionally diverse mitotic pathways, *Mol Biol Cell* 8, 1035-50.
- Gibbons, B. H., Asai, D. J., Tang, W. J., Hays, T. S., and Gibbons, I. R. (1994). Phylogeny and expression of axonemal and cytoplasmic dynein genes in sea urchins, *Mol Biol Cell* 5, 57-70.
- Gibbons, I. R., Gibbons, B. H., Mocz, G., and Asai, D. J. (1991). Multiple nucleotide-binding sites in the sequence of dynein beta heavy chain, *Nature* 352, 640-3.
- Gibbons, I. R., Lee-Eiford, A., Mocz, G., Phillipson, C. A., Tang, W. J., and Gibbons, B. H. (1987). Photosensitized cleavage of dynein heavy chains. Cleavage at the "V1 site" by irradiation at 365 nm in the presence of ATP and vanadate, *J Biol Chem* 262, 2780-6.
- Gibbons, I. R., and Rowe, A. (1965). Dynein: a protein with adenosine triphosphate activity from cilia, *Science* 149, 424.
- Gigant, B., Curmi, P. A., Martin-Barbey, C., Charbaut, E., Lachkar, S., Lebeau, L., Siavoshian, S., Sobel, A., and Knossow, M. (2000). The 4 A X-ray structure of a tubulin:stathmin-like domain complex, *Cell* 102, 809-16.
- Gill, S. R., Cleveland, D. W., and Schroer, T. A. (1994). Characterization of DLC-A and DLC-B, two families of cytoplasmic dynein light chain subunits, *Mol Biol Cell* 5, 645-54.
- Gill, S. R., Schroer, T. A., Szilak, I., Steuer, E. R., Sheetz, M. P., and Cleveland, D. W. (1991). Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein, *J Cell Biol* 115, 1639-50.
- Glasgow, J. E., and Daniele, R. P. (1994). Role of microtubules in random cell migration: stabilization of cell polarity, *Cell Motil Cytoskeleton* 27, 88-96.
- Gleeson, J. G. (2000). Classical lissencephaly and double cortex (subcortical band heterotopia): LIS1 and doublecortin, *Curr Opin Neurol* 13, 121-5.
- Gleeson, J. G., Lin, P. T., Flanagan, L. A., and Walsh, C. A. (1999). Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons, *Neuron* 23, 257-71.
- Gocke, C. D., Osmani, S. A., and Miller, B. A. (2000). The human homologue of the *Aspergillus* nuclear migration gene nudC is preferentially expressed in dividing cells and ciliated epithelia, *Histochem Cell Biol* 114, 293-301.
- Goldman, R. D. (1971). The role of three cytoplasmic fibers in BHK-21 cell motility. I. Microtubules and the effects of colchicine, *J Cell Biol* 51, 752-62.
- Gonczy, P. (2002). Mechanisms of spindle positioning: focus on flies and worms, *Trends in Cell Biology* 12, 332-339.
- Gonczy, P., Pichler, S., Kirkham, M., and Hyman, A. A. (1999). Cytoplasmic dynein is required for distinct aspects of MTOC positioning, including centrosome separation, in the one cell stage *Caenorhabditis elegans* embryo, *J Cell Biol* 147, 135-50.

- Goodenough, U., and Heuser, J. (1984). Structural comparison of purified dynein proteins with in situ dynein arms, *J Mol Biol* *180*, 1083-1118.
- Gorbsky, G. J., Chen, R. H., and Murray, A. W. (1998). Microinjection of antibody to Mad2 protein into mammalian cells in mitosis induces premature anaphase, *J Cell Biol* *141*, 1193-205.
- Gorbsky, G. J., and Ricketts, W. A. (1993). Differential expression of a phosphoepitope at the kinetochores of moving chromosomes, *J Cell Biol* *122*, 1311-21.
- Gorbsky, G. J., Sammak, P. J., and Borisy, G. G. (1987). Chromosomes move poleward in anaphase along stationary microtubules that coordinately disassemble from their kinetochore ends, *J Cell Biol* *104*, 9-18.
- Gould, R. R., and Borisy, G. G. (1977). The pericentriolar material in Chinese hamster ovary cells nucleates microtubule formation, *J Cell Biol* *73*, 601-15.
- Green, L. M., and Berg, J. M. (1990). Retroviral nucleocapsid protein-metal ion interactions: folding and sequence variants, *Proc Natl Acad Sci U S A* *87*, 6403-7.
- Grill, S. W., Gonczy, P., Stelzer, E. H., and Hyman, A. A. (2001). Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the *Caenorhabditis elegans* embryo, *Nature* *409*, 630-3.
- Griparic, L., and Keller, T. C., 3rd (1999). Differential usage of two 5' splice sites in a complex exon generates additional protein sequence complexity in chicken CLIP-170 isoforms, *Biochim Biophys Acta* *1449*, 119-124.
- Griparic, L., and Keller, T. C. S., 3rd (1998). Identification and expression of two novel CLIP-170/Restin isoforms expressed predominantly in muscle, *Biochim Biophys Acta* *1405*, 35-46.
- Griparic, L., Volosky, J. M., and Keller, T. C., 3rd (1998). Cloning and expression of chicken CLIP-170 and restin isoforms, *Gene* *206*, 195-208.
- Gruss, O. J., Carazo-Salas, R. E., Schatz, C. A., Guarguaglini, G., Kast, J., Wilm, M., Le Bot, N., Vernos, I., Karsenti, E., and Mattaj, I. W. (2001). Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity, *Cell* *104*, 83-93.
- Gruss, O. J., Wittmann, M., Yokoyama, H., Pepperkok, R., Kufer, T., Sillje, H., Karsenti, E., Mattaj, I. W., and Vernos, I. (2002). Chromosome-induced microtubule assembly mediated by TPX2 is required for spindle formation in HeLa cells, *Nat Cell Biol* *4*, 871-9.
- Guillaud, L., Bosc, C., Fourest-Lieuvain, A., Denarier, E., Pirollet, F., Lafanechere, L., and Job, D. (1998). STOP proteins are responsible for the high degree of microtubule stabilization observed in neuronal cells, *J Cell Biol* *142*, 167-79.
- Gundersen, G. G. (2002). Evolutionary conservation of microtubule-capture mechanisms, *Nat Rev Mol Cell Biol* *3*, 296-304.
- Gundersen, G. G., and Bulinski, J. C. (1988). Selective stabilization of microtubules oriented toward the direction of cell migration, *Proc Natl Acad Sci U S A* *85*, 5946-50.
- Gundersen, G. G., Kim, I., and Chapin, C. J. (1994). Induction of stable microtubules in 3T3 fibroblasts by TGF-beta and serum, *J Cell Sci* *107*, 645-59.
- Gupta, A., Tsai, L. H., and Wynshaw-Boris, A. (2002). Life is a journey: a genetic look at neocortical development, *Nat Rev Genet* *3*, 342-55.
- Gurland, G., and Gundersen, G. G. (1995). Stable, detyrosinated microtubules function to localize vimentin intermediate filaments in fibroblasts, *J Cell Biol* *131*, 1275-90.
- Gyoeva, F. K., and Gelfand, V. I. (1991). Coalignment of vimentin intermediate filaments with microtubules depends on kinesin, *Nature* *353*, 445-8.
- Habura, A., Tikhonenko, I., Chisholm, R. L., and Koonce, M. P. (1999). Interaction mapping of a dynein heavy chain. Identification of dimerization and intermediate-chain binding domains, *J Biol Chem* *274*, 15447-53.
- Hales, K. G., Bi, E., Wu, J. Q., Adam, J. C., Yu, I. C., and Pringle, J. R. (1999). Cytokinesis: an emerging unified theory for eukaryotes?, *Curr Opin Cell Biol* *11*, 717-25.

- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton, *Science* 279, 509-14.
- Hamasaki, T., Barkalow, K., Richmond, J., and Satir, P. (1991). cAMP-stimulated phosphorylation of an axonemal polypeptide that copurifies with the 22S dynein arm regulates microtubule translocation velocity and swimming speed in *Paramecium*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7918-22.
- Han, G., Liu, B., Zhang, J., Zuo, W., Morris, N. R., and Xiang, X. (2001). The *Aspergillus* cytoplasmic dynein heavy chain and NUDF localize to microtubule ends and affect microtubule dynamics, *Curr Biol* 11, 719-24.
- Harada, A., Takei, Y., Kanai, Y., Tanaka, Y., Nonaka, S., and Hirokawa, N. (1998). Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein, *J Cell Biol* 141, 51-9.
- Harrison, A., Olds-Clarke, P., and King, S. M. (1998). Identification of the t complex-encoded cytoplasmic dynein light chain *tctex1* in inner arm II supports the involvement of flagellar dyneins in meiotic drive, *J Cell Biol* 140, 1137-47.
- Hart, M. J., Callow, M. G., Souza, B., and Polakis, P. (1996). IQGAP1, a calmodulin-binding protein with a rasGAP-related domain, is a potential effector for *cdc42Hs*, *Embo J* 15, 2997-3005.
- Hatten, M. E. (2002). New directions in neuronal migration, *Science* 297, 1660-3.
- Haugh, J. M., Codazzi, F., Teruel, M., and Meyer, T. (2000). Spatial sensing in fibroblasts mediated by 3' phosphoinositides, *J Cell Biol* 151, 1269-80.
- Hayden, J. H., Bowser, S. S., and Rieder, C. L. (1990). Kinetochores capture astral microtubules during chromosomes attachment to mitotic spindle: direct visualization in live newt lung cells, *J Cell Biol* 111, 1039-45.
- Hays, T. S., and Salmon, E. D. (1990). Poleward force at the kinetochore in metaphase depends on the number of kinetochore microtubules, *J Cell Biol* 110, 391-404.
- Heald, R. (2000). Motor function in the mitotic spindle, *Cell* 102, 399-402.
- Heald, R., Tournebize, R., Blank, T., Sandaltzopoulos, R., Becker, P., Hyman, A., and Karsenti, E. (1996). Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts, *Nature* 382, 420-5.
- Heald, R., Tournebize, R., Habermann, A., Karsenti, E., and Hyman, A. (1997). Spindle assembly in *Xenopus* egg extracts: respective roles of centrosomes and microtubule self-organization, *J Cell Biol* 138, 615-28.
- Heil-Chapdelaine, R. A., Oberle, J. R., and Cooper, J. A. (2000). The cortical protein Num1p is essential for dynein-dependent interactions of microtubules with the cortex, *J Cell Biol* 151, 1337-44.
- Hill, C. S., Wynne, J., and Treisman, R. (1995). The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF, *Cell* 81, 1159-70.
- Hirokawa, N. (1994). Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins, *Curr Opin Cell Biol* 6, 74-81.
- Hirokawa, N., Noda, Y., and Okada, Y. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division, *Curr Opin Cell Biol* 10, 60-73.
- Hirokawa, N., Sato-Yoshitake, R., Yoshida, T., and Kawashima, T. (1990). Brain dynein (MAP1C) localizes on both anterogradely and retrogradely transported membranous organelles in vivo, *J Cell Biol* 111, 1027-37.
- Hirotsune, S., Fleck, M. W., Gambello, M. J., Bix, G. J., Chen, A., Clark, G. D., Ledbetter, D. H., McBain, C. J., and Wynshaw-Boris, A. (1998). Graded reduction of *Pafah1b1* (*Lis1*) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality, *Nat Genet* 19, 333-9.
- Hoffman, D. B., Pearson, C. G., Yen, T. J., Howell, B. J., and Salmon, E. D. (2001). Microtubule-dependent changes in assembly of microtubule motor proteins and mitotic spindle checkpoint proteins at *ptk1* kinetochores, *Mol Biol Cell* 12, 1995-2009.
- Hoffmann, B., Zuo, W., Liu, A., and Morris, N. R. (2001). The LIS1-related protein NUDF of *Aspergillus nidulans* and its interaction partner NUDE bind directly to specific subunits of dynein and dynactin and to alpha- and gamma-tubulin, *J Biol Chem* 276, 38877-84.

- Holleran, E. A., Karki, S., and Holzbaur, E. L. F. (1998). The role of the dynactin complex in intracellular motility, *International Review of Cytology* *182*, 69-109.
- Holleran, E. A., Ligon, L. A., Tokito, M., Stankewich, M. C., Morrow, J. S., and Holzbaur, E. L. (2001). beta III spectrin binds to the Arp1 subunit of dynactin, *J Biol Chem* *276*, 36598-605.
- Holleran, E. A., Tokito, M. K., Karki, S., and Holzbaur, E. L. (1996). Centractin (ARP1) associates with spectrin revealing a potential mechanism to link dynactin to intracellular organelles, *J Cell Biol* *135*, 1815-29.
- Holzbaur, E. L., Hammarback, J. A., Paschal, B. M., Kravit, N. G., Pfister, K. K., and Vallee, R. B. (1991). Homology of a 150K cytoplasmic dynein-associated polypeptide with the *Drosophila* gene *Glued*, *Nature* *351*, 579-83.
- Holzbaur, E. L., Hammarback, J. A., Paschal, B. M., Kravit, N. G., Pfister, K. K., and Vallee, R. B. (1992). Homology of a 150K cytoplasmic dynein-associated polypeptide with the *Drosophila* gene *Glued*, *Nature* *360*, 695.
- Holzbaur, E. L., and Tokito, M. K. (1996). Localization of the *DCTN1* gene encoding p150Glued to human chromosome 2p13 by fluorescence in situ hybridization, *Genomics* *31*, 398-9.
- Holzbaur, E. L., and Vallee, R. B. (1994). DYNEINS: molecular structure and cellular function, *Annu Rev Cell Biol* *10*, 339-72.
- Hoogenraad, C. C., Akhmanova, A., Grosveld, F., De Zeeuw, C. I., and Galjart, N. (2000). Functional analysis of CLIP-115 and its binding to microtubules, *J Cell Sci* *113*, 2285-2297.
- Hoogenraad, C. C., Akhmanova, A., Howell, S. A., Dortland, B. R., De Zeeuw, C. I., Willemsen, R., Visser, P., Grosveld, F., and Galjart, N. (2001). Mammalian Golgi-associated Bicaudal-D2 functions in the dynein-dynactin pathway by interacting with these complexes, *Embo J* *20*, 4041-54.
- Hoogenraad, C. C., Eussen, B. H. J., Langeveld, A., van Haperen, R., Winterberg, S., Wouters, C. H., Grosveld, F., De Zeeuw, C. I., and Galjart, N. (1998). The murine *CYLN2* gene: genomic organization, chromosome localization, and comparison to the human gene that is located within the 7q11.23 williams syndrome critical region [In Process Citation], *Genomics* *53*, 348-58.
- Hoogenraad, C. C., Koekkoek, B., Akhmanova, A., Krugers, H., Dortland, B., Miedema, M., Van Alphen, A., Kistler, W. M., Jaegle, M., Koutsourakis, M., Van Camp, N., Verhoye, M., Van Der Linden, A., Kaverina, I., Grosveld, F., De Zeeuw, C. I., and Galjart, N. (2002). Targeted mutation of *Cyln2* in the Williams syndrome critical region links CLIP-115 haploinsufficiency to neurodevelopmental abnormalities in mice, *Nat Genet* *32*, 116-27.
- Horio, T., and Hotani, H. (1986). Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy, *Nature* *321*, 605-7.
- Houchmandzadeh, B., Marko, J. F., Chatenay, D., and Libchaber, A. (1997). Elasticity and structure of eukaryote chromosomes studied by micromanipulation and micropipette aspiration, *J Cell Biol* *139*, 1-12.
- Howell, B., Deacon, H., and Cassimeris, L. (1999a). Decreasing oncoprotein 18/stathmin levels reduces microtubule catastrophes and increases microtubule polymer in vivo, *J Cell Sci* *112*, 3713-22.
- Howell, B., Larsson, N., Gullberg, M., and Cassimeris, L. (1999b). Dissociation of the tubulin-sequestering and microtubule catastrophe-promoting activities of oncoprotein 18/stathmin, *Mol Biol Cell* *10*, 105-18.
- Howell, B. J., Hoffman, D. B., Fang, G., Murray, A. W., and Salmon, E. D. (2000). Visualization of Mad2 dynamics at kinetochores, along spindle fibers, and at spindle poles in living cells, *J Cell Biol* *150*, 1233-50.
- Howell, B. J., McEwen, B. F., Canman, J. C., Hoffman, D. B., Farrar, E. M., Rieder, C. L., and Salmon, E. D. (2001). Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation, *J Cell Biol* *155*, 1159-1172.
- Hoyt, M. A. (2001). A new view of the spindle checkpoint, *J Cell Biol* *154*, 909-11.
- Hoyt, M. A., Totis, L., and Roberts, B. T. (1991). *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function, *Cell* *66*, 507-17.

- Hughes, S. M., Vaughan, K. T., Herskovits, J. S., and Vallee, R. B. (1995). Molecular analysis of a cytoplasmic dynein light intermediate chain reveals homology to a family of ATPases, *J Cell Sci* *108*, 17-24.
- Hyman, A. A., Chretien, D., Arnal, I., and Wade, R. H. (1995). Structural changes accompanying GTP hydrolysis in microtubules: information from a slowly hydrolyzable analogue guanylyl-(alpha,beta)-methylene-diphosphonate, *J Cell Biol* *128*, 117-25.
- Hyman, A. A., and Karsenti, E. (1996). Morphogenetic properties of microtubules and mitotic spindle assembly, *Cell* *84*, 401-10.
- Hyman, A. A., and Mitchison, T. J. (1991). Two different microtubule-based motor activities with opposite polarities in kinetochores, *Nature* *351*, 206-211.
- Hyman, A. A., Salsler, S., Drechsel, D. N., Unwin, N., and Mitchison, T. J. (1992). Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP, *Mol Biol Cell* *3*, 1155-67.
- Infante, A. S., Stein, M. S., Zhai, Y., Borisy, G. G., and Gundersen, G. G. (2000). Detyrosinated (Glu) microtubules are stabilized by an ATP-sensitive plus-end cap, *J Cell Sci* *113*, 3907-19.
- Jaffrey, S. R., and Snyder, S. H. (1996). PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase, *Science* *274*, 774-7.
- Jordan, M. A., Toso, R. J., Thrower, D., and Wilson, L. (1993). Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations, *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 9552-6.
- Jordan, M. A., and Wilson, L. (1998). Use of drugs to study role of microtubule assembly dynamics in living cells, *Methods Enzymol* *298*, 252-76.
- Joshi, H. C. (1994). Microtubule organizing centers and gamma-tubulin, *Curr Opin Cell Biol* *6*, 54-62.
- Joshi, H. C., Palacios, M. J., McNamara, L., and Cleveland, D. W. (1992). Gamma-tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation, *Nature* *356*, 80-3.
- Juwana, J. P., Henderikx, P., Mischo, A., Wadle, A., Fadle, N., Gerlach, K., Arends, J. W., Hoogenboom, H., Pfreundschuh, M., and Renner, C. (1999). EB/RP gene family encodes tubulin binding proteins, *Int J Cancer* *81*, 275-84.
- Kahana, J. A., and Cleveland, D. W. (1999). Beyond nuclear transport. Ran-GTP as a determinant of spindle assembly, *J Cell Biol* *146*, 1205-10.
- Kahana, J. A., Schlenstedt, G., Evanchuk, D. M., Geiser, J. R., Hoyt, M. A., and Silver, P. A. (1998). The yeast dynactin complex is involved in partitioning the mitotic spindle between mother and daughter cells during anaphase B, *Mol Biol Cell* *9*, 1741-56.
- Kai, N., Mishina, M., and Yagi, T. (1997). Molecular cloning of Fyn-associated molecules in the mouse central nervous system, *J Neurosci Res* *48*, 407-24.
- Kaibuchi, K., Kuroda, S., and Amano, M. (1999). Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells, *Annu Rev Biochem* *68*, 459-86.
- Kallio, M., Weinstein, J., Daum, J. R., Burke, D. J., and Gorbsky, G. J. (1998). Mammalian p55CDC Mediates Association of the Spindle Checkpoint Protein Mad2 with the Cyclosome/Anaphase-promoting Complex, and is Involved in Regulating Anaphase Onset and Late Mitotic Events, *J Cell Biol* *141*, 1393-1406.
- Kaplan, K. B., Burds, A. A., Swedlow, J. R., Bekir, S. S., Sorger, P. K., and Nathke, I. S. (2001). A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation, *Nat Cell Biol* *3*, 429-32.
- Karess, R. E., and Glover, D. M. (1989). rough deal: A gene required for proper mitotic segregation in drosophila, *J Cell Biol* *109*, 2951-61.
- Karki, S., and Holzbaur, E. L. (1995). Affinity chromatography demonstrates a direct binding between cytoplasmic dynein and the dynactin complex, *J Biol Chem* *270*, 28806-11.
- Karki, S., and Holzbaur, E. L. (1999). Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport, *Curr Opin Cell Biol* *11*, 45-53.

- Karki, S., LaMonte, B., and Holzbaur, E. L. (1998). Characterization of the p22 subunit of dynactin reveals the localization of cytoplasmic dynein and dynactin to the midbody of dividing cells, *J Cell Biol* *142*, 1023-34.
- Karki, S., Tokito, M. K., and Holzbaur, E. L. (1997). Casein kinase II binds to and phosphorylates cytoplasmic dynein, *J Biol Chem* *272*, 5887-91.
- Karki, S., Tokito, M. K., and Holzbaur, E. L. (2000). A dynactin subunit with a highly conserved cysteine-rich motif interacts directly with Arp1, *J Biol Chem* *275*, 4834-9.
- Karsenti, E., Boleti, H., and Vernos, I. (1996). The role of microtubule dependent motors in centrosome movement and spindle pole organization during mitosis., *Seminars in cell and developmental biology* *7*, 367-78.
- Karsenti, E., and Vernos, I. (2001). The mitotic spindle: a self-made machine, *Science* *294*, 543-7.
- Katoh, H., Negishi, M., and Ichikawa, A. (1996). Prostaglandin E receptor EP3 subtype induces neurite retraction via small GTPase Rho, *J Biol Chem* *271*, 29780-4.
- Kaverina, I., Rottner, K., and Small, J. V. (1998). Targeting, capture, and stabilization of microtubules at early focal adhesions, *J Cell Biol* *142*, 181-90.
- Keating, T. J., and Borisy, G. G. (1999). Centrosomal and non-centrosomal microtubules, *Biol Cell* *91*, 321-9.
- Keating, T. J., and Borisy, G. G. (2000). Immunostuctural evidence for the template mechanism of microtubule nucleation, *Nat Cell Biol* *2*, 352-7.
- Kikkawa, M., Ishikawa, T., Nakata, T., Wakabayashi, T., and Hirokawa, N. (1994). Direct visualization of the microtubule lattice seam both in vitro and in vivo, *J Cell Biol* *127*, 1965-71.
- King, S. J., Bonilla, M., Rodgers, M. E., and Schroer, T. A. (2002). Subunit organization in cytoplasmic dynein subcomplexes, *Protein Sci* *11*, 1239-50.
- King, S. J., and Schroer, T. A. (2000). Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor, *Nat Cell Biol* *2*, 20-4.
- King, S. M. (2000). The dynein microtubule motor, *Biochim Biophys Acta* *1496*, 60-75.
- King, S. M., Barbarese, E., Dillman, J. F., 3rd, Benashski, S. E., Do, K. T., Patel-King, R. S., and Pfister, K. K. (1998). Cytoplasmic dynein contains a family of differentially expressed light chains, *Biochemistry* *37*, 15033-41.
- King, S. M., Barbarese, E., Dillman, J. F., III, Patel-King, R. S., Carson, J. H., and Pfister, K. K. (1996a). Brain cytoplasmic and flagellar outer arm dyneins share a highly conserved Mr 8,000 light chain, *J Biol Chem* *271*, 19358-66.
- King, S. M., Dillman, J. F., 3rd, Benashski, S. E., Lye, R. J., Patel-King, R. S., and Pfister, K. K. (1996b). The mouse t-complex-encoded protein Tctex-1 is a light chain of brain cytoplasmic dynein, *J Biol Chem* *271*, 32281-7.
- King, S. M., and Patel-King, R. S. (1995). The M(r) = 8,000 and 11,000 outer arm dynein light chains from *Chlamydomonas* flagella have cytoplasmic homologues, *J Biol Chem* *270*, 11445-52.
- Kirschner, M. W., and Mitchison, T. (1986). Microtubule dynamics, *Nature* *324*, 621.
- Kitagawa, M., Umezu, M., Aoki, J., Koizumi, H., Arai, H., and Inoue, K. (2000). Direct association of LIS1, the lissencephaly gene product, with a mammalian homologue of a fungal nuclear distribution protein, rNUDE, *FEBS Lett* *479*, 57-62.
- Komarova, Y. A., Akhmanova, A. S., Kojima, S., Galjart, N., and Borisy, G. G. (2002). Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue in vivo, *J Cell Biol* *159*, 589-99.
- Koonce, M. P. (1997). Identification of a microtubule-binding domain in a cytoplasmic dynein heavy chain, *J Biol Chem* *272*, 19714-8.
- Korinek, W. S., Copeland, M. J., Chaudhuri, A., and Chant, J. (2000). Molecular linkage underlying microtubule orientation toward cortical sites in yeast, *Science* *287*, 2257-9.

- Kozma, R., Sarnar, S., Ahmed, S., and Lim, L. (1997). Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid, *Mol Cell Biol* *17*, 1201-11.
- Kreitzer, G., Liao, G., and Gundersen, G. G. (1999). Detyrosination of tubulin regulates the interaction of intermediate filaments with microtubules in vivo via a kinesin-dependent mechanism, *Mol Biol Cell* *10*, 1105-18.
- Kumar, J., Yu, H., and Sheetz, M. P. (1995). Kinectin, an essential anchor for kinesin-driven vesicle motility, *Science* *267*, 1834-7.
- Kumar, S., Zhou, Y., and Plamann, M. (2001). Dynactin--membrane interaction is regulated by the C-terminal domains of p150Glued, *EMBO Rep* *24*, 24.
- Kuntziger, T., Gavet, O., Manceau, V., Sobel, A., and Bornens, M. (2001). Stathmin/Op18 phosphorylation is regulated by microtubule assembly, *Mol Biol Cell* *12*, 437-48.
- Kupfer, A., Louvard, D., and Singer, S. J. (1982). Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in cultured fibroblasts at the edge of an experimental wound, *Proc Natl Acad Sci U S A* *79*, 2603-7.
- Kuroda, S., Fukata, M., Kobayashi, K., Nakafuku, M., Nomura, N., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. (1996). Identification of IQGAP as a putative target for the small GTPases, Cdc42 and Rac1, *J Biol Chem* *271*, 23363-7.
- Kuroda, S., Fukata, M., Nakagawa, M., Fujii, K., Nakamura, T., Ookubo, T., Izawa, I., Nagase, T., Nomura, N., Tani, H., Shoji, I., Matsuura, Y., Yonehara, S., and Kaibuchi, K. (1998). Role of IQGAP1, a target of the small GTPases Cdc42 and Rac1, in regulation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion, *Science* *281*, 832-5.
- Lacey, M. L., and Haimo, L. T. (1992). Cytoplasmic dynein is a vesicle protein, *J Biol Chem* *267*, 4793-8.
- Lacey, M. L., and Haimo, L. T. (1994). Cytoplasmic dynein binds to phospholipid vesicles, *Cell Motil Cytoskeleton* *28*, 205-12.
- Lambert de Rouvroit, C., and Goffinet, A. M. (1998). A new view of early cortical development, *Biochem Pharmacol* *56*, 1403-9.
- Lambert de Rouvroit, C., and Goffinet, A. M. (2001). Neuronal migration, *Mech Dev* *105*, 47-56.
- Lambright, D. G., Sondek, J., Bohm, A., Skiba, N. P., Hamm, H. E., and Sigler, P. B. (1996). The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein, *Nature* *379*, 311-9.
- LaMonte, B. H., Wallace, K. E., Holloway, B. A., Shelly, S. S., Ascano, J., Tokito, M., Van Winkle, T., Howland, D. S., and Holzbaur, E. L. (2002). Disruption of dynein/dynactin inhibits axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration, *Neuron* *34*, 715-27.
- Lantz, V. A., and Miller, K. G. (1998). A class VI unconventional myosin is associated with a homologue of a microtubule-binding protein, cytoplasmic linker protein-170, in neurons and at the posterior pole of *Drosophila* embryos, *J Cell Biol* *140*, 897-910.
- Larsson, N., Segerman, B., Howell, B., Fridell, K., Cassimeris, L., and Gullberg, M. (1999). Op18/stathmin mediates multiple region-specific tubulin and microtubule-regulating activities, *J Cell Biol* *146*, 1289-302.
- Lee, L., Klee, S. K., Evangelista, M., Boone, C., and Pellman, D. (1999). Control of mitotic spindle position by the *Saccharomyces cerevisiae* formin Bni1p, *J Cell Biol* *144*, 947-61.
- Lee, L., Tirnauer, J. S., Li, J., Schuyler, S. C., Liu, J. Y., and Pellman, D. (2000). Positioning of the mitotic spindle by a cortical-microtubule capture mechanism, *Science* *287*, 2260-2.
- Lee, T., and Luo, L. (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis, *Neuron* *22*, 451-61.
- Lees-Miller, J. P., Helfman, D. M., and Schroer, T. A. (1992). A vertebrate actin-related protein is a component of a multisubunit complex involved in microtubule-based vesicle motility, *Nature* *359*, 244-6.
- Leguy, R., Melki, R., Pantaloni, D., and Carlier, M. F. (2000). Monomeric gamma-tubulin nucleates microtubules, *J Biol Chem* *275*, 21975-80.

- Lei, Y., and Warrior, R. (2000). The *Drosophila* Lissencephaly1 (DLis1) gene is required for nuclear migration, *Dev Biol* 226, 57-72.
- Leung, C. L., Sun, D., and Liem, R. K. (1999). The intermediate filament protein peripherin is the specific interaction partner of mouse BPAG1-n (dystonin) in neurons, *J Cell Biol* 144, 435-46.
- Leventer, R. J., Cardoso, C., Ledbetter, D. H., and Dobyns, W. B. (2001). LIS1: from cortical malformation to essential protein of cellular dynamics, *Trends Neurosci* 24, 489-92.
- Leventer, R. J., Pilz, D. T., Matsumoto, N., Ledbetter, D. H., and Dobyns, W. B. (2000). Lissencephaly and subcortical band heterotopia: molecular basis and diagnosis, *Mol Med Today* 6, 277-84.
- Li, R., and Murray, A. W. (1991). Feedback control of mitosis in budding yeast, *Cell* 66, 519-31.
- Li, S., Finley, J., Liu, Z. J., Qiu, S. H., Chen, H., Luan, C. H., Carson, M., Tsao, J., Johnson, D., Lin, G., Zhao, J., Thomas, W., Nagy, L. A., Sha, B., DeLucas, L. J., Wang, B. C., and Luo, M. (2002). Crystal structure of the cytoskeleton-associated protein (CAP-Gly) domain, *J Biol Chem* 277, 7.
- Li, S. H., Gutekunst, C. A., Hersch, S. M., and Li, X. J. (1998). Interaction of huntingtin-associated protein with dynactin P150Glued, *J Neurosci* 18, 1261-9.
- Li, X., and Nicklas, R. B. (1995). Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint, *Nature* 373, 630-632.
- Li, Y., and Benezra, R. (1996). Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2, *Science* 274, 246-248.
- Li, Y. Y., Yeh, E., Hays, T., and Bloom, K. (1993). Disruption of mitotic spindle orientation in a yeast dynein mutant, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10096-100.
- Liao, G., Nagasaki, T., and Gundersen, G. G. (1995a). Low concentrations of nocodazole interfere with fibroblast locomotion without significantly affecting microtubule level: implications for the role of dynamic microtubules in cell locomotion, *J Cell Sci* 108, 3473-83.
- Liao, H., Winkfein, R. J., Mack, G., Rattner, J. B., and Yen, T. J. (1995b). CENP-F is a protein of the nuclear matrix that assembles onto kinetochores at late G2 and is rapidly degraded after mitosis, *J Cell Biol* 130, 507-18.
- Ligon, L. A., Karki, S., Tokito, M., and Holzbaur, E. L. (2001). Dynein binds to beta-catenin and may tether microtubules at adherens junctions, *Nat Cell Biol* 3, 913-7.
- Lin, H., de Carvalho, P., Kho, D., Tai, C.-Y., Pierre, P., Fink, G. R., and Pellman, D. (2001). Polyploids require Bik1 for kinetochore-microtubule attachment, *J Cell Biol* 155, 1173-1184.
- Lin, S. X. H., and Collins, C. A. (1992). Immunolocalization of cytoplasmic dynein to lysosomes in cultured cells, *J Cell Sci* 101, 125-137.
- Litchfield, D. W., and Luscher, B. (1993). Casein kinase II in signal transduction and cell cycle regulation, *Mol Cell Biochem* 127-128, 187-99.
- Liu, Z., Steward, R., and Luo, L. (2000). *Drosophila* Lis1 is required for neuroblast proliferation, dendritic elaboration and axonal transport, *Nat Cell Biol* 2, 776-783.
- Liu, Z., Xie, T., and Steward, R. (1999). Lis1, the *Drosophila* homolog of a human lissencephaly disease gene, is required for germline cell division and oocyte differentiation, *Development* 126, 4477-88.
- Lo Nigro, C., Chong, C. S., Smith, A. C., Dobyns, W. B., Carrozzo, R., and Ledbetter, D. H. (1997). Point mutations and an intragenic deletion in LIS1, the lissencephaly causative gene in isolated lissencephaly sequence and Miller-Dieker syndrome, *Hum Mol Genet* 6, 157-64.
- Lu, C., Stricker, J., and Erickson, H. P. (1998). FtsZ from *Escherichia coli*, *Azotobacter vinelandii*, and *Thermotoga maritima*--quantitation, GTP hydrolysis, and assembly, *Cell Motil Cytoskeleton* 40, 71-86.
- Ludueno, R. F. (1998). Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications, *Int Rev Cytol* 178, 207-75.
- Lye, R. J., Porter, M. E., Scholey, J. M., and McIntosh, J. R. (1987). Identification of a microtubule-based cytoplasmic motor in the nematode *C. elegans*, *Cell* 51, 309-18.

- Mach, J. M., and Lehmann, R. (1997). An Egalitarian-BicaudalD complex is essential for oocyte specification and axis determination in *Drosophila*, *Genes Dev* *11*, 423-35.
- Mackay, A. M., Ainsztein, A. M., Eckley, D. M., and Earnshaw, W. C. (1998). A dominant mutant of inner centromere protein (INCENP), a chromosomal protein, disrupts prometaphase congression and cytokinesis, *J Cell Biol* *140*, 991-1002.
- MacRae, T. H. (1997). Tubulin post-translational modifications--enzymes and their mechanisms of action, *Eur J Biochem* *244*, 265-78.
- Makokha, M., Hare, M., Li, M., Hays, T., and Barbar, E. (2002). Interactions of cytoplasmic dynein light chains Tctex-1 and LC8 with the intermediate chain IC74, *Biochemistry* *41*, 4302-11.
- Mandelkow, E. M., Mandelkow, E., and Milligan, R. A. (1991). Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study, *J Cell Biol* *114*, 977-91.
- Manya, H., Aoki, J., Kato, H., Ishii, J., Hino, S., Arai, H., and Inoue, K. (1999). Biochemical characterization of various catalytic complexes of the brain platelet-activating factor acetylhydrolase, *J Biol Chem* *274*, 31827-32.
- Manya, H., Aoki, J., Watanabe, M., Adachi, T., Asou, H., Inoue, Y., Arai, H., and Inoue, K. (1998). Isolated lissencephaly sequence with balanced chromosome translocation involving 17p13.3, *J Biol Chem* *273*, 18567-72.
- Margolis, R. L., and Wilson, L. (1978). Opposite end assembly and disassembly of microtubules at steady state in vitro, *Cell* *13*, 1-8.
- Margolis, R. L., and Wilson, L. (1981). Microtubule treadmills--possible molecular machinery, *Nature* *293*, 705-11.
- Maruta, H., Greer, K., and Rosenbaum, J. L. (1986). The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules, *J Cell Biol* *103*, 571-9.
- Masumoto, H., Masukata, H., Muro, Y., Nozaki, N., and Okazaki, T. (1989). A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite, *J Cell Biol* *109*, 1963-73.
- Mata, J., and Nurse, P. (1997). *tea1* and the microtubular cytoskeleton are important for generating global spatial order within the fission yeast cell, *Cell* *89*, 939-49.
- Matovcik, L. M., Karapetian, O., Czernik, A. J., Marino, C. R., Kinder, B. K., and Gorelick, F. S. (1994). Antibodies to an epitope on synapsin I detect a protein associated with the endocytic compartment in non-neuronal cells, *Eur J Cell Biol* *65*, 327-40.
- Matsumoto, N., and Ledbetter, D. H. (1999). Molecular cloning and characterization of the human NUDC gene, *Hum Genet* *104*, 498-504.
- Mazia, D. (1987). The chromosome cycle and the centrosome cycle in the mitotic cycle, *Int Rev Cytol* *100*, 49-92.
- Mazumdar, M., Mikami, A., Gee, M. A., and Vallee, R. B. (1996). In vitro motility from recombinant dynein heavy chain, *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 6552-6.
- McCartney, B. M., McEwen, D. G., Grevengoed, E., Maddox, P., Bejsovec, A., and Peifer, M. (2001). *Drosophila* APC2 and Armadillo participate in tethering mitotic spindles to cortical actin, *Nat Cell Biol* *3*, 933-8.
- McConnell, S. K., and Kaznowski, C. E. (1991). Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex, *Science* *254*, 282-5.
- McGrail, M., Gepner, J., Silvanovich, A., Ludmann, S., Serr, M., and Hays, T. S. (1995). Regulation of cytoplasmic dynein function in vivo by the *Drosophila* Glued complex, *J Cell Biol* *131*, 411-25.
- McGrail, M., and Hays, T. S. (1997). The microtubule motor cytoplasmic dynein is required for spindle orientation during germline cell divisions and oocyte differentiation in *Drosophila*, *Development* *124*, 2409-19.

- McMillan, J. N., and Tatchell, K. (1994). The JNM1 gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is required for nuclear migration and spindle orientation during the mitotic cell cycle, *J Cell Biol* *125*, 143-58.
- McNally, F. J. (2001). Cytoskeleton: CLASping the end to the edge, *Curr Biol* *11*, R477-80.
- McNally, F. J., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Vale, R. D. (1996). Katanin, the microtubule-severing ATPase, is concentrated at centrosomes, *J Cell Sci* *109*, 561-7.
- McNally, F. J., and Vale, R. D. (1993). Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules, *Cell* *75*, 419-29.
- McNally, K. P., Bazirgan, O. A., and McNally, F. J. (2000). Two domains of p80 katanin regulate microtubule severing and spindle pole targeting by p60 katanin, *J Cell Sci* *113*, 1623-33.
- McNeill, P. A., and Berns, M. W. (1981). Chromosome behavior after laser microirradiation of a single kinetochore in mitotic PtK2 cells, *J Cell Biol* *88*, 543-53.
- Melki, R., Vainberg, I. E., Chow, R. L., and Cowan, N. J. (1993). Chaperonin-mediated folding of vertebrate actin-related protein and gamma-tubulin, *J Cell Biol* *122*, 1301-10.
- Merdes, A., and Cleveland, D. W. (1997). Pathways of spindle pole formation: different mechanisms; conserved components, *J Cell Biol* *138*, 953-6.
- Merdes, A., and De Mey, J. (1990). The mechanism of kinetochore-spindle attachment and polewards movement analyzed in PtK2 cells at prophase-prometaphase transition., *European journal of cell biology* *53*, 313-25.
- Merdes, A., Ramyar, K., Vechio, J. D., and Cleveland, D. W. (1996). A complex of NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly, *Cell* *87*, 447-58.
- Meric, C., Gouilloud, E., and Spahr, P. F. (1988). Mutations in Rous sarcoma virus nucleocapsid protein p12 (NC): deletions of Cys-His boxes, *J Virol* *62*, 3328-33.
- Meyerowitz, E. M., and Kankel, D. R. (1978). A genetic analysis of visual system development in *Drosophila melanogaster*, *Dev Biol* *62*, 112-142.
- Mikami, A., Paschal, B. M., Mazumdar, M., and Vallee, R. B. (1993). Molecular cloning of the retrograde transport motor cytoplasmic dynein (MAP 1C), *Neuron* *10*, 787-96.
- Mikami, A., Tynan, S. H., Hama, T., Luby-Phelps, K., Saito, T., Crandall, J. E., Besharse, J. C., and Vallee, R. B. (2002). Molecular structure of cytoplasmic dynein 2 and its distribution in neuronal and ciliated cells, *J Cell Sci* *115*, 4801-4808.
- Miller, R. K., Matheos, D., and Rose, M. D. (1999). The cortical localization of the microtubule orientation protein, Kar9p, is dependent upon actin and proteins required for polarization, *J Cell Biol* *144*, 963-75.
- Miller, R. K., and Rose, M. D. (1998). Kar9p is a novel cortical protein required for cytoplasmic microtubule orientation in yeast, *J Cell Biol* *140*, 377-90.
- Mimori-Kiyosue, Y., Shiina, N., and Tsukita, S. (2000a). Adenomatous polyposis coli (APC) protein moves along microtubules and concentrates at their growing ends in epithelial cells, *J Cell Biol* *148*, 505-18.
- Mimori-Kiyosue, Y., Shiina, N., and Tsukita, S. (2000b). The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules, *Curr Biol* *10*, 865-8.
- Mimori-Kiyosue, Y., and Tsukita, S. (2001). Where is APC going?, *J Cell Biol* *154*, 1105-1110.
- Minke, P. F., Lee, I. H., Tinsley, J. H., Bruno, K. S., and Plamann, M. (1999). *Neurospora crassa* ro-10 and ro-11 genes encode novel proteins required for nuclear distribution, *Mol Microbiol* *32*, 1065-76.
- Mitchison, T., Evans, L., Schulze, E., and Kirschner, M. (1986). Sites of microtubule assembly and disassembly in the mitotic spindle, *Cell* *45*, 515-27.
- Mitchison, T., and Kirschner, M. (1984a). Dynamic instability of microtubule growth, *Nature* *312*, 237-42.
- Mitchison, T., and Kirschner, M. (1984b). Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes, *Nature* *312*, 232-7.

- Mitchison, T. J. (1989). Polewards microtubule flux in the mitotic spindle: evidence from photoactivation of fluorescence, *J Cell Biol* *109*, 637-52.
- Mitchison, T. J., and Salmon, E. D. (1992). Poleward kinetochore fiber movement occurs during both metaphase and anaphase-A in newt lung cell mitosis, *J Cell Biol* *119*, 569-82.
- Mitchison, T. J., and Salmon, E. D. (2001). Mitosis: a history of division, *Nat Cell Biol* *3*, E17-21.
- Mocz, G., and Gibbons, I. R. (1996). Phase partition analysis of nucleotide binding to axonemal dynein, *Biochemistry* *35*, 9204-11.
- Mocz, G., and Gibbons, I. R. (2001). Model for the motor component of dynein heavy chain based on homology to the AAA family of oligomeric ATPases, *Structure (Camb)* *9*, 93-103.
- Mogensen, M. M., Malik, A., Piel, M., Bouckson-Castaing, V., and Bornens, M. (2000). Microtubule minus-end anchorage at centrosomal and non-centrosomal sites: the role of ninein, *J Cell Sci* *113*, 3013-23.
- Moreau, N., Aumais, J. P., Prudhomme, C., Morris, S. M., and Yu-Lee, L. Y. (2001). NUDC expression during amphibian development, *Int J Dev Biol* *45*, 839-43.
- Morest, D. K. (1970). A study of neurogenesis in the forebrain of opossum pouch young, *Z Anat Entwicklungsgesch* *130*, 265-305.
- Moritz, M., Braunfeld, M. B., Guenebaut, V., Heuser, J., and Agard, D. A. (2000). Structure of the gamma-tubulin ring complex: a template for microtubule nucleation, *Nat Cell Biol* *2*, 365-70.
- Morris, N. R. (2000). Nuclear migration. From fungi to the mammalian brain, *J Cell Biol* *148*, 1097-101.
- Morris, N. R., Efimov, V. P., and Xiang, X. (1998a). Nuclear migration, nucleokinesis and lissencephaly, *Trends Cell Biol* *8*, 467-70.
- Morris, S. M., Albrecht, U., Reiner, O., Eichele, G., and Yu-Lee, L. Y. (1998b). The lissencephaly gene product Lis1, a protein involved in neuronal migration, interacts with a nuclear movement protein, NudC, *Curr Biol* *8*, 603-6.
- Morris, S. M., Anaya, P., Xiang, X., Morris, N. R., May, G. S., and Yu-Lee, L. (1997). A prolactin-inducible T cell gene product is structurally similar to the *Aspergillus nidulans* nuclear movement protein NUDC, *Mol Endocrinol* *11*, 229-36.
- Morrison, E. E., Wardleworth, B. N., Askham, J. M., Markham, A. F., and Meredith, D. M. (1998). EB1, a protein which interacts with the APC tumour suppressor, is associated with the microtubule cytoskeleton throughout the cell cycle, *Oncogene* *17*, 3471-7.
- Moudjou, M., Bordes, N., Paintrand, M., and Bornens, M. (1996). gamma-Tubulin in mammalian cells: the centrosomal and the cytosolic forms, *J Cell Sci* *109*, 875-87.
- Muhua, L., Karpova, T. S., and Cooper, J. A. (1994). A yeast actin-related protein homologous to that in vertebrate dynactin complex is important for spindle orientation and nuclear migration, *Cell* *78*, 669-79.
- Mullins, R. D., Heuser, J. A., and Pollard, T. D. (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments, *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 6181-6.
- Mullins, R. D., Stafford, W. F., and Pollard, T. D. (1997). Structure, subunit topology, and actin-binding activity of the Arp2/3 complex from *Acanthamoeba*, *J Cell Biol* *136*, 331-43.
- Munemitsu, S., Souza, B., Muller, O., Albert, I., Rubinfeld, B., and Polakis, P. (1994). The APC gene product associates with microtubules in vivo and promotes their assembly in vitro, *Cancer Res* *54*, 3676-81.
- Myster, S. H., Knott, J. A., Wysocki, K. M., O'Toole, E., and Porter, M. E. (1999). Domains in the 1alpha dynein heavy chain required for inner arm assembly and flagellar motility in *Chlamydomonas*, *J Cell Biol* *146*, 801-18.
- Nakamura, M., Zhou, X. Z., and Lu, K. P. (2001). Critical role for the EB1 and APC interaction in the regulation of microtubule polymerization, *Curr Biol* *11*, 1062-7.

- Nathke, I. S., Adams, C. L., Polakis, P., Sellin, J. H., and Nelson, W. J. (1996). The adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein localizes to plasma membrane sites involved in active cell migration, *J Cell Biol* *134*, 165-79.
- Neely, M. D., Erickson, H. P., and Boekelheide, K. (1990). HMW-2, the Sertoli cell cytoplasmic dynein from rat testis, is a dimer composed of nearly identical subunits, *J Biol Chem* *265*, 8691-8.
- Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L., and Koonin, E. V. (1999). AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes, *Genome Res* *9*, 27-43.
- Nicklas, R. B., and Koch, C. A. (1969). Chromosome micromanipulation. 3. Spindle fiber tension and the reorientation of mal-oriented chromosomes, *J Cell Biol* *43*, 40-50.
- Nicklas, R. B., and Kubai, D. F. (1985). Microtubules, chromosome movement, and reorientation after chromosomes are detached from the spindle by micromanipulation, *Chromosoma* *92*, 313-24.
- Nicklas, R. B., Ward, S. C., and Gorbsky, G. J. (1995). Kinetochore chemistry is sensitive to tension and may link mitotic forces to a cell cycle checkpoint, *J Cell Biol* *130*, 929-939.
- Niclas, J., Allan, V. J., and Vale, R. D. (1996). Cell cycle regulation of dynein association with membranes modulates microtubule-based organelle transport, *J Cell Biol* *133*, 585-93.
- Niethammer, M., Smith, D. S., Ayala, R., Peng, J., Ko, J., Lee, M. S., Morabito, M., and Tsai, L. H. (2000). NUDEL is a novel Cdk5 substrate that associates with LIS1 and cytoplasmic dynein, *Neuron* *28*, 697-711.
- Nilsson, H., Rutberg, M., and Wallin, M. (1996). Localization of kinesin and cytoplasmic dynein in cultured melanophores from Atlantic cod, *Gadus morhua*, *Cell Motil Cytoskeleton* *33*, 183-96.
- Nilsson, H., and Wallin, M. (1997). Evidence for several roles of dynein in pigment transport in melanophores, *Cell Motil Cytoskeleton* *38*, 397-409.
- Nogales, E. (2000). Structural insights into microtubule function, *Annu Rev Biochem* *69*, 277-302.
- Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R. A., and Downing, K. H. (1999). High-resolution model of the microtubule, *Cell* *96*, 79-88.
- Nogales, E., Wolf, S. G., and Downing, K. H. (1998). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography, *Nature* *391*, 199-203.
- Nothwang, H. G., Kim, H. G., Aoki, J., Geisterfer, M., Kubart, S., Wegner, R. D., van Moers, A., Ashworth, L. K., Haaf, T., Bell, J., Arai, H., Tommerup, N., Ropers, H. H., and Wirth, J. (2001). Functional hemizygoty of PAFAH1B3 due to a PAFAH1B3-CLK2 fusion gene in a female with mental retardation, ataxia and atrophy of the brain, *Hum Mol Genet* *10*, 797-806.
- O'Connell, C. B., and Wang, Y. L. (2000). Mammalian spindle orientation and position respond to changes in cell shape in a dynein-dependent fashion, *Mol Biol Cell* *11*, 1765-74.
- O'Rourke, N. A., Dailey, M. E., Smith, S. J., and McConnell, S. K. (1992). Diverse migratory pathways in the developing cerebral cortex, *Science* *258*, 299-302.
- Oakley, B. R. (2000). An abundance of tubulins, *Trends Cell Biol* *10*, 537-42.
- Osmani, A. H., Osmani, S. A., and Morris, N. R. (1990). The molecular cloning and identification of a gene product specifically required for nuclear movement in *Aspergillus nidulans*, *J Cell Biol* *111*, 543-51.
- Palazzo, A., Hazel, J., Chen, Y., Dujardin, D., Alberts, A., Pfister, K., Vallee, R., and Gunderson, G. (2001a). Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization, *Current Biology* *11*, 1536-1541.
- Palazzo, A. F., Cook, T. A., Alberts, A. S., and Gunderson, G. G. (2001b). mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules, *Nat Cell Biol* *3*, 723-9.
- Paschal, B. M., Holzbaur, E. L., Pfister, K. K., Clark, S., Meyer, D. I., and Vallee, R. B. (1993). Characterization of a 50-kDa polypeptide in cytoplasmic dynein preparations reveals a complex with p150GLUED and a novel actin, *J Biol Chem* *268*, 15318-23.

- Paschal, B. M., Mikami, A., Pfister, K. K., and Vallee, R. B. (1992). Homology of the 74-kD cytoplasmic dynein subunit with a flagellar dynein polypeptide suggests an intracellular targeting function, *Journal of Cell Biology* *118*, 1133-1143.
- Paschal, B. M., Shpetner, H. S., and Vallee, R. B. (1987). MAP 1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties, *J Cell Biol* *105*, 1273-82.
- Paschal, B. M., and Vallee, R. B. (1987). Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAP 1C, *Nature* *330*, 181-3.
- Pazour, G. J., Dickert, B. L., and Witman, G. B. (1999). The DHC1b (DHC2) isoform of cytoplasmic dynein is required for flagellar assembly, *J Cell Biol* *144*, 473-81.
- Pellman, D., Bagget, M., Tu, Y. H., Fink, G. R., and Tu, H. (1995). Two microtubule-associated proteins required for anaphase spindle movement in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Cell Biol* *130*, 1373-85.
- Pepperkok, R., Lorenz, P., Ansorge, W., and Pyerin, W. (1994). Casein kinase II is required for transition of G0/G1, early G1, and G1/S phases of the cell cycle, *J Biol Chem* *269*, 6986-91.
- Pereira, G., and Schiebel, E. (1997). Centrosome-microtubule nucleation, *J Cell Sci* *110*, 295-300.
- Perez, F., Diamantopoulos, G. S., Stalder, R., and Kreis, T. E. (1999). CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo, *Cell* *96*, 517-27.
- Perez, F., Pernet-Gallay, K., Nizak, C., Goodson, H. V., Kreis, T. E., and Goud, B. (2002). CLIPR-59, a new trans-Golgi/TGN cytoplasmic linker protein belonging to the CLIP-170 family, *J Cell Biol* *156*, 631-642.
- Pfarr, C. M., Coue, M., Grissom, P. M., Hays, T. S., Porter, M. E., and McIntosh, J. R. (1990). Cytoplasmic dynein is localized to kinetochores during mitosis., *Nature* *345*, 263-265.
- Phillis, R., Statton, D., Caruccio, P., and Murphey, R. K. (1996). Mutations in the 8 kDa dynein light chain gene disrupt sensory axon projections in the *Drosophila* imaginal CNS, *Development* *122*, 2955-63.
- Pierre, P., Pepperkok, R., and Kreis, T. E. (1994). Molecular characterization of two functional domains of CLIP-170 in vivo, *J Cell Sci* *107*, 1909-20.
- Pierre, P., Scheel, J., Rickard, J. E., and Kreis, T. E. (1992). CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules, *Cell* *70*, 887-900.
- Plamann, M., Minke, P. F., Tinsley, J. H., and Bruno, K. S. (1994). Cytoplasmic dynein and actin-related protein Arp1 are required for normal nuclear distribution in filamentous fungi, *J Cell Biol* *127*, 139-149.
- Porter, M. E., Bower, R., Knott, J. A., Byrd, P., and Dentler, W. (1999). Cytoplasmic dynein heavy chain 1b is required for flagellar assembly in *Chlamydomonas*, *Mol Biol Cell* *10*, 693-712.
- Postma, F. R., Jalink, K., Hengeveld, T., and Moolenaar, W. H. (1996). Sphingosine-1-phosphate rapidly induces Rho-dependent neurite retraction: action through a specific cell surface receptor, *Embo J* *15*, 2388-92.
- Presley, J. F., Cole, N. B., Schroer, T. A., Hirschberg, K., Zaal, K. J. M., and Lippincott-Schwartz, J. (1997). ER-to-Golgi transport visualized in living cells., *Nature* *389*, 81-85.
- Purohit, A., Tynan, S. H., Vallee, R., and Doxsey, S. J. (1999). Direct interaction of pericentrin with cytoplasmic dynein light intermediate chain contributes to mitotic spindle organization, *J Cell Biol* *147*, 481-92.
- Quintyne, N. J., Gill, S. R., Eckley, D. M., Crego, C. L., Compton, D. A., and Schroer, T. A. (1999). Dynactin is required for microtubule anchoring at centrosomes, *J Cell Biol* *147*, 321-34.
- Raff, J. W., Kellogg, D. R., and Alberts, B. M. (1993). *Drosophila* gamma-tubulin is part of a complex containing two previously identified centrosomal MAPs, *J Cell Biol* *121*, 823-35.
- Rakic, P. (1971a). Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex, *Brain Res* *33*, 471-6.
- Rakic, P. (1971b). Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in *Macacus Rhesus*, *J Comp Neurol* *141*, 283-312.
- Rakic, P. (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex, *J Comp Neurol* *145*, 61-83.

- Rattner, J. B., and Bazett-Jones, D. P. (1989). Kinetochore structure: electron spectroscopic imaging of the kinetochore, *J Cell Biol* *108*, 1209-19.
- Rattner, J. B., Rao, A., Fritzler, M. J., Valencia, D. W., and Yen, T. J. (1993). CENP-F is a .ca 400 kDa kinetochore protein that exhibits a cell-cycle dependent localization, *Cell Motil Cytoskeleton* *26*, 214-26.
- Raught, B., Gingras, A. C., and Sonenberg, N. (2001). The target of rapamycin (TOR) proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 7037-44.
- Reiner, O., Albrecht, U., Gordon, M., Chianese, K. A., Wong, C., Gal-Gerber, O., Sapir, T., Siracusa, L. D., Buchberg, A. M., Caskey, C. T., and et al. (1995). Lissencephaly gene (LIS1) expression in the CNS suggests a role in neuronal migration, *J Neurosci* *15*, 3730-8.
- Reiner, O., Carozzo, R., Shen, Y., Wehnert, M., Faustinella, F., Dobyns, W. B., Caskey, C. T., and Ledbetter, D. H. (1993). Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats, *Nature* *364*, 717-21.
- Reinsch, S., and Gonczy, P. (1998). Mechanisms of nuclear positioning, *J Cell Sci* *111 (Pt 16)*, 2283-95.
- Reinsch, S., and Karsenti, E. (1997). Movement of nuclei along microtubules in *Xenopus* egg extracts, *Curr Biol* *7*, 211-4.
- Ren, X. D., Kiosses, W. B., and Schwartz, M. A. (1999). Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton, *Embo J* *18*, 578-85.
- Rickard, J. E., and Kreis, T. E. (1990). Identification of a novel nucleotide-sensitive microtubule-binding protein in HeLa cells, *Journal of cell biology* *110*, 1623-1633.
- Rickard, J. E., and Kreis, T. E. (1991). Binding of pp170 to microtubules is regulated by phosphorylation, *J Biol Chem* *266*, 17597-17605.
- Rickard, J. E., and Kreis, T. E. (1996). CLIPs for organelle-microtubule interactions, *Trends Cell Biol* *6*, 178-83.
- Ridley, A. J., Allen, W. E., Peppelenbosch, M., and Jones, G. E. (1999). Rho family proteins and cell migration, *Biochem Soc Symp* *65*, 111-23.
- Rieder, C. L. (1982). The formation, structure, and composition of the mammalian kinetochore and kinetochore fiber, *International review of cytology* *79*, 1-58.
- Rieder, C. L., and Alexander, S. P. (1990). Kinetochores are transported poleward along a single astral microtubule during chromosome attachment to the spindle in newt lung cells, *J Cell Biol* *110*, 81-95.
- Rieder, C. L., Cole, R. W., Khodjakov, A., and Sluder, G. (1995). The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores, *J Cell Biol* *130*, 941-948.
- Rieder, C. L., Davison, E. A., Jensen, L. C., Cassimeris, L., and Salmon, E. D. (1986). Oscillatory movements of monooriented chromosomes and their position relative to the spindle pole result from the ejection properties of the aster and half-spindle, *J Cell Biol* *103*, 581-91.
- Rieder, C. L., and Salmon, E. D. (1994). Motile kinetochores and polar ejection forces dictate chromosome position on the vertebrate mitotic spindle, *JCell Biol* *124*, 223-233.
- Rieder, C. L., and Salmon, E. D. (1998). The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis, *Trends Cell Biol* *8*, 310-318.
- Riederer, B. M., Pellier, V., Antonsson, B., Di Paolo, G., Stimpson, S. A., Lutjens, R., Catsicas, S., and Grenningloh, G. (1997). Regulation of microtubule dynamics by the neuronal growth-associated protein SCG10, *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 741-5.
- Riehemann, K., and Sorg, C. (1993). Sequence homologies between four cytoskeleton-associated proteins, *TIBS* *18*, 82-3.
- Rivas, R. J., and Hatten, M. E. (1995). Motility and cytoskeletal organization of migrating cerebellar granule neurons, *J Neurosci* *15*, 981-9.

- Robinson, J. T., Wojcik, E. J., Sanders, M. A., McGrail, M., and Hays, T. S. (1999). Cytoplasmic dynein is required for the nuclear attachment and migration of centrosomes during mitosis in *Drosophila*, *J Cell Biol* *146*, 597-608.
- Rogers, S. L., Rogers, G. C., Sharp, D. J., and Vale, R. D. (2002). *Drosophila* EB1 is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle, *J Cell Biol* *158*, 873-84.
- Rosenbaum, J. (2000). Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last, *Curr Biol* *10*, R801-3.
- Roux, A. F., Rommens, J., McDowell, C., Anson-Cartwright, L., Bell, S., Schappert, K., Fishman, G. A., and Musarella, M. (1994). Identification of a gene from Xp21 with similarity to the *tctx-1* gene of the murine t complex, *Hum Mol Genet* *3*, 257-63.
- Ruhrberg, C., and Watt, F. M. (1997). The plakin family: versatile organizers of cytoskeletal architecture, *Curr Opin Genet Dev* *7*, 392-7.
- Rusan, N. M., Tulu, U. S., Fagerstrom, C., and Wadsworth, P. (2002). Reorganization of the microtubule array in prophase/prometaphase requires cytoplasmic dynein-dependent microtubule transport, *J Cell Biol* *158*, 997-1003.
- Saitoh, H., Tomkiel, J., Cooke, C. A., Ratrie, H., 3rd, Maurer, M., Rothfield, N. F., and Earnshaw, W. C. (1992). CENP-C, an autoantigen in scleroderma, is a component of the human inner kinetochore plate, *Cell* *70*, 115-25.
- Salina, D., Bodoor, K., Eckley, D. M., Schroer, T. A., Rattner, J. B., and Burke, B. (2002). Cytoplasmic Dynein as a facilitator of nuclear envelope breakdown, *Cell* *108*, 97-107.
- Sapir, T., Cahana, A., Seger, R., Nekhai, S., and Reiner, O. (1999a). LIS1 is a microtubule-associated phosphoprotein, *Eur J Biochem* *265*, 181-8.
- Sapir, T., Eisenstein, M., Burgess, H. A., Horesh, D., Cahana, A., Aoki, J., Hattori, M., Arai, H., Inoue, K., and Reiner, O. (1999b). Analysis of lissencephaly-causing LIS1 mutations, *Eur J Biochem* *266*, 1011-20.
- Sapir, T., Elbaum, M., and Reiner, O. (1997). Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit, *Embo J* *16*, 6977-84.
- Sasaki, S., Shionoya, A., Ishida, M., Gambello, M. J., Yingling, J., Wynshaw-Boris, A., and Hirotsune, S. (2000). A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system, *Neuron* *28*, 681-96.
- Savoian, M. S., Goldberg, M. L., and Rieder, C. L. (2000). The rate of poleward chromosome motion is attenuated in *Drosophila* *zw10* and rod mutants, *Nat Cell Biol* *2*, 948-52.
- Sawin, K. E. (2000). Microtubule dynamics: the view from the tip, *Curr Biol* *10*, R860-2.
- Sawin, K. E. (2002). Cell polarity: following formin function, *Curr Biol* *12*, R6-8.
- Sawin, K. E., LeGuellac, K., Philippe, M., and Mitchison, T. J. (1992). Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor, *Nature* *359*, 540-3.
- Schafer, D. A., Gill, S. R., Cooper, J. A., Heuser, J. E., and Schroer, T. A. (1994a). Ultrastructural analysis of the dynactin complex: an actin-related protein is a component of a filament that resembles F-actin, *J Cell Biol* *126*, 403-12.
- Schafer, D. A., Korshunova, Y. O., Schroer, T. A., and Cooper, J. A. (1994b). Differential localization and sequence analysis of capping protein beta-subunit isoforms of vertebrates, *J Cell Biol* *127*, 453-65.
- Scheel, J., and Kreis, T. E. (1991). Motor protein independent binding of endocytic carrier vesicles to microtubules in vitro, *J Biol Chem* *266*, 18141-8.
- Scheel, J., Pierre, P., Rickard, J. E., Diamantopoulos, G. S., Valetti, C., van der Goot, F. G., Haner, M., Aebi, U., and Kreis, T. E. (1999). Purification and analysis of authentic CLIP-170 and recombinant fragments, *J Biol Chem* *274*, 25883-91.
- Schiebel, E. (2000). gamma-tubulin complexes: binding to the centrosome, regulation and microtubule nucleation, *Curr Opin Cell Biol* *12*, 113-8.

- Schliwa, M., and Höner, B. (1993). Microtubules, centrosomes and intermediate filaments in directed cell movement, *Trends Cell Biol* 3, 377-380.
- Schmeichel, K. L., and Beckerle, M. C. (1998). LIM domains of cysteine-rich protein 1 (CRP1) are essential for its zyxin-binding function, *Biochem J* 331, 885-92.
- Schroer, T. (1996). Structure and function of dynactin., *Seminars in Cell and Dev Biol* 7, 321-328.
- Schroer, T. A. (1994a). New insights into the interaction of cytoplasmic dynein with the actin-related protein, Arp1, *J Cell Biol* 127, 1-4.
- Schroer, T. A. (1994b). Structure, function and regulation of cytoplasmic dynein, *Curr Opin Cell Biol* 6, 69-73.
- Schroer, T. A. (2001). Microtubules don and doff their caps: dynamic attachments at plus and minus ends, *Curr Opin Cell Biol* 13, 92-6.
- Schroer, T. A., Schnapp, B. J., Reese, T. S., and Sheetz, M. P. (1988). The role of kinesin and other soluble factors in organelle movement along microtubules, *J Cell Biol* 107, 1785-92.
- Schroer, T. A., and Sheetz, M. P. (1991). Two activators of microtubule-based vesicle transport, *J Cell Biol* 115, 1309-18.
- Schroer, T. A., Steuer, E. R., and Sheetz, M. P. (1989). Cytoplasmic dynein is a minus-end directed motor for membranous organelles, *Cell* 56, 937-46.
- Schultz, N., and Onfelt, A. (2001). Spindle positioning in fibroblasts supports an astral microtubule length dependent force generation at the basal membrane, *Cell Motil Cytoskeleton* 50, 69-88.
- Schuyler, S. C., and Pellman, D. (2001a). Microtubule "plus-end-tracking proteins". the end is just the beginning, *Cell* 105, 421-4.
- Schuyler, S. C., and Pellman, D. (2001b). Search, capture and signal: games microtubules and centrosomes play, *J Cell Sci* 114, 247-55.
- Segal, M., and Bloom, K. (2001). Control of spindle polarity and orientation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Trends Cell Biol* 11, 160-6.
- Shah, J. V., and Cleveland, D. W. (2000). Waiting for anaphase: Mad2 and the spindle assembly checkpoint, *Cell* 103, 997-1000.
- Sharp, D. J., Brown, H. M., Kwon, M., Rogers, G. C., Holland, G., and Scholey, J. M. (2000a). Functional coordination of three mitotic motors in *Drosophila* embryos, *Mol Biol Cell* 11, 241-53.
- Sharp, D. J., McDonald, K. L., Brown, H. M., Matthies, H. J., Walczak, C., Vale, R. D., Mitchison, T. J., and Scholey, J. M. (1999). The bipolar kinesin, KLP61F, cross-links microtubules within interpolar microtubule bundles of *Drosophila* embryonic mitotic spindles, *J Cell Biol* 144, 125-38.
- Sharp, D. J., Rogers, G. C., and Scholey, J. M. (2000b). Cytoplasmic dynein is required for poleward chromosome movement during mitosis in *Drosophila* embryos, *Nat Cell Biol* 2, 922-30.
- Shelden, E., and Wadsworth, P. (1992). Microinjection of biotin-tubulin into anaphase cells induces transient elongation of kinetochore microtubules and reversal of chromosome-to-pole motion, *J Cell Biol* 116, 1409-20.
- Short, B., Preisinger, C., Schaletzky, J., Kopajtich, R., and Barr, F. A. (2002). The Rab6 GTPase Regulates Recruitment of the Dynactin Complex to Golgi Membranes, *Curr Biol* 12, 1792-5.
- Simon, J. R., and Salmon, E. D. (1990). The structure of microtubule ends during the elongation and shortening phases of dynamic instability examined by negative-stain electron microscopy, *J Cell Sci* 96, 571-82.
- Skibbens, R. V., Skeen, V. P., and Salmon, E. D. (1993). Directional instability of kinetochore motility during chromosome congression and segregation in mitotic newt lung cells: a push-pull mechanism, *J Cell Biol* 122, 859-75.
- Skop, A. R., and White, J. G. (1998). The dynactin complex is required for cleavage plane specification in early *Caenorhabditis elegans* embryos, *Curr Biol* 8, 1110-6.

- Skoufias, D. A., Andreassen, P. R., Lacroix, F. B., Wilson, L., and Margolis, R. L. (2001). Mammalian mad2 and bub1/bubR1 recognize distinct spindle-attachment and kinetochore-tension checkpoints, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4492-7.
- Sluder, G., and Rieder, C. L. (1985). Experimental separation of pronuclei in fertilized sea urchin eggs: chromosomes do not organize a spindle in the absence of centrosomes, *J Cell Biol* 100, 897-903.
- Smith, D. S., Niethammer, M., Ayala, R., Zhou, Y., Gambello, M. J., Wynshaw-Boris, A., and Tsai, L. H. (2000). Regulation of cytoplasmic dynein behaviour and microtubule organization by mammalian Lis1, *Nat Cell Biol* 2, 767-775.
- Sosa, H., and Milligan, R. A. (1996). Three-dimensional structure of ncd-decorated microtubules obtained by a back-projection method, *J Mol Biol* 260, 743-55.
- South, T. L., and Summers, M. F. (1993). Zinc- and sequence-dependent binding to nucleic acids by the N-terminal zinc finger of the HIV-1 nucleocapsid protein: NMR structure of the complex with the Psi-site analog, dACGCC, *Protein Sci* 2, 3-19.
- Spurck, T. P., Stonington, O. G., Snyder, J. A., Pickett-Heaps, J. D., Bajer, A., and Mole-Bajer, J. (1990). UV microbeam irradiations of the mitotic spindle. II. Spindle fiber dynamics and force production, *J Cell Biol* 111, 1505-18.
- Starr, D. A., Williams, B. C., Hays, T. S., and Goldberg, M. L. (1998). ZW10 helps recruit dynactin and dynein to the kinetochore, *Journal of Cell Biology* 142, 763-774.
- Stearns, T. (1997). Motoring to the finish: kinesin and dynein work together to orient the yeast mitotic spindle [comment], *J Cell Biol* 138, 957-60.
- Stearns, T., and Kirschner, M. (1994). In vitro reconstitution of centrosome assembly and function: the central role of gamma-tubulin, *Cell* 76, 623-37.
- Steffen, W., Hodgkinson, J. L., and Wiche, G. (1996). Immunogold localisation of the intermediate chain within the protein complex of cytoplasmic dynein, *J Struct Biol* 117, 227-35.
- Steffen, W., Karki, S., Vaughan, K. T., Vallee, R. B., Holzbaaur, E. L., Weiss, D. G., and Kuznetsov, S. A. (1997). The involvement of the intermediate chain of cytoplasmic dynein in binding the motor complex to membranous organelles of *Xenopus* oocytes, *Mol Biol Cell* 8, 2077-88.
- Steuer, E. R., Wordeman, L., Schroer, T. A., and Sheetz, M. P. (1990). Localization of cytoplasmic dynein to mitotic spindles and kinetochores., *Nature* 345, 266-268.
- Stukenberg, P. T., Lustig, K. D., McGarry, T. J., King, R. W., Kuang, J., and Kirschner, M. W. (1997). Systematic identification of mitotic phosphoproteins, *Curr Biol* 7, 338-48.
- Su, L. K., Burrell, M., Hill, D. E., Gyuris, J., Brent, R., Wiltshire, R., Trent, J., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1995). APC binds to the novel protein EB1, *Cancer Res* 55, 2972-7.
- Sudakin, V., Chan, G. K. T., and Yen, T. J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2, *J Cell Biol* 154, 925-936.
- Swan, A., Nguyen, T., and Suter, B. (1999). *Drosophila* Lissencephaly-1 functions with Bic-D and dynein in oocyte determination and nuclear positioning, *Nat Cell Biol* 1, 444-449.
- Swan, A., and Suter, B. (1996). Role of Bicaudal-D in patterning the *Drosophila* egg chamber in mid-oogenesis, *Development* 122, 3577-86.
- Swaroop, A., Sun, J. W., Paco-Larson, M. L., and Garen, A. (1986). Molecular organization and expression of the genetic locus glued in *Drosophila melanogaster*, *Mol Cell Biol* 6, 833-41.
- Swaroop, A., Swaroop, M., and Garen, A. (1987). Sequence analysis of the complete cDNA and encoded polypeptide for the Glued gene of *Drosophila melanogaster*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6501-5.
- Tai, A. W., Chuang, J.-Z., and Sung, C.-H. (2001). Cytoplasmic Dynein Regulation by Subunit Heterogeneity and Its Role in Apical Transport, *J Cell Biol* 153, 1499-1510.
- Tai, A. W., Chuang, J. Z., and Sung, C. H. (1998). Localization of Tctex-1, a cytoplasmic dynein light chain, to the Golgi apparatus and evidence for dynein complex heterogeneity, *J Biol Chem* 273, 19639-49.

- Tai, C.-Y., Dujardin, D. L., Faulkner, N. E., and Vallee, R. B. (2002). Role of dynein, dynactin, and CLIP-170 interactions in LIS1 kinetochore function, *J Cell Biol* *156*, 959-968.
- Tanaka, E., and Kirschner, M. W. (1995). The role of microtubules in growth cone turning at substrate boundaries, *J Cell Biol* *128*, 127-37.
- Tanaka, Y., Zhang, Z., and Hirokawa, N. (1995). Identification and molecular evolution of new dynein-like protein sequences in rat brain, *J Cell Sci* *108*, 1883-93.
- Tanchou, V., Decimo, D., Pechoux, C., Lener, D., Rogemond, V., Berthoux, L., Ottmann, M., and Darlix, J. L. (1998). Role of the N-terminal zinc finger of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein in virus structure and replication, *J Virol* *72*, 4442-7.
- Tang, Z., Bharadwaj, R., Li, B., and Yu, H. (2001). Mad2-Independent inhibition of APCCdc20 by the mitotic checkpoint protein BubR1, *Dev Cell* *1*, 227-37.
- Tarsounas, M., Pearlman, R. E., and Moens, P. B. (2001). Clip-50 immunolocalization during mouse spermiogenesis suggests a role in shaping the sperm nucleus, *Dev Biol* *236*, 400-10.
- Tassin, A. M., Celati, C., Moudjou, M., and Bornens, M. (1998). Characterization of the human homologue of the yeast spc98p and its association with gamma-tubulin, *J Cell Biol* *141*, 689-701.
- Theurkauf, W. E., and Hawley, R. S. (1992). Meiotic spindle assembly in *Drosophila* females: behavior of nonexchange chromosomes and the effects of mutations in the nod kinesin-like protein, *J Cell Biol* *116*, 1167-80.
- Thiemann, M., Schrader, M., Volkl, A., Baumgart, E., and Fahimi, H. D. (2000). Interaction of peroxisomes with microtubules. In vitro studies using a novel peroxisome-microtubule binding assay, *Eur J Biochem* *267*, 6264-75.
- Tigyi, G., Fischer, D. J., Sebok, A., Marshall, F., Dyer, D. L., and Miledi, R. (1996). Lysophosphatidic acid-induced neurite retraction in PC12 cells: neurite-protective effects of cyclic AMP signaling, *J Neurochem* *66*, 549-58.
- Tinsley, J. H., Minke, P. F., Bruno, K. S., and Plamann, M. (1996). p150Glued, the largest subunit of the dynactin complex, is nonessential in *Neurospora* but required for nuclear distribution, *Mol Biol Cell* *7*, 731-42.
- Tirnauer, J. S., and Bierer, B. E. (2000). EB1 proteins regulate microtubule dynamics, cell polarity, and chromosome stability, *J Cell Biol* *149*, 761-6.
- Tirnauer, J. S., O'Toole, E., Berrueta, L., Bierer, B. E., and Pellman, D. (1999). Yeast Bim1p promotes the G1-specific dynamics of microtubules, *J Cell Biol* *145*, 993-1007.
- Tokai, N., Fujimoto-Nishiyama, A., Toyoshima, Y., Yonemura, S., Tsukita, S., Inoue, J., and Yamamota, T. (1996). Kid, a novel kinesin-like DNA binding protein, is localized to chromosomes and the mitotic spindle, *Embo J* *15*, 457-67.
- Tokito, M. K., Howland, D. S., Lee, V. M., and Holzbaur, E. L. (1996). Functionally distinct isoforms of dynactin are expressed in human neurons, *Mol Biol Cell* *7*, 1167-80.
- Tomasek, J. J., and Hay, E. D. (1984). Analysis of the role of microfilaments and microtubules in acquisition of bipolarity and elongation of fibroblasts in hydrated collagen gels, *J Cell Biol* *99*, 536-49.
- Tomkiel, J., Cooke, C. A., Saitoh, H., Bernat, R. L., and Earnshaw, W. C. (1994). CENP-C is required for maintaining proper kinetochore size and for a timely transition to anaphase, *J Cell Biol* *125*, 531-45.
- Tournebize, R., Andersen, S. S., Verde, F., Doree, M., Karsenti, E., and Hyman, A. A. (1997). Distinct roles of PP1 and PP2A-like phosphatases in control of microtubule dynamics during mitosis, *Embo J* *16*, 5537-49.
- Tournebize, R., Popov, A., Kinoshita, K., Ashford, A. J., Rybina, S., Pozniakovsky, A., Mayer, T. U., Walczak, C. E., Karsenti, E., and Hyman, A. A. (2000). Control of microtubule dynamics by the antagonistic activities of XMAP215 and XKCM1 in *Xenopus* egg extracts, *Nat Cell Biol* *2*, 13-9.
- Tynan, S. H., Gee, M. A., and Vallee, R. B. (2000a). Distinct but overlapping sites within the cytoplasmic dynein heavy chain for dimerization and for intermediate chain and light intermediate chain binding, *J Biol Chem* *275*, 32769-74.

- Tynan, S. H., Purohit, A., Doxsey, S. J., and Vallee, R. B. (2000b). Light intermediate chain 1 defines a functional subfraction of cytoplasmic dynein which binds to pericentrin, *J Biol Chem* *275*, 32763-8.
- Vaisberg, E. A., Grissom, P. M., and McIntosh, J. R. (1996). Mammalian cells express three distinct dynein heavy chains that are localized to different cytoplasmic organelles, *J Cell Biol* *133*, 831-42.
- Vaisberg, E. A., Koonce, M. P., and McIntosh, J. R. (1993). Cytoplasmic dynein plays a role in mammalian mitotic spindle formation, *J Cell Biol* *123*, 849-58.
- Valetti, C., Wetzel, D. M., Schrader, M., Hasbani, M. J., Gill, S. R., Kreis, T. E., and Schroer, T. A. (1999). Role of dynactin in endocytic traffic: effects of dynamitin overexpression and colocalization with CLIP-170, *Mol Biol Cell* *10*, 4107-20.
- Valiron, O., Caudron, N., and Job, D. (2001). Microtubule dynamics, *Cell Mol Life Sci* *58*, 2069-84.
- Vallee, R. B., and Sheetz, M. P. (1996). Targeting of motor proteins, *Science* *271*, 1539-44.
- Vallee, R. B., Wall, J. S., Paschal, B. M., and Shpetner, H. S. (1988). Microtubule-associated protein 1C from brain is a two-headed cytosolic dynein, *Nature* *332*, 561-3.
- Van Aelst, L., and D'Souza-Schorey, C. (1997). Rho GTPases and signaling networks, *Genes Dev* *11*, 2295-322.
- Vasiliev, J. M., Gelfand, I. M., Domnina, L. V., Ivanova, O. Y., Komm, S. G., and Olshevskaja, L. V. (1970). Effect of colcemid on the locomotory behaviour of fibroblasts, *J Embryol Exp Morphol* *24*, 625-40.
- Vasquez, R. J., Gard, D. L., and Cassimeris, L. (1994). XMAP from *Xenopus* eggs promotes rapid plus end assembly of microtubules and rapid microtubule polymer turnover, *J Cell Biol* *127*, 985-93.
- Vaughan, K. T., Mikami, A., Paschal, B. M., Holzbaur, E. L., Hughes, S. M., Echeverri, C. J., Moore, K. J., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Vallee, R. B. (1996). Multiple mouse chromosomal loci for dynein-based motility, *Genomics* *36*, 29-38.
- Vaughan, K. T., Tynan, S. H., Faulkner, N. E., Echeverri, C. J., and Vallee, R. B. (1999). Colocalization of cytoplasmic dynein with dynactin and CLIP-170 at microtubule distal ends, *J Cell Sci* *112*, 1437-47.
- Vaughan, K. T., and Vallee, R. B. (1995). Cytoplasmic dynein binds dynactin through a direct interaction between the intermediate chains and p150Glued, *J Cell Biol* *131*, 1507-16.
- Vaughan, P. S., Leszyk, J. D., and Vaughan, K. T. (2001). Cytoplasmic dynein intermediate chain phosphorylation regulates binding to dynactin, *J Biol Chem* *276*, 26171-9.
- Vaughan, P. S., Miura, P., Henderson, M., Byrne, B., and Vaughan, K. T. (2002). A role for regulated binding of p150Glued to microtubule plus ends in organelle transport, *J Cell Biol* *158*, 305-19.
- Vernos, I., and Karsenti, E. (1996). Motors involved in spindle assembly and chromosome segregation, *Curr Opin Cell Biol* *8*, 4-9.
- Vernos, I., Raats, J., Hirano, T., Heasman, J., Karsenti, E., and Wylie, C. (1995). Xklp1, a chromosomal *Xenopus* kinesin-like protein essential for spindle organization and chromosome positioning, *Cell* *81*, 117-27.
- Vorobjev, I. A., Svitkina, T. M., and Borisy, G. G. (1997). Cytoplasmic assembly of microtubules in cultured cells, *J Cell Sci* *110*, 2635-45.
- Wacker, I. U., Rickard, J. E., De Mey, J. R., and Kreis, T. E. (1992). Accumulation of microtubule-binding protein, pp170, at desmosomal plaques, *J Cell Biol* *117*, 813-24.
- Wade, R. H., Horowitz, R., and Milligan, R. A. (1995). Toward understanding the structure and interactions of microtubules and motor proteins, *Proteins* *23*, 502-9.
- Wade, R. H., and Hyman, A. A. (1997). Microtubule structure and dynamics., *Current opinion in cell biology* *9*, 12-7.
- Walczak, C. E. (2000). Microtubule dynamics and tubulin interacting proteins, *Curr Opin Cell Biol* *12*, 52-6.
- Walczak, C. E., Mitchison, T. J., and Desai, A. (1996). XKCM1: a *Xenopus* kinesin-related protein that regulates microtubule dynamics during mitotic spindle assembly, *Cell* *84*, 37-47.

- Walczak, C. E., Vernos, I., Mitchison, T. J., Karsenti, E., and Heald, R. (1998). A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity, *Curr Biol* 8, 903-13.
- Walker, R. A., O'Brien, E. T., Pryer, N. K., Soboeiro, M. F., Voter, W. A., Erickson, H. P., and Salmon, E. D. (1988). Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies, *J Cell Biol* 107, 1437-48.
- Wall, M. A., Coleman, D. E., Lee, E., Iniguez-Lluhi, J. A., Posner, B. A., Gilman, A. G., and Sprang, S. R. (1995). The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2, *Cell* 83, 1047-58.
- Wang, H., and Satir, P. (1998). The 29 kDa light chain that regulates axonemal dynein activity binds to cytoplasmic dyneins, *Cell Motil Cytoskeleton* 39, 1-8.
- Wassmann, K., and Benezra, R. (2001). Mitotic checkpoints: from yeast to cancer, *Curr Opin Genet Dev* 11, 83-90.
- Waterman-Storer, C. M., and Holzbaur, E. L. (1996). The product of the *Drosophila* gene, *Glued*, is the functional homologue of the p150Glued component of the vertebrate dynactin complex, *J Biol Chem* 271, 1153-9.
- Waterman-Storer, C. M., Karki, S., and Holzbaur, E. L. (1995). The p150Glued component of the dynactin complex binds to both microtubules and the actin-related protein centractin (Arp-1), *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 1634-1638.
- Waterman-Storer, C. M., Karki, S. B., Kuznetsov, S. A., Tabb, J. S., Weiss, D. G., Langford, G. M., and Holzbaur, E. L. (1997). The interaction between cytoplasmic dynein and dynactin is required for fast axonal transport, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12180-5.
- Waters, J. C., Chen, R. H., Murray, A. W., and Salmon, E. D. (1998). Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension, *J Cell Biol* 141, 1181-1191.
- Waters, J. C., and Salmon, E. D. (1996). Cytoskeleton: a catastrophic kinesin, *Curr Biol* 6, 361-3.
- Webster, D. R., Wehland, J., Weber, K., and Borisy, G. G. (1990). Detyrosination of alpha tubulin does not stabilize microtubules in vivo, *J Cell Biol* 111, 113-22.
- Wendell, K. L., Wilson, L., and Jordan, M. A. (1993). Mitotic block in HeLa cells by vinblastine: ultrastructural changes in kinetochore-microtubule attachment and in centrosomes, *J Cell Sci* 104, 261-74.
- Westwick, J. K., Lambert, Q. T., Clark, G. J., Symons, M., Van Aelst, L., Pestell, R. G., and Der, C. J. (1997). Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways, *Mol Cell Biol* 17, 1324-35.
- Wiese, C., and Zheng, Y. (2000). A new function for the gamma-tubulin ring complex as a microtubule minus-end cap, *Nat Cell Biol* 2, 358-64.
- Williams, B. C., Karr, T. L., Montgomery, J. M., and Goldberg, M. L. (1992). The *Drosophila* l(1)zw10 gene product, required for accurate mitotic chromosome segregation, is redistributed at anaphase onset, *J Cell Biol* 118, 759-73.
- Willins, D. A., Liu, B., Xiang, X., and Morris, N. R. (1997). Mutations in the heavy chain of cytoplasmic dynein suppress the nudF nuclear migration mutation of *Aspergillus nidulans*, *Mol Gen Genet* 255, 194-200.
- Willins, D. A., Xiang, X., and Morris, N. R. (1995). An alpha tubulin mutation suppresses nuclear migration mutations in *Aspergillus nidulans*, *Genetics* 141, 1287-98.
- Wilson, M. J., Salata, M. W., Susalka, S. J., and Pfister, K. K. (2001). Light chains of mammalian cytoplasmic dynein: identification and characterization of a family of LC8 light chains, *Cell Motil Cytoskeleton* 49, 229-40.
- Winey, M., and O'Toole, E. T. (2001). The spindle cycle in budding yeast, *Nat Cell Biol* 3, E23-7.
- Wittmann, T., and Waterman-Storer, C. M. (2001). Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way?, *J Cell Sci* 114, 3795-3803.
- Wojcik, E., Basto, R., Serr, M., Scaerou, F., Karess, R., and Hays, T. (2001). Kinetochore dynein: its dynamics and role in the transport of the Rough deal checkpoint protein, *Nat Cell Biol* 3, 1001-7.

- Wordeman, L., and Mitchison, T. J. (1995). Identification and partial characterization of mitotic centromere-associated kinesin, a kinesin-related protein that associates with centromeres during mitosis, *J Cell Biol* *128*, 95-104.
- Wordeman, L., Steuer, E. R., Sheetz, M. P., and Mitchison, T. (1991). Chemical subdomains within the kinetochore domain of isolated CHO mitotic chromosomes, *J Cell Biol* *114*, 285-94.
- Xia, L., Hai, B., Gao, Y., Burnette, D., Thazhath, R., Duan, J., Bre, M. H., Levilliers, N., Gorovsky, M. A., and Gaertig, J. (2000). Polyglycylation of tubulin is essential and affects cell motility and division in *Tetrahymena thermophila*, *J Cell Biol* *149*, 1097-106.
- Xiang, X., Beckwith, S. M., and Morris, N. R. (1994). Cytoplasmic dynein is involved in nuclear migration in *Aspergillus nidulans*, *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 2100-4.
- Xiang, X., Han, G., Winkelmann, D. A., Zuo, W., and Morris, N. R. (2000). Dynamics of cytoplasmic dynein in living cells and the effect of a mutation in the dynactin complex actin-related protein Arp1, *Curr Biol* *10*, 603-6.
- Xiang, X., Osmani, A. H., Osmani, S. A., Xin, M., and Morris, N. R. (1995a). NudF, a nuclear migration gene in *Aspergillus nidulans*, is similar to the human LIS-1 gene required for neuronal migration, *Mol Biol Cell* *6*, 297-310.
- Xiang, X., Roghi, C., and Morris, N. R. (1995b). Characterization and localization of the cytoplasmic dynein heavy chain in *Aspergillus nidulans*, *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 9890-4.
- Yang, Y., Bauer, C., Strasser, G., Wollman, R., Julien, J. P., and Fuchs, E. (1999). Integrators of the cytoskeleton that stabilize microtubules, *Cell* *98*, 229-38.
- Yao, X., Abrieu, A., Zheng, Y., Sullivan, K. F., and Cleveland, D. W. (2000). CENP-E forms a link between attachment of spindle microtubules to kinetochores and the mitotic checkpoint, *Nat Cell Biol* *2*, 484-491.
- Yao, X., Anderson, K. L., and Cleveland, D. W. (1997). The microtubule-dependent motor centromere-associated protein E (CENP-E) is an integral component of kinetochore corona fibers that link centromeres to spindle microtubules, *J Cell Biol* *139*, 435-47.
- Yu, H., Toyoshima, I., Steuer, E. R., and Sheetz, M. P. (1992). Kinesin and cytoplasmic dynein binding to brain microsomes, *J Biol Chem* *267*, 20457-64.
- Yvon, A. M., and Wadsworth, P. (1997). Non-centrosomal microtubule formation and measurement of minus end microtubule dynamics in A498 cells, *J Cell Sci* *110*, 2391-401.
- Zhang, D., and Nicklas, R. B. (1995a). Chromosomes initiate spindle assembly upon experimental dissolution of the nuclear envelope in grasshopper spermatocytes, *J Cell Biol* *131*, 1125-31.
- Zhang, D., and Nicklas, R. B. (1995b). The impact of chromosomes and centrosomes on spindle assembly as observed in living cells, *J Cell Biol* *129*, 1287-300.
- Zhang, J., Han, G., and Xiang, X. (2002a). Cytoplasmic dynein intermediate chain and heavy chain are dependent upon each other for microtubule end localization in *Aspergillus nidulans*, *Mol Microbiol* *44*, 381-92.
- Zhang, M. Y., Huang, N. N., Clawson, G. A., Osmani, S. A., Pan, W., Xin, P., Razzaque, M. S., and Miller, B. A. (2002b). Involvement of the fungal nuclear migration gene nudC human homolog in cell proliferation and mitotic spindle formation, *Exp Cell Res* *273*, 73-84.
- Zheng, Y., Wong, M. L., Alberts, B., and Mitchison, T. (1995). Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex, *Nature* *378*, 578-83.

ANNEXES

ARTICLE III

Interaction of Maf Transcription Factors with Pax-6 Results in Synergistic Activation of the Glucagon Promoter*

Received for publication, May 17, 2001, and in revised form, July 5, 2001
Published, JBC Papers in Press, July 16, 2001, DOI 10.1074/jbc.M104523200

Nathalie Planque, Laurence Leconte, Frédéric M. Coquelle, Sofia Benkhelifa, Patrick Martin, Marie-Paule Felder-Schmittbuhl, and Simon Saule‡

From the CNRS-UMR 146, Institut Curie-Section de Recherche, Bât 110, Centre Universitaire, 91405 Orsay, France

In the endocrine pancreas, α -cell-specific expression of the glucagon gene is mediated by DNA-binding proteins that interact with the G1 proximal promoter element. Among these proteins, the paired domain transcription factor Pax-6 has been shown to bind to G1 and to transactivate glucagon gene expression. Close to the Pax-6-binding site, we observed the presence of a binding site for a basic leucine zipper transcription factor of the Maf family. In the present study, we demonstrate the presence of Maf family members in the endocrine pancreas that bind to G1 and transactivate glucagon promoter expression. In transient transfection experiments, we found that the transactivating effect on the glucagon promoter was greatly enhanced by the simultaneous expression of Maf transcription factors and Pax-6. This enhancement on glucagon transactivation could be correlated with the ability of these proteins to interact together but does not require binding of Maf proteins to the G1 element. Furthermore, we found that Maf enhanced the Pax-6 DNA binding capacity. Our data indicate that Maf transcription factors may contribute to glucagon gene expression in the pancreas.

Pax-6 is a member of the paired domain family of transcription factors and has a specialized homeodomain downstream from the DNA-binding paired domain and upstream from the C-terminal activation domain (1, 2). Pax-6 encodes five proteins through alternative splicing and internal initiations (3). Three proteins of 48, 46, and 43 kDa contain the paired domain, whereas two proteins of 33 and 32 kDa are devoid of this DNA binding domain. Pax-6 is known to be critical for eye development (4, 5), where it is required for lens differentiation and crystalline gene expression (6, 7). Pax-6 is also required for the development of all pancreatic endocrine cells and of duodenal GIP-positive cells and gastrin- and somatostatin-producing cells in the stomach (8–10). The α -cell-specific glucagon gene expression in pancreas is conferred by the proximal G1 promoter element (11). The G1 element contains two AT-rich sequences that are recognized by the homeodomain containing Cdx-2/3, Pax-6, and brain-4 (12–14). Pax-6 and Cdx-2/3 have been shown to bind directly to each other and to transactivate synergistically the glucagon gene via their interaction with the G1 element (14). This effect is even enhanced by interaction of these proteins with the p300 coactivator (15). Fine-tuning of

cell type-specific gene expression and lineage-specific cell differentiation seems to be achieved by cooperative and inhibitory interactions of transcription factors. To understand the mechanisms of transcriptional regulation in pancreas, it is important to clarify the regulatory cross-talk that occurs with other transcription factors on the G1 element. Examination of the G1 element nucleotide sequence revealed the presence of a potential binding site (16) for a basic region leucine zipper (bZip) domain transcription factor of the Maf family, located close to the Pax-6-binding element.

Loss-of-function of the c-Maf bZip¹ factor results in defective differentiation of lens fiber cells (17, 18). Ectopic expression of L-Maf/MafA results in conversion of ectodermal cells into lens fibers cells, and this factor is able to activate the promoters of crystalline genes (19). L-Maf/MafA, which is expressed in both lens and retina, displays mitogenic capacity when overexpressed in avian neuroretina cells (20). A variety of developmental roles and transcriptional targets has been proposed for Maf transcription factors. The *v-maf* oncogene is the earliest described member of the family (21). Large Maf subfamily members (c-Maf, L-Maf/MafA, MafB, and Nrl) contain an activation domain at the N terminus, whereas small Maf subfamily members (MafF, MafK, and MafG) lack a distinct activation domain (22). Maf transcription factors share structural similarity both within and outside the basic leucine zipper domain and bind common recognition elements, 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate type Maf response element or cyclic AMP-response element type (16, 23). Homo- and heterodimerization through leucine zipper domains is one of the most important mechanisms underlying transcriptional regulation by bZip factors. All the Maf family members can form heterodimers with other bZip factors like Fos and Jun, and these heterodimers are different in their DNA binding specificity from Maf homodimers or AP-1 complexes (16, 24). BZip transcription factors are also able to interact with unrelated transcription factors like glucocorticoid receptors or Ets family members (25, 26). In the case of c-Maf, interaction with the transcription factor c-Myb plays a role during myeloid cell differentiation (27), whereas MafB interaction with c-Ets-1 represses its transcriptional activity, resulting in the inhibition of erythroid cells differentiation (28). Recently, Maf family members were shown to associate with a set of Hox proteins, resulting in the inhibition of Maf DNA binding, transactivation, and transforming activities (29). Thus, in view of the involvement of both Pax-6 and Maf in common developmental processes (such as lens formation), and the presence of the binding sites for both fac-

* This work was supported by grants from the CNRS, the Institut Curie, the Association Retina France, the Association pour la Recherche Contre le Cancer, the Ligue Nationale Contre le Cancer, and L'Association de Secours Des Amis des Sciences. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33 1 69 86 71 53; Fax: 33 1 69 07 45 25; E-mail: Simon.Saule@curie.u-psud.fr.

¹ The abbreviations used are: bZip, basic region leucine zipper; GST, glutathione *S*-transferase; CAT, chloramphenicol acetyltransferase; BHK, baby hamster kidney; LTR, long term repeat; PBS, phosphate-buffered saline; Pipes, 1,4-piperazinediethanesulfonic acid; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction; GFP, green fluorescent protein; EGFP, enhanced GFP; DsRed, Discosoma striata red protein.

tors in the G1 element, we tested whether they could interact with and influence each other.

We show that Pax-6 and MafA/L-Maf interact through their transactivation domains. This interaction results in Pax-6-enhanced DNA binding capacity on the G1 element where MafA/L-Maf is indeed able to bind. Cotransfection of a MafA/L-Maf expression plasmid and the G1-containing glucagon promoter results in an increase in CAT activity relatively to the control vector, showing that MafA can activate the glucagon promoter. Cotransfection of MafA/L-Maf expression plasmid with Pax-6 expression vector results in a 5-fold increase in CAT activity over the effect of each factor alone, suggesting a synergistic effect in expression of glucagon promoter through the G1 element by Pax-6 and MafA. This synergistic effect requires a functional paired domain but not the homeodomain. In contrast, as shown with two DNA-binding mutants, the DNA binding capacity of Maf is dispensable. Surprisingly, when the transactivation domain of MafA/Maf-L is removed, this truncated factor still increases the Pax-6 effect on the glucagon promoter. Maf protein strongly enhances the binding of Pax-6 to the G1 element, even when truncated in the transactivation domain or without DNA-binding properties. Finally, we demonstrate the presence of MafA/L-Maf in pancreas and c-Maf in endocrine cells, suggesting that Maf family members may play a role in the pancreas function.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Constructs—pcDNA3-MafA expression vector was obtained by inserting an *EcoRI* fragment corresponding to MafA open reading frame into the *EcoRI* site of a modified pcDNA3 vector, in frame with HA1 epitope coding sequence. Generation of mutant MafA containing the L2PL4P mutation and of truncated MafA corresponding to the bZip domain was described previously (20). For eukaryotic expression, *EcoRI* fragments corresponding to these open reading frames were inserted into the *EcoRI* site of modified pcDNA3 vector as for wild type MafA.

For the synthesis of GST-MafA recombinant proteins, the *EcoRI* fragment corresponding to MafA open reading frame was subcloned into the *EcoRI* site of pGex-4T1 vector (Amersham Pharmacia Biotech). For the synthesis of GST-MafA(1–151) proteins an *EagI* deletion, eliminating the bZip domain, was performed in the previous construct. For the synthesis of GST-MafA(151–286) proteins, an *EagI* fragment corresponding to MafA bZip domain was subcloned into the *NotI* site of pGex-4T2 (Amersham Pharmacia Biotech).

Reporter construct (*QR1*-Abox(X4)-TK) carrying a multimerized A box from the neuroretina-specific *QR1* gene, upstream of the thymidine kinase promoter, was described previously (20).

The glucagon promoter construct –138M3 was mutated in the MafA-binding site. To generate this mutant we used the Chameleon double-stranded site-directed mutagenesis kit (Stratagene) using the –138 CAT as a template and oligonucleotide G1–51M3 (5'-CAA AAC CCC ATT ATT TAC AGA TGA GAA ATT TAT ATT GTC CTG GTA ATA TCT-3').

In Vitro Translation and Glutathione S-transferase (GST) Pull-down Assays—The ³⁵S-radiolabeled proteins were translated *in vitro* using the TNT system (Promega). The GST chimerical proteins were extracted from bacteria following the Amersham Pharmacia Biotech instructions. The labeled proteins were preincubated with empty glutathione-Sepharose beads 30 min at 4 °C. The GST proteins on glutathione-Sepharose beads were preincubated with 40 μg of BSA. Bead volumes were kept constant by adding empty beads. The pull-down assays were performed in 25 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM KCl, 12.5 mM MgCl₂, 0.1% Nonidet P-40, 20% glycerol. Proteins were incubated for 1 h at 4 °C and then the beads were washed four times in 20 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40.

Cell Cultures, Transfections, Luciferase, and CAT Assays—Baby hamster kidney (BHK)-21 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 containing 10% fetal calf serum, 1% vitamins, 100× minimum Eagle's medium, and 10 μg/ml conalbumin. Cells were seeded 24 h prior to transfection. BHK21 cells transfections were performed with polyethyleneimine (exgen 500, Euromedex, Souffelweyerheim) reagent according to the instructions of the manufacturer. 200 ng of expression plasmids were cotransfected except where mentioned in the figure legend. αTC cells transfections were performed by the calcium-phosphate method. The total amount of transfected DNA was kept constant by addition of empty expression vector DNA. A LRTRSV-

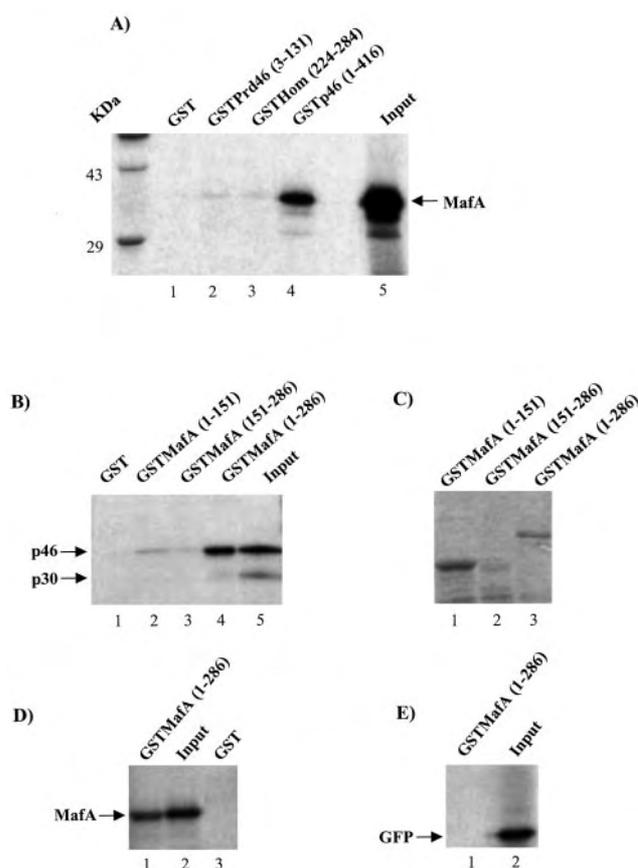


FIG. 1. Pax-6 and MafA/L-Maf interact *in vitro*. *A*, the ³⁵S-labeled full-length MafA protein was translated *in vitro* and incubated with GST, GST fused to the paired domain of p46, GST homeodomain, or GST full-length p46 proteins. The GST protein showed no interaction with the translated MafA protein (*lane 1*). The paired domain of p46 interacts with MafA (*lane 2*), such as the p46 homeodomain (*lane 3*). Stronger interaction was observed with the full-length protein (*lane 4*). *Lane 5*, 40% of the reticulocyte lysate was loaded onto the glutathione-Sepharose beads. *Numbers* refer to amino acids. *B*, the ³⁵S-labeled full-length Pax-6 protein was translated *in vitro* and incubated with GST alone (*lane 1*), GST fused to the N-terminal part of MafA (*lane 2*), to the C-terminal part of MafA (*lane 3*), or to the full-length MafA protein (*lane 4*). *Lane 5*, 20% of the reticulocyte lysate was loaded onto the glutathione-Sepharose beads. p46 and p30 identify the full size Pax-6 and the paired-less proteins, respectively (3). *C*, the different GST-Maf fusion proteins used in the pull-down of *B* are shown after Coomassie Blue staining of the gel. *D*, the ³⁵S-labeled full-length MafA protein was translated *in vitro* and incubated with GST-MafA(1–286). A specific interaction with ³⁵S labeled full-length MafA protein is shown in *lane 1*, and no binding could be observed with the GST alone (*lane 3*). 20% of the reticulocyte lysate loaded onto the GST-MafA(1–286) glutathione-Sepharose beads is shown in the *lane 2*. *E*, as a control of binding specificity, the GST-MafA(1–286) proteins were incubated with ³⁵S-labeled GFP protein translated *in vitro* (*lane 1*). No binding was observed. *Lane 2*, 20% of the reticulocyte lysate was loaded onto the GST-MafA(1–286) glutathione-Sepharose beads.

LacZ vector or a pcDNA3-LacZ was cotransfected for normalization of CAT assays by controlling the β-galactosidase activity. CAT assays were performed as described previously (30). Levels of CAT activity were quantified after exposure of the thin layer chromatograms to a PhosphorImager screen (Molecular Dynamics).

Electrophoretic Mobility Shift Assay—The DNA used as probes were G1–51, G1–51M10, and G1–51M3 and as a control the Mitf-binding site in the QNR-71 promoter. G1–51 (5'-CAA AAC CCC ATT ATT TAC AGA TGA GAA ATT TAT ATT GTC AGC GTA ATA TCT-3') is a wild type glucagon promoter element described previously (14) to bind Pax-6. G1–51M10 (5'-CAA AAC CCC ATT CCC GCC CCA GGA GAA ATT TAT ATT GTC AGC GTA ATA TCT-3') is mutated in the Pax-6-binding site (14). G1–51M3 (5'-CAA AAC CCC ATT ATT TAC AGA TGA GAA ATT TAT ATT GTC CTG GTA ATA TCT-3') is mutated in the presumptive Maf-binding site. Underlines represent mutations introduced in the oligonucleotides. QNR-71 oligonucleotide is 5'-GCT TTA ATT CCA TCA

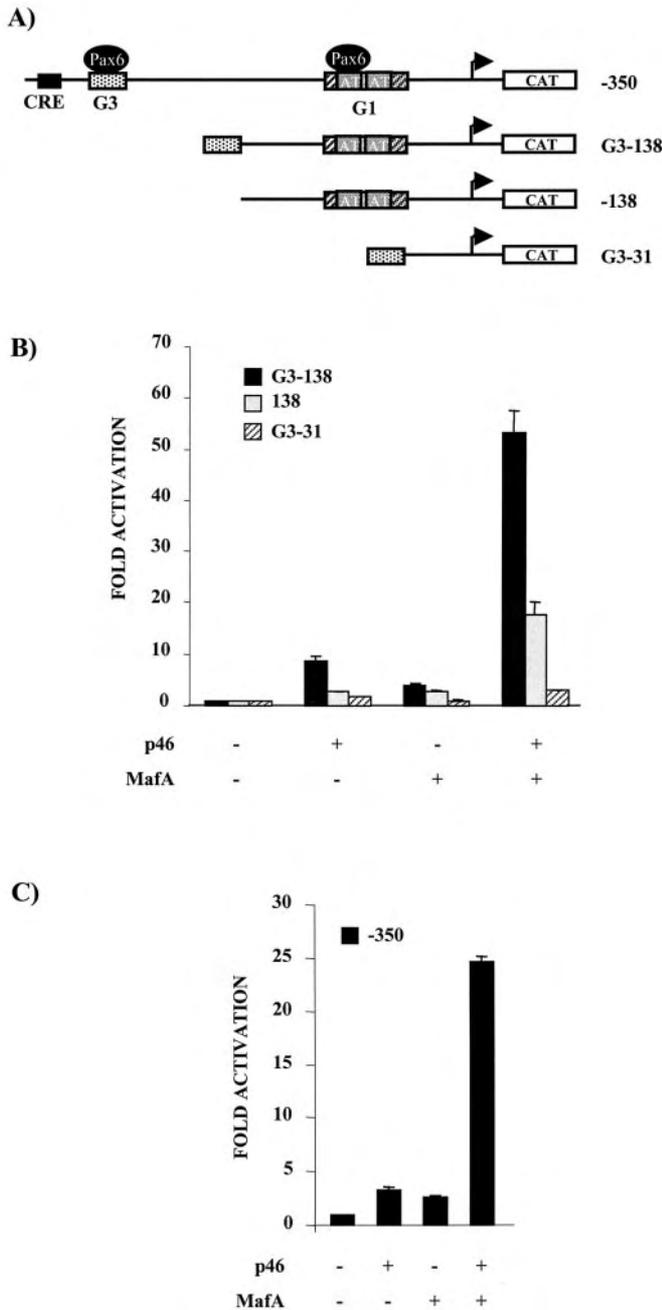


FIG. 2. MafA transactivates the glucagon promoter and acts in a synergistic way with Pax-6. *A*, schematic representation of the different glucagon promoter constructs used in this experiment. G1 and G3 are two promoter sequences with Pax-6-binding sites (14). The gray AT boxes in the G1 element refer to AT-rich sequences in the DNA. There is a cAMP-responsive element upstream from the G3 element. These four constructs are linked to the reporter CAT gene. *B*, transactivation assays. BHK21 cells were transiently transfected with 200 ng of each glucagon promoter, 200 ng of pSG5-p46, and/or 200 ng of pcDNA3-MafA. Amount of transfected DNA was kept constant by adding 200 ng of empty vectors when needed. The results shown were normalized to β -galactosidase activity derived from a cotransfected CMV-LacZ expression plasmid. A synergistic effect on the transactivation of the different promoter constructs was observed between Pax-6 and MafA when coexpressed, except for G3-31. *C*, transactivation assays. BHK21 cells were transiently transfected with 200 ng of the -350 glucagon promoter, 500 ng of pSG5-p46, and/or 20 ng of pcDNA3-MafA. Amount of transfected DNA was kept constant by adding 500 ng of empty vectors when needed. CAT activities were expressed relative to the value for the promoter constructs with the empty vector (set at a value of 1). Thin lines indicate standard deviations calculated from transfection performed in duplicate and normalized to β -galactosidase activity derived from a cotransfected LTR RSV-LacZ expression plasmid.

CAT GAT GAG TCC TG-3'. The DNA probes were double-strand oligonucleotides [γ - 32 P]ATP-labeled with the polynucleotide kinase T4. Gel retardation assays were performed as described previously (30) with 100 ng of bacterially expressed proteins.

GFP and DsRed Fusion Protein Constructs and Wide Field Optical Sectioning Fluorescence Microscopy—To visualize Pax-6 and MafA proteins, green fluorescent protein (GFP, CLONTECH) and *Discosoma striata* red protein (DsRed, CLONTECH) were used as fusion partners of p46 and MafA, respectively, and the following plasmids were constructed. An *NheI*-*Bgl*II EGFP fragment was ligated to the *Xba*I and *Bgl*II sites of pVNC3 (modified from pVM116, see Ref. 31) to produce pVNC3 EGFP C1. A *Bam*HI-*Apa*I MafA fragment was inserted into the *Bgl*II and *Apa*I sites of pVNC3 EGFP to make pVNC EGFP MafA. pVNC3 MiRed (32) was digested with *Xho*I and *Bsp*120I to excise the Mitf open reading frame and to replace it by a *Xho*I-*Not*I p46 fragment to generate pVNC3 Pax6Red. As controls, we used EGFPMyC and Pax6EGFP (32).

pVNC3 Pax6Red and pVNC EGFP MafA were cotransfected in BHK21 cells. To determine the localization of the chimerical proteins into the nuclei, cells were fixed for 20 min at room temperature in 3% paraformaldehyde in PHEM buffer (60 mM Pipes, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 1 mM magnesium acetate, pH 6.9). Cells were washed three times in PBS and permeabilized for 25 min in 0.1% Triton X-100 in PBS. Chromosomes were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (Sigma) for 5 min. After a rinse in PBS, coverslips were mounted in 50% PBS/glycerol containing anti-fading reagent 1.4 diazabicyclo-(2-2-2)-octane (Sigma) at 100 mg/ml.

Pictures of fixed cells were collected using a three-dimensional deconvolution imaging system, the detailed description and validation of which will be published elsewhere.² Briefly, it consisted of a Leica DM RXA microscope, equipped with a piezoelectric translator (PIFOC, PI, Germany) placed at the base of a 100 \times PlanApo N.A. 1.4 objective, and a 5-MHz Micromax 1300Y interline CCD camera (Roper Instruments, France). For the acquisition of Z-series, the camera was operated at full speed and controlled the piezo translator at the start of each CCD chip read out. Stacks containing fluorescence images were collected automatically at 0.2- μ m Z-intervals (Metamorph software, Universal Imaging). Wavelength selection was achieved by switching to the corresponding motorized selective Leica filter block before each stack acquisition. Tests using 50 nm tetraspec beads (Molecular Probes) showed that the system did not generate x-y pixel shifts and that Z-plane shifts between colors, due to chromatic aberrations, were reproducible and could be corrected. Exposure times were adjusted to provide ~3000 gray levels at sites of strong labeling. Automated batch deconvolution of each Z-series was computed using a measured point spread function and constrained iterative deconvolution with a custom made software package. The point spread function of the optical system was extracted from three-dimensional images of fluorescent beads of 0.1 μ m in diameter (Molecular Probes) collected at each wavelength.

The Z-series were pseudo-colored and overlaid, and maximal pixel intensity projections were calculated with the help of Metamorph software (Universal Imaging).

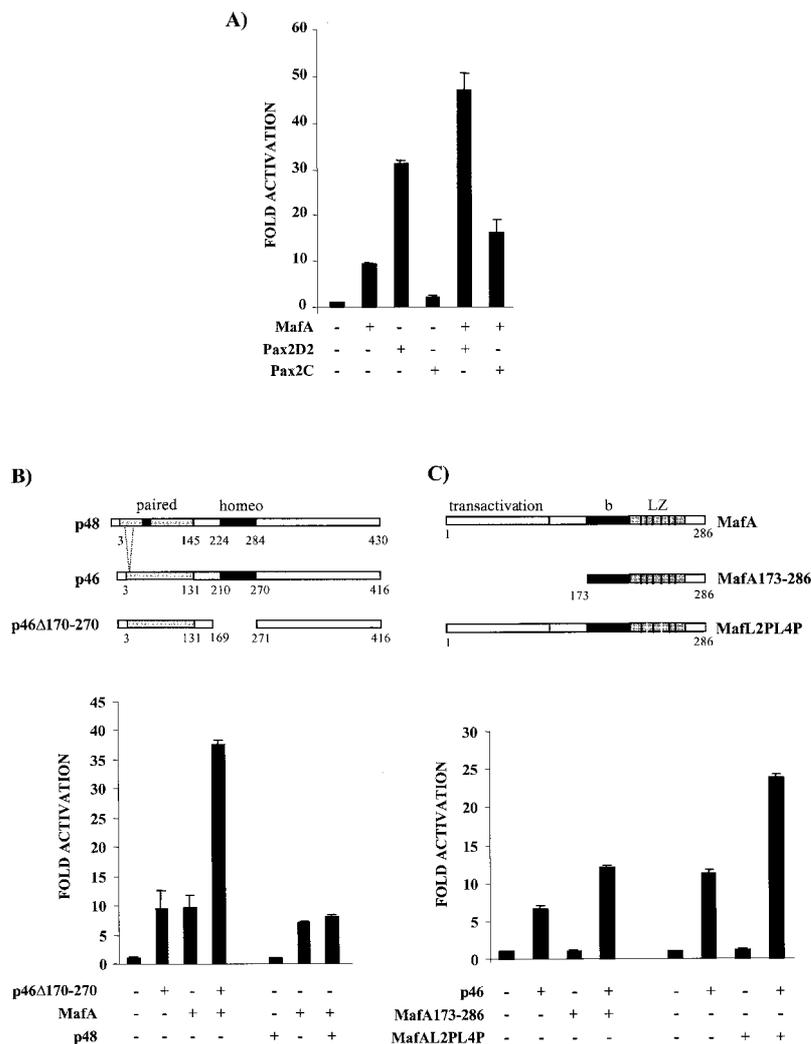
RT-PCR—Total RNA from pancreas from 8-day-old quail embryos were digested with RQI DNase. After phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation, 2 μ g of these RNA were annealed with 0.5 μ l of oligonucleotide dT (Perkin-Elmer) (50 μ M) for 10 min at 70 $^{\circ}$ C. The cDNA were obtained by adding 1 μ l of 0.1 M dithiothreitol, 2 μ l of 5 mM dNTP mix (Eurogentec), 200 units of Moloney murine leukemia virus-RT (Life Technologies, Inc.), and 4 μ l of 5 \times buffer in a final volume of 20 μ l. The mixture was incubated for 1 h at 42 $^{\circ}$ C. For the PCR, a 2- μ l aliquot was added to 1.6 μ l of 25 mM MgCl₂, 1 μ l of 5 mM dNTP mix (Eurogentec), 0.5 units of Goldstar Taq (Eurogentec), 2 μ l of 10 \times buffer, 1 μ l of 20 μ M oligonucleotide primers 5'-TTC CAC CCC TCT CAG CAC-3' and 5'-CTC CCG AAC CGA CAT ACT-3', in a final volume of 20 μ l. Amplifications were carried out in a PTC-200 (MJ Research) as follows: 96 $^{\circ}$ C for 2 min; 30 cycles at 94 $^{\circ}$ C for 45 s, 50 $^{\circ}$ C for 45 s, and 72 $^{\circ}$ C for 45 s; 72 $^{\circ}$ C for 10 min. Reaction products were cloned into PCR2.1 (TA cloning Kit, Invitrogen). Individual clones were isolated and sequenced.

Similar experiments were performed using α TC cells RNA and oligonucleotide primers Maf5'1, Maf5'2, and Maf3'2 as described (20).

Immunocytochemistry— α TC cells cultured on 16-mm microscope coverslips were fixed for 1 h with 2% paraformaldehyde in PBS and then treated with anti-v-Maf serum (a gift of Dr. M. Castellazzi). Anti-c-Maf

² J. B. Sibarita *et al.*, submitted for publication.

FIG. 3. Synergistic effect on the glucagon promoter transactivation by different Pax and MafA constructs. **A,** Pax-2 and MafA did not act synergistically on the glucagon promoter. Two Pax-2 isoforms with distinct transactivation efficiency were used. **B,** Pax-6 homeodomain is dispensable, but a functional paired domain is required. A schematic representation of the Pax-6 constructs used is shown above the histogram. p46 and p48 Pax-6 isoforms contain two DNA-binding domains, the paired box and the homeobox. p48 contains an addition of 14 amino acids in the paired domain. Numbers refer to the amino acids. Pax-6 Δ 170–270 is devoid of the homeodomain but still contains the paired domain. Pax-6 Δ 170–270 transactivated the G3–138 glucagon promoter as efficiently as the wild type construct and acted synergistically with MafA (compare with Fig. 1B), suggesting that the homeodomain is not required both for the glucagon promoter transactivation and for the synergy with MafA. The p48 isoform did not transactivate the glucagon promoter and did not modulate the MafA transactivation. **C,** MafA was still able to act synergistically with Pax-6 as a monomer without DNA binding activity (MafAL2PL4P) or with DNA binding activity but without transactivation domain (MafA(173–286)). A schematic representation of the constructs used is shown above the histogram. **B,** basic domain; **LZ,** leucine zipper. Both MafAL2PL4P and MafA(173–286), without effect alone, increased the p46 activity.



reactive proteins were detected with CY3-labeled goat anti-rabbit immunoglobulins secondary reagent (Jackson ImmunoResearch).

RESULTS

Pax-6 Interaction with MafA—To test the hypothesis that Pax-6 physically interacts with MafA, we prepared glutathione-Sepharose beads coupled with a GST-paired fusion protein containing the paired domain from the p46 (GST-Prd46(3–131)) and GST-Hom (224–284), containing the p46 homeodomain, and the GST-p46(1–416), containing the full-length Pax-6 product. We also used GST fusion proteins containing either the N-terminal (residues 1–151) or the C-terminal domains (residues 151–286) of MafA or the full-length protein. Glutathione-Sepharose beads coupled to GST served as a negative control. *In vitro* radiolabeled MafA/L-Maf or Pax-6 proteins were loaded onto these beads and washed, and bound proteins were eluted by boiling and analyzed in SDS-PAGE. The percentage of bound radioactivity was calculated using PhosphorImager. A similar amount of radiolabeled MafA was recovered from GST-Prd46 (0.4%) and from GST-Hom (0.2%). In contrast, a much higher amount of radiolabeled MafA protein (8.6%) was recovered from the GST-p46, suggesting that the transactivation domain of Pax-6 is involved in the protein-protein interaction (Fig. 1A).

As shown in Fig. 1B, both the N terminus of MafA (amino acids 1–151, 1%, lane 2) and the C-terminal (amino acids 151–286, 0.8%, lane 3) domains were independently able to bind the radiolabeled p46. However, it is important to note that a greater amount of GST-N-terminal protein has been used in the experi-

ment (Fig. 1C, compare lanes 1 with 2 and 3) suggesting in fact a lower efficiency of this part of the MafA protein in the interaction with the p46. The full size Maf bound with a greater efficiency (19%) than the two separated parts of the protein. The GST alone did not interact with the radiolabeled MafA (Fig. 1B, lane 1). As a positive control, we incubated the full size GST-MafA(1–286) with the radiolabeled MafA (Fig. 1D). The amount of recovered protein (10%, lane 1) was similar to the amount p46 recovery (Fig. 1B, lane 4), suggesting a strong interaction between the two proteins. As a negative control, we incubated the full size GST-MafA(1–286) with the nonrelevant radiolabeled GFP protein. No interaction could be observed between these two proteins (Fig. 1E). As for Engrailed (33) or Mitf (32), two p46-interacting proteins, the paired-less p30 proteins did not significantly bind to either part of MafA (Fig. 1B).

Effects of Pax-6/Maf Coexpression on Their Transcriptional Activities—Nrl, a large Maf family member, acts synergistically with the paired-like homeodomain transcription factor Crx to activate the rhodopsin gene (34, 35). A potential Maf-binding site (TCAGCG) is present close to the Pax-6-binding site in the G1 element of the glucagon promoter. Therefore, we tested if the observed Pax-6/Maf interaction was able to regulate expression of Pax-6-dependent glucagon promoter. BHK21 cell lysates were collected 2 days after transfection, and the levels of CAT and β -galactosidase activities present in the lysates were determined. Cotransfection of the G1 containing –138 glucagon promoter with the vector expressing the MafA/L-Maf protein resulted in an increase of CAT activity relative

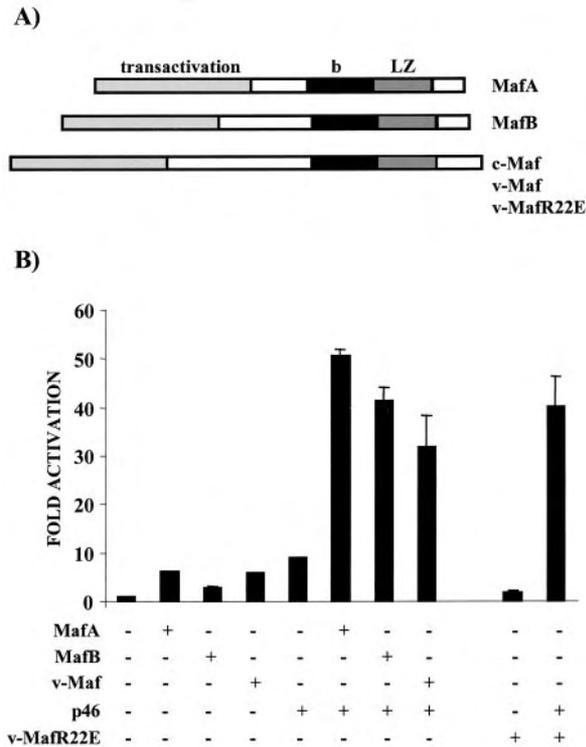


FIG. 4. Synergistic effect on the glucagon promoter transactivation by Pax-6 and large Maf proteins. A, schematic representation of the different Maf proteins used in this study. V-Maf differs from c-Maf by a point mutation in the DNA-binding domain. V-MafR22E contains a point mutation in the basic DNA-binding domain. B, when coexpressed, Pax-6 and the different Maf family members transactivated the G3-138 glucagon promoter in a synergistic manner. The R22E mutation in v-Maf, which abolishes the binding to the DNA and suppresses the transactivation properties of v-Maf, still acted synergistically with Pax-6. The Maf proteins used in this experiment have been cloned into a derivative of the pEF-Bos vector. C, Pax-6 did not increase the MafA transactivation in the absence of Pax-6-binding sites. We used a thymidine kinase (*TK*) promoter linked to a four times multimerized *QR1-A* box, which is a MafA-binding element. In contrast to MafA, Pax-6 did not transactivate this construct and did not enhance the transactivation level of MafA. Experiments were performed as in Fig. 2 except that 500 ng of pSG5-p46 and pcDNA3-MafA were used.

to that of the control vector (Fig. 2). Similar increase of CAT activity was observed with the -138 glucagon promoter in response to Pax-6 protein expression. Cotransfection of the -138 glucagon promoter with the vectors expressing MafA and Pax-6 proteins resulted in a 5-fold increase of CAT activity relative to the level of expression obtained with each transcrip-

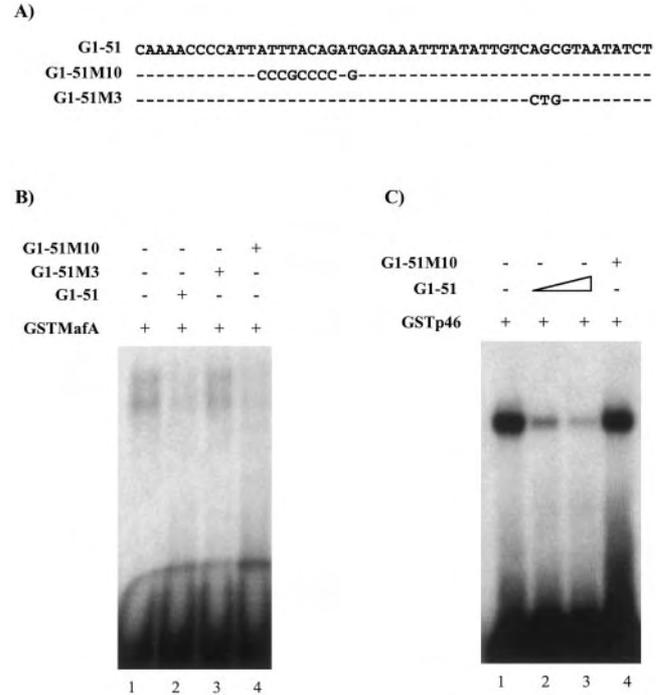


FIG. 5. MafA and Pax-6 binding to the G1 element in gel shift assays. A, nucleotide sequence of the G1-51 (glucagon-derived Pax-6-binding site) probe and its mutated versions. G1-51M10 is mutated in the Pax-6-binding site, and G1-51M3 is mutated in the Maf-binding site. B, electrophoretic mobility shift assay using a G1-51 radioactive probe and GST-MafA(1-286). Lane 1, GST-MafA formed a DNA-protein complex with the probe. Lane 2, formation of this complex was inhibited by the addition of an excess of cold G1-51 (100 \times) but not when the G1-51M3 was used instead (lane 3). The M10 mutant was as efficient as the wild type G1-51 in the binding competition (lane 4). C, electrophoretic mobility shift assay using a G1-51-radioactive probe and GST-p46(1-416). Lane 1, GST-p46 formed a DNA-protein complex with the probe. Lanes 2 and 3, formation of this complex was inhibited by the addition of an excess (500 and 1000 \times) of cold G1-51 in increasing amounts but not when the cold G1-51M10 (500 \times) was used instead (lane 4).

tion factor alone. The synergistic activation obtained was specific of this promoter because no synergistic effect was observed on the CMV- or RSVLTR-lacZ cotransfected in the experiment. The G3-138, containing an additional Pax-6-binding site (14), also exhibited this synergistic response, except that the CAT activity was increased (Fig. 2B) and the promoter -350 behaved similarly (Fig. 2C). In contrast, the G3 element linked to the -31 sequence, showed a marginal activation by both Pax-6 and MafA/L-Maf, suggesting that the G1 element is indeed essential in the Maf response of the glucagon promoter and synergy with Pax-6.

Another Pax family member (Pax-2) has been described to activate the glucagon promoter through the G1 element (36). We tested the effect of the simultaneous expression of Pax-2 and MafA on the G3-138 glucagon promoter. The D2 form of Pax-2 (a splicing variant in the transactivation domain) was a better transactivator than Pax-6, whereas the C form (36) exhibited only a marginal effect on glucagon expression (Fig. 3A). On these two Pax-2 isoforms, MafA/L-Maf had a rather additional than synergistic effect (Fig. 3A). In contrast to Pax-6, Pax-2 contains only a partial homeodomain (37). Therefore, we asked whether the homeodomain of Pax-6 was required for the synergistic transactivation of the glucagon promoter observed with MafA. We used a Pax-6 mutant, which is devoid of homeodomain, (Pax-6 Δ 170-270, see Ref. 2). This Pax-6 mutant transactivated the G3-138 glucagon promoter to an extent similar to that of the wild type, suggesting that the

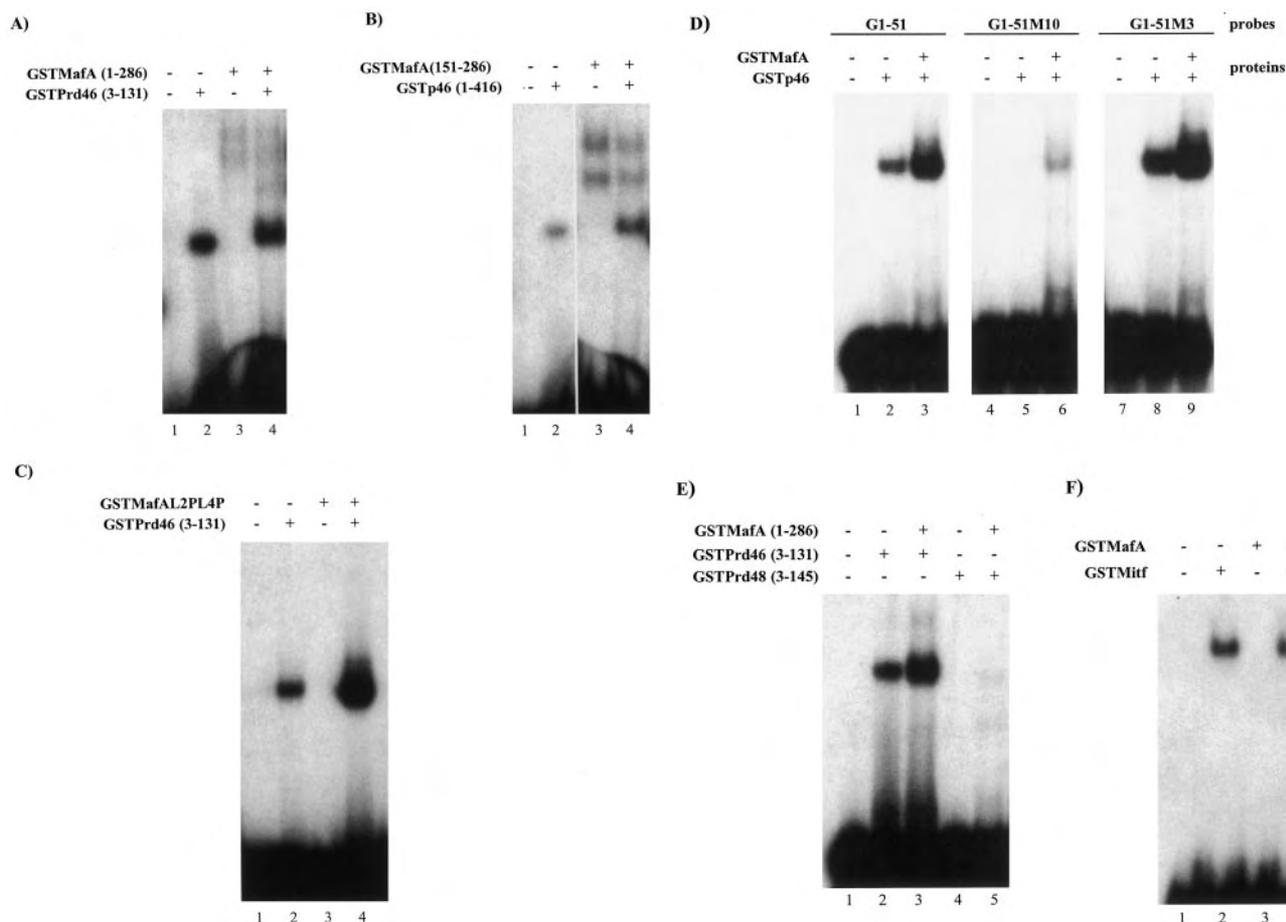


FIG. 6. MafA and MafA mutants increase the binding of paired p46 (as well as full-length p46) on the G1-51 probe. *A*, electrophoretic mobility shift assay using a G1-51 radioactive probe, GST-Prd46(3-131), and GST-MafA(1-286). *Lane 1*, GST alone; *lane 2*, GST-Prd46 formed a DNA-protein complex with the probe. *Lane 3*, GST-MafA formed a DNA-protein complex migrating slowly. *Lane 4*, in the presence of both GST-MafA(1-286) and GST-Prd46(3-131), formation of the paired-DNA complex amount was increased, whereas the MafA DNA-complex was unaffected. Empty GST was used when required to keep the protein amount constant. *B*, electrophoretic mobility shift assay using a G1-51-radioactive probe, GST-p46(1-416), and GST-MafA(151-286). *Lane 1*, GST alone; *lane 2*, GST-p46 formed a DNA-protein complex with the probe. *Lane 3*, GST-MafA(151-286) formed a distinct DNA-protein complex migrating slowly. *Lane 4*, in the presence of both GST-MafA(151-286) and GST-p46(1-416) formation of the p46-DNA complex amount was increased, whereas the MafA DNA-complex was mostly unaffected. Empty GST was used when required to keep the protein amount constant. *C*, electrophoretic mobility shift assay using a G1-51 radioactive probe, GST-Prd46(3-131) and GST-MafAL2PL4P. *Lane 1*, GST alone; *lane 2*, GST-Prd46. *Lane 3*, GST-MafAL2PL4P mutant did not form a DNA-protein complex. *Lane 4*, in the presence of both GST-MafAL2PL4P and GST-Prd46(3-131), formation of the paired-DNA complex was increased (compare with *lane 2*). Empty GST was used when required to keep the protein amount constant. *D*, electrophoretic mobility shift assay using a radioactive probe as indicated on the top panel, and both full-length GST-p46(1-416) and GST-MafA(1-286). *Lanes 1, 4, and 7*, GST alone; GST-p46 formed a DNA-protein complex with the G1-51 probe (*lane 3*), no complex with the mutated G1-51M10 (*lane 5*) but efficiently recognized the MafA mutated probe G1-51M3 (*lane 8*). GST-MafA(1-286) increased formation of the p46-DNA complex on G1-51 (*lane 3*), induced a faint p46-DNA complex on G1-51M10 (*lane 6*), and increased formation of the p46-DNA complex on G1-51M3 (*lane 9*). Empty GST was used when required to keep the protein amount constant. *E*, electrophoretic mobility shift assay using a G1-51-radioactive probe, GST-Prd46(3-131), GST-MafA(1-286), and GST-Prd48(3-145). *Lane 1*, GST alone; *lane 2*, GST-Prd46(3-131). *Lane 3*, in the presence of both GST-MafA(1-286) and GST-Prd46(3-131), formation of the paired-DNA complex was increased. *Lane 4*, GST-Prd48(3-145) was unable to form a DNA-protein complex. *Lane 5*, in the presence of GST-MafA(1-286), GST-Prd48(3-145) formed a very faint complex. Empty GST was used when required to keep the protein amount constant. *F*, electrophoretic mobility shift assay using a QNR-71 radioactive probe, GST-Mitf(193-413), and GST-MafA(1-286). *Lane 1*, GST alone; *lane 2*, GST-Mitf(193-413). *Lane 3*, GST-MafA(1-286) was unable to form a DNA-protein complex. *Lane 4*, in the presence of both GST-Mitf(193-413) and GST-MafA(1-286), formation of the Mitf-DNA complex was not modified by addition of GST-MafA(1-286).

homeodomain is dispensable for G3-138 glucagon promoter activation (Fig. 3B). Cotransfection of the MafA/L-Maf revealed that the Pax-6 Δ 170-270 mutant increased glucagon promoter transactivation with MafA. We next asked whether a functional paired domain was required. For that purpose, we used the p48 isoform of Pax-6, which recognizes a distinct DNA-binding sequence due to the insertion of 14 amino acid residues in the paired domain (38). p48 is unable to transactivate the glucagon promoter (Fig. 3B). Coexpression of p48 and MafA proteins did not modify the level of CAT activity when compared with MafA alone (Fig. 3B), indicating that the binding of Pax-6 to DNA through the paired domain is required in order to increase the MafA/L-Maf effect on this promoter.

These results prompted us to study the effect of MafA/L-Maf

truncated proteins devoid of transactivation domain in the cooperative transcriptional activation with Pax-6. Fig. 3C shows that this mutant MafA(173-286) was no longer able to activate the glucagon promoter but still increased the effect of Pax-6 on the G3-138 promoter, suggesting that binding of MafA to the DNA was sufficient to increase the Pax-6 transactivation properties. However, the use of additional mutants indicated that MafA/L-Maf was also able to increase the Pax-6 activity without binding to DNA. Indeed, mutant MafAL2PL4P was unable to activate the glucagon gene promoter (Fig. 3C) but still increased the Pax-6 effect on this promoter (Fig. 3C). MafAL2PL4P was unable to form a coiled-coil structure because 2nd and 4th leucine residues were replaced by proline residues in the leucine zipper (20).

We next tested the effect of other Maf family members (Fig. 4A) on Pax-6 activity. Fig. 4B indicates that v-Maf and MafB were indistinguishable from MafA/L-Maf with respect to their effect on glucagon activation and synergy with Pax-6. In addition, a v-Maf mutant in the basic domain (R22E), which is unable to bind DNA (39) and to activate the glucagon promoter, (Fig. 4B), still increased the Pax-6 effect on the G3–138 (Fig. 4B).

Therefore, we conclude that MafA/L-Maf is able to increase the Pax-6 activity in two distinct ways: first in a DNA-binding dependent way (the transactivation domain is dispensable) and second in a DNA-binding independent way. In contrast, Pax-6 must bind to the DNA in order to allow synergistic interaction with Maf. Additional evidence was provided by the use of a thymidine kinase promoter linked with four repeats of a Maf-binding element from the *QR1* promoter (20). Fig. 4C shows that coexpression of p46 and MafA/L-Maf did not modify the level of *QR1*-Abox(x4)-TK promoter expression when compared with MafA/L-Maf expressed alone. Pax-6 alone was unable to activate expression of this promoter (Fig. 4C).

MafA Increases the DNA Binding Activity of Pax-6 in Vitro—Many eukaryotic bZip proteins are able to bend the DNA, and the resulting DNA curvature may facilitate protein-protein or protein-DNA contacts that are essential in transcriptional regulation (40). Because of Maf and Pax-6 interactions, we tested whether Maf was able to modulate the DNA binding activity of Pax-6. We used glucagon promoter-derived probes to study the binding of GST-Prd46, GST-p46, and GST-MafA, as well as their reciprocal effect on DNA binding. MafA was indeed able to bind the G3–138 DNA sequence, confirming that MafA binds to the glucagon promoter (data not shown).

To demonstrate that the TCAGCG sequence found in the G1 element was the binding site for MafA/L-Maf, we used an oligonucleotide encompassing the G1 nucleotide sequence (Fig. 5A) from –100 to –50 (G1–51) as probe. We also prepared two mutated versions of this oligonucleotide as a probe, one in the Pax-6-binding site (mutated nucleotides from –87 to –78, G1–51M10) and one in the expected MafA-binding site (mutated nucleotides from –60 to –58, G1–51M3). GST-MafA alone was able to bind to G1–51 (Fig. 5B, lane 1), and the resulting complex was competed for by an excess (100×) of unlabeled G1–51 oligonucleotides (Fig. 5B, lane 2) or G1–51M10 (Fig. 5B, lane 4) but not by a similar excess of the G1–51M3 containing the mutation in the expected MafA/L-Maf-binding site (Fig. 5B, lane 3). Gel shift experiments performed with a GST fusion protein containing the p46 showed a specific binding (Fig. 5C, lane 1) competed for by unlabeled G1–51 oligonucleotide (Fig. 5C, lanes 2 and 3) but not by the G1–51M10 oligonucleotide containing the mutated paired binding site (Fig. 5C, lane 4). We conclude that the TCAGCG is a functional binding site for the MafA protein. Moreover, coinubation of GST-MafA and GST-Prd46 showed an increase in the binding of GST-Prd46(3–131) to the DNA probe (Fig. 6A, compare lanes 2 and 4).

Since a synergistic transactivation was observed between the p46 Pax-6 and mutants of MafA/L-Maf (mutants in the LZ or in the basic domain that are unable to bind DNA as well as a mutant devoid of transactivation domain but able to bind DNA), we studied whether the GST-Prd46 or GST-p46 binding to G1–51 was increased by GST-MafAL2PL4P as well as by the GST-MafA(151–286). Fig. 6 shows that both GST-MafA mutant proteins increased the Pax-6 binding to the DNA (Fig. 6, B and C) in a very similar way to that of the wild type MafA protein (Fig. 6A). We also investigated whether MafA was able to modulate the binding of p46 to the G1–51M10 oligonucleotide. When this DNA was used as probe, no binding of the p46 was found (Fig. 6D, lane 5), as expected since this oligonucleotide was not able to compete for the binding to the wild type G1–51

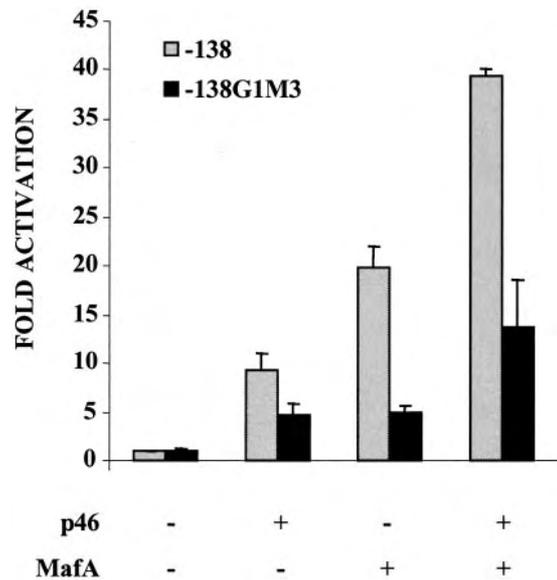


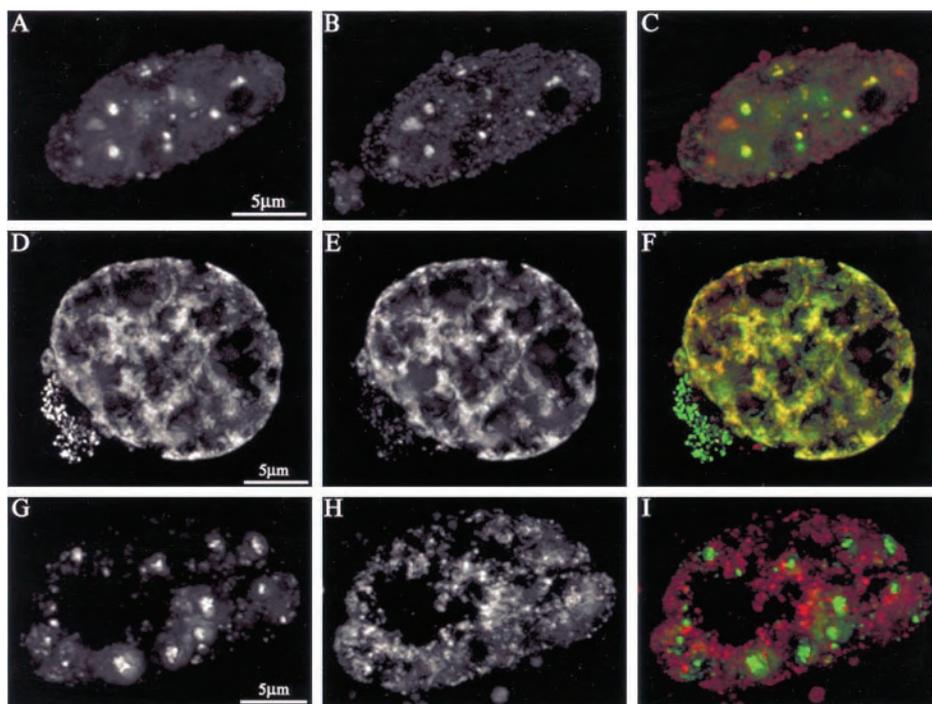
FIG. 7. MafA is no longer able to transactivate the –138G1M3 glucagon promoter. BHK21 cells were transiently transfected with 200 ng of the glucagon promoters, 200 ng of pSG5-p46, and/or 200 ng of pcDNA3-MafA. Amount of transfected DNA was kept constant by adding 200 ng of empty vectors when needed. CAT activities were expressed relative to the value for the promoter constructs with the empty vector (set at a value of 1). Thin lines indicate S.D. calculated from transfection performed in duplicate and normalized to β -galactosidase activity derived from a cotransfected LTR RSV-LacZ expression plasmid.

(Fig. 5C). In contrast, in the presence of GST-MafA protein, p46 was able to bind to the mutated DNA, albeit less efficiently than the wild type sequence (Fig. 6D, lane 6, compare with lane 3). Further confirmation that Maf binding to DNA was not required to increase the efficiency of Pax-6 DNA binding, we observed an increase in p46 binding in the presence of MafA protein on the G1–51M3 oligonucleotide (Fig. 6D, compare lanes 8 and 9).

Since the Pax-6 p48 protein was unable to activate the glucagon promoter and to increase MafA transactivation properties on this promoter (Fig. 3B), we asked whether the paired domain of p48 was able to recognize the G1–51 element and whether GST-MafA protein was able to modulate p48 DNA binding. Fig. 6E shows that, in contrast to GST-Prd46, GST-Prd48 was unable to bind to G1–51 probe without GST-MafA. However, a very faint binding was induced in the presence of GST-MafA (Fig. 6E, compare lanes 4 and 5). To demonstrate further that GST-MafA proteins specifically increased Pax-6 binding to the DNA, we performed a gel shift experiment using a GST-Mitf(193–413) fusion protein and the QNR-71 oligonucleotide probe, with and without GST-MafA. As shown in Fig. 6F, the Mitf-DNA complex was not modified in the presence of MafA.

To investigate the functional role of the MafA-binding site in the glucagon promoter, we performed transfection experiments in BHK21 cells using the –138 glucagon promoter or the promoter bearing the MafA mutations inserted in the G1–51 oligonucleotide (–138M3). Fig. 7 shows the –138M3 glucagon promoter was still activated by Pax-6. In contrast, this mutant promoter exhibited only a marginal activity in response to MafA when compared with the wild type –138 promoter. Therefore, we conclude that the TCAGCG site that we identified in the G1 element constitutes a functional binding site for Maf proteins and that no additional Maf-binding site exists in the –138 glucagon promoter. In contrast to the wild type promoter, concomitant expression of MafA and Pax-6 resulted in a limited effect on the –138M3 promoter, but transactivation was still greater than that obtained with Pax-6 alone, further

FIG. 8. Expression of Pax-6-DsRed and MafA-EGFP fusion proteins in BHK21 cells shows colocalization in nuclei. Pax-6-DsRed and MafA-EGFP fusion proteins were transfected into BHK21 cells, and the subcellular localization of the fusion proteins was determined by three-dimensional fluorescence microscopy of fixed cells. *A*, Maf-EGFP expression in cell nuclei. *B*, Pax-6-DsRed expression in cell nuclei. *C*, overlay of these two expression patterns (*A* and *B*) showing colocalization of Pax-6. DsRed and Maf-EGFP fusion proteins in the cell nuclei (see yellow spots). *D*, Pax-6-EGFP expression in cell nuclei. *E*, Pax-6-DsRed expression in cell nuclei. *F*, overlay of these two expression patterns (*D* and *E*) showing colocalization of Pax-6-DsRed and EGFP fusion proteins in the COS cell nuclei. As negative control, we determined the subcellular localization of v-Myc and Mitf in retinal pigmented epithelial cells. *G*, EGFP-myc expression in cell nuclei. *H*, Mitf-DsRed expression in cell nuclei. *I*, overlay of these two expression patterns (*G* and *H*) showing no colocalization of EGFP-myc and Mitf-DsRed fusion proteins in the cell nuclei (compare with *C*).



indicating that Maf could increase Pax-6 transactivation without binding to the DNA.

Pax-6 and MafA Colocalize in the Nucleus—To demonstrate that Pax-6 and Maf are able to interact *in vivo*, we cotransfected vectors expressing the p46, tagged with the DsRed protein, and the MafA/L-Maf, tagged with the green fluorescent protein (EGFP). Expression of these vectors into BHK21 cells allowed detection of both proteins in cell nuclei (Fig. 8, *A* and *B*). Fig. 8*C* shows the overlap of the two fluorescent proteins by maximal pixel intensity projections of a representative nucleus. If part of the proteins were localized in distinct areas of the nucleus, a significant amount of the yellow labeling could be observed, suggesting that p46 and MafA proteins colocalize in common areas of the nucleus *in vivo*. As shown in Fig. 8*F*, the chromophore did not influence by itself the protein localization, since Pax-6 tagged either with EGFP (Fig. 8*D*) or with DsRed (Fig. 8*E*) shows a perfect overlapping (Fig. 8*F*) in COS cells transfected with the two expression vectors. To demonstrate that such a colocalization is not an artifact due to a random effect, we performed a similar cotransfection experiment with a v-Myc protein (which has been shown to not interact with Mitf *in vitro*, see Ref. 41) tagged with EGFP and Mitf tagged with DsRed. In contrast to Pax-6 and MafA, the overlap of the two fluorescent proteins revealed, as described previously (32), that Mitf and v-Myc do not substantially colocalize (Fig. 8*I*).

c-Maf and MafA Are Expressed in the Pancreas—To identify the *maf* genes expressed in the pancreas, we first performed RT-PCR amplifications using MafA-specific oligonucleotide primers located upstream from the basic domain and at the end of the zipper domain, respectively. As shown in Fig. 9*A*, a 396-bp fragment was amplified from the Quail E8 pancreas RNA previously reverse-transcribed using a dT-priming oligonucleotide. The sequence obtained from this Quail cDNA was indeed identical to that of MafA sequence (20). To demonstrate further that Maf products are present in Pax-6-positive endocrine pancreas cells, we performed a similar experiment using RNA extracted from mouse glucagon producing α -endocrine cell line (α TC, see Ref. 42). We performed PCR using Maf-degenerated oligonucleotides, and we identified the c-Maf corresponding fragment after sequencing. This result is in good

agreement with the report of Sakai *et al.* (43) showing that *c-maf* is activated by Pax-6. To demonstrate further the presence of c-Maf proteins into the nucleus of the α TC cells, we performed an immunodetection experiment using a rabbit anti-v-Maf serum. Fig. 9*B* shows an example of immunostained α TC nuclei. Since α TC cells expressed c-Maf, we performed transfection experiments in α TC cells using the -138 glucagon promoter or the promoter bearing the MafA mutations inserted in the G1–51 oligonucleotide (-138 G1M3). Fig. 9*C* shows that the mutant promoter exhibits a reduced CAT activity when compared with the wild type -138 promoter. Therefore, we conclude that endogenous c-Maf is important for glucagon promoter expression in the α TC cells.

DISCUSSION

This study presents evidence that Pax-6 interacts with Maf transcription factors and that this interaction supports synergistic transactivation on the glucagon promoter. It has been shown that Pax-6 and Maf family members are involved in cellular proliferation and differentiation. These factors are expressed in overlapping regions in the eye or in the central nervous system. For example, MafB has been shown to establish specific rhombomeres in the developing hindbrain and to be responsible for the Kreisler mutation in mouse (44). MafA/L-Maf, Nrl, and Pax-6 are expressed in the neuroretina (20); c-Maf, MafB, Nrl, MafA/L-Maf, and Pax-6 are coexpressed in the lens (17–19, 45, 46). Both Pax-6-binding sites and Maf response elements were identified in transcriptional regulatory regions of crystalline genes (7, 18), as well as in the *c-maf* promoter (43). All these promoters responded to Pax-6 expression. We therefore examined whether Maf proteins and Pax-6 were able to interact, and we investigated their effects on promoters responsive to these factors. We show here that Pax-6 and Maf proteins interact in pull-down experiments *in vitro*. Pax-6 activates the glucagon promoter through binding sites located in the G3 and G1 enhancer elements (14), and we demonstrate here that Maf proteins are also effective in activating the glucagon promoter. A Maf-binding site is located in the G1 element, close to the Pax-6-binding site. Mutation of the TCAGCG sequence suppresses both Maf DNA-binding and Maf

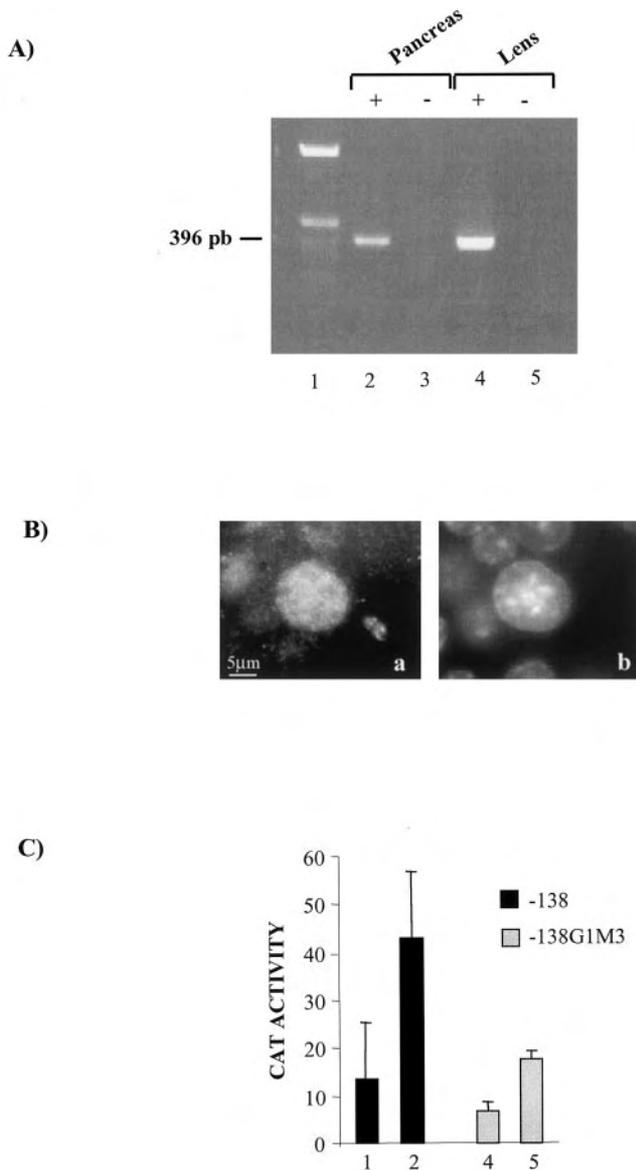


FIG. 9. Detection of MafA/L-Maf in pancreas and α TC cells. *A*, total RNA from pancreas (lanes 2 and 3) or lens (lanes 4 and 5) from 8-day-old quail embryos were annealed to oligonucleotide dT, and the cDNA were obtained by adding Moloney murine leukemia virus-RT (lanes 2 and 4). The DNA was incubated with Goldstar *Taq* polymerase and oligonucleotide primers. Amplifications were carried out for 30 cycles. Reaction products were cloned into PCR2.1 and sequenced. Lanes 3 and 5, the reverse transcriptase was omitted. *B*, panel *a*, c-Maf immunodetection in an α TC nucleus with a rabbit anti v-Maf serum; panel *b*, 4,6-diamidino-2-phenylindole staining of the nucleus shown in *a*. *C*, α TC cells were transiently transfected with 500 ng (lanes 1 and 4) or 1 μ g (lanes 2 and 5) of the -138 wild type (lanes 1 and 2) or -138G1M3 (lanes 4 and 5) glucagon promoters. Amount of transfected DNA was kept constant by adding empty vectors when needed. These results, showing a reduction of the glucagon promoter expression when the Maf-binding site is mutated, are obtained from two transfected wells and were normalized to β -galactosidase activity derived from a cotransfected CMV-LacZ expression plasmid.

dependent transactivation of the promoter, indicating that the glucagon promoter is a target for Maf transcription factors. Furthermore, we find that both MafA/L-Maf (in quail) and c-Maf (in mouse) are expressed in the pancreas.

Coexpression of Pax-6 and Maf transcription factors resulted in a synergistic activation of the glucagon promoter. This effect was observed not only with all Maf proteins tested (c-Maf, MafB, MafA, and v-Maf) but also with Maf mutants. We tested two Maf mutants, unable to bind DNA and to transactivate the

glucagon promoter (a point mutation in the basic domain of v-Maf and a proline mutant in the leucine zipper of MafA), and both of them increased Pax-6-dependent transactivation of the promoter. Likewise, a truncated MafA mutant, lacking the activation domain and unable to activate the glucagon promoter expression, was still able to increase Pax-6 activity. A common effect of these proteins was to increase the DNA-binding efficiency of Pax-6 on its target DNA, as shown by gel shift experiments on the G1 element probe (G1-51). Interestingly the Pax-6 p48 isoform that contains an alternative exon in the paired domain and recognizes a DNA sequence different from the binding site of p46 (38, 47) did not activate the glucagon promoter. Paired p48 did not bind significantly to the G1 element, even in the presence of MafA proteins. Therefore, there is a positive correlation between the synergistic transactivation and the enhanced binding of Pax-6 to the DNA.

What could be the mechanism leading to the synergistic activation of the glucagon promoter by Pax-6 and Maf transcription factors? Interactions among transcription factors that bind to separate promoter elements may depend on distortion of DNA structure. Fos and Jun, two AP-1 family members related to Maf, have been shown to induce DNA bending, and both the bZip domains and regions overlapping their transcription activation domain induce DNA bending (48). Therefore, it is possible that the common effect of Maf and Maf mutants includes an effect on DNA bending resulting in a more efficient Pax-6 binding and transactivation. Since Maf family members and Pax-6 are coexpressed in the lens and are both important for lens development and crystalline genes expression, we tested the effect of Pax-6 and MafA coexpression on the α A-Crystalline promoter (49). Contrasting with the transactivation synergy observed on the glucagon promoter, no such effect was observed on α A-Crystalline promoter (data not shown), although MafA efficiently activated this promoter. Moreover, gel shift experiments using an α A-Crystalline promoter oligonucleotide containing both Pax-6- and Maf-binding sites showed no increase of Pax-6 binding in the presence of MafA protein, further suggesting that this increased Pax-6 binding was a key event in the synergistic promoter activation. This increase in the DNA binding of Pax-6 in the presence of Maf proteins may depend on the nature of the Pax-6-binding site, since the affinity of Pax-6 differs from one site to another (50). Close examination of the glucagon promoter G1 element indicated that this sequence is A/T-rich, suggesting that a natural bending may occur (51) that could be increased by Maf proteins. Conversely, this natural bending may also be important for the activity of the Maf proteins, since DNA targets for bZip proteins are distinguished by an intrinsic bend (52). Therefore a functional synergy between Maf family members and Pax-6 may occur depending on the promoter context.

To date several classes of transcription factors are known to interact with Maf family proteins but, except for the related Fos and Jun AP-1 family members (16), most of these interactions act in an inhibitory way. This is the case for USF2, a member of the basic helix-loop-helix zipper transcription factor family, that has been shown to interact with c-Maf and to inhibit its DNA binding activity (53). c-Maf has been also shown to form a transcriptionally inert complex with c-Myb in myeloid lineage cells (27). Similarly, MafB has been reported to block the transcriptional activity of c-Ets-1 through direct interaction and subsequently to repress erythroid differentiation (28). However, it has been reported that NRL and a paired type homeodomain transcription factor (CRX) synergistically regulate the photoreceptor cell-specific expression of the rhodopsin gene (34, 35, 54). Direct physical interaction of Nrl and Crx has been demonstrated (55). This positive effect on Maf activity is not a general property of home-

odomain-containing transcription factors, since Hoxd12 and Mxox can form complexes with the bZip domain of Maf proteins, resulting in a loss of Maf DNA binding activities (29). This latter result may be of interest for glucagon promoter expression, since several homeodomain-containing proteins are expressed in α -endocrine pancreas cells. For example, Pbx-Prep1 exhibits a repressive activity on Pax-6 transactivation (56), but Cdx-2/3, in contrast, acts synergistically with Pax-6 (14, 15). Therefore, the balance between positive and negative Maf/homeodomain-containing transcription factor interactions may dictate the final Pax-6/Maf synergy status *in vivo*. The glucagon promoter is also under the control of another paired transcription factor, Pax-2, which in contrast to Pax-6 does not act synergistically with Maf on the glucagon promoter expression. Thus, these different classes of transcription factors may form a regulatory network through protein-protein and protein-DNA interactions in the endocrine pancreas, allowing the fine tuning of the regulation of glucagon gene expression.

Acknowledgments—We thank Georges Calothy for critical reading of the manuscript; Beate Ritz-Laser for the gift of glucagon promoter constructs; Ales Cvekl for α A-crystalline promoter; Makoto Nishizawa for v-Maf, L-Maf, and MafB-expressing pEF-Bos vectors; Cherie Stayner for the Pax-2 expression vectors; and Didier Monte for the GST-p46 expression vector.

REFERENCES

- Martin, P., Carriere, C., Dozier, C., Quatannens, B., Mirabel, M. A., Vandebunder, B., Stehelin, D., and Saule, S. (1992) *Oncogene* **7**, 1721–1728
- Carriere, C., Plaza, S., Caboche, J., Dozier, C., Bailly, M., Martin, P., and Saule, S. (1995) *Cell Growth Differ.* **6**, 1531–1540
- Carriere, C., Plaza, S., Martin, P., Quatannens, B., Bailly, M., Stehelin, D., and Saule, S. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7257–7266
- Callaerts, P., Halder, G., and Gehring, W. J. (1997) *Annu. Rev. Neurosci.* **20**, 483–532
- Chow, R. L., Altmann, C. R., Lang, A. R., and Hemmati-Brivanlou, A. (1999) *Development* **126**, 4213–4222
- Duncan, M. K., Kozmik, Z., Cvekl, A., Piatigorsky, J., and Cvekl, A. (2000) *J. Cell Sci.* **113**, 3173–3185
- Cvekl, A., and Piatigorsky, J. (1996) *BioEssays* **18**, 621–630
- Larsson, L. I., St-Onge, L., Hougaard, D. M., Sosa-Pineda, B., and Gruss, P. (1998) *Mech. Dev.* **79**, 153–159
- St-Onge, L., Sosa-Pineda, B., Chowdhury, K., Mansouri, A., and Gruss, P. (1997) *Nature* **387**, 406–409
- Sander, M., Neubuser, A., Kalamaras, J., Ee, H. C., Martin, G. R., and German, M. S. (1997) *Genes Dev.* **11**, 1662–1673
- Phillipe, J., Drucker, D. J., Knepel, W., Jepeal, L., Misulovin, Z., and Habener, J. F. (1988) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 4877–4888
- Laser, B., Meda, P., Constant, I., and Philippe, J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 28984–28994
- Hussain, M. A., Lee, J., Miller, C. P., and Habener, J. F. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 7186–7194
- Ritz-Laser, B., Estreicher, A., Klages, N., Saule, S., and Philippe, J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 4124–4132
- Hussain, M. A., and Habener, J. F. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 28950–28957
- Kataoka, K., Noda, M., and Nishizawa, M. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 700–712
- Kawauchi, S., Takahashi, S., Nakajima, O., Ogino, H., Morita, M., Nishizawa, M., Yasuda, K., and Yamamoto, M. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 19254–19260
- Ring, B. Z., Cordes, S. P., Overbeek, P. A., and Barsh, G. S. (2000) *Development* **127**, 307–317
- Ogino, H., and Yasuda, K. (1998) *Science* **280**, 115–118
- Benkhelifa, S., Provot, S., Lecoq, O., Pouponnot, C., Calothy, G., and Felder-Schmittbuhl, M. P. (1998) *Oncogene* **17**, 247–254
- Nishizawa, M., Kataoka, K., Goto, N., Fujiwara, K. T., and Kawai, S. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 7711–7715
- Blank, V., and Andrews, N. C. (1997) *Trends Biochem. Sci.* **22**, 437–441
- Kerppola, T. K., and Curran, T. (1994) *Oncogene* **9**, 3149–3158
- Kerppola, T. K., and Curran, T. (1994) *Oncogene* **9**, 675–684
- Jonat, C., Rahmsdorf, H. J., Park, K. K., Cato, A. C., Gebel, S., Ponta, H., and Herrlich, P. (1990) *Cell* **62**, 1189–204
- Basuyaux, J. P., Ferreira, E., Stehelin, D., and Buttice, G. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 26188–26195
- Hedge, S. P., Kumar, A., Kurschner, C., and Shapiro, L. H. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2729–2737
- Sieweke, M. H., Tekotte, H., Frampton, J., and Graf, T. (1996) *Cell* **85**, 49–60
- Kataoka, K., Yoshitomo-Nakagawa, K., Shioda, S., and Nishizawa, M. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 819–826
- Plaza, S., Dozier, C., and Saule, S. (1993) *Cell Growth Differ.* **4**, 1041–1050
- Klempnauer, K.-H., Arnold, H., and Biedenkapp, H. (1989) *Genes Dev.* **3**, 1582–1589
- Planque, N., Leconte, L., Coquelle, F. M., Martin, P., and Saule, S. L. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 29330–29337
- Plaza, S., Langlois, M. C., Turque, N., LeCornet, S., Bailly, M., Begue, A., Quatannens, B., Dozier, C., and Saule, S. (1997) *Cell Growth Differ.* **8**, 1115–1125
- Chen, S., Wang, Q. L., Nie, Z., Sun, H., Lennon, G., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., and Zack, D. J. (1997) *Neuron* **19**, 1017–1030
- Chau, K. Y., Chen, S., Zack, D. J., and Ono, S. J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 37264–37270
- Ritz-Laser, B., Estreicher, A., Gauthier, B., and Philippe, J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 32708–32715
- Dahl, E., Koseki, H., and Balling, R. (1997) *BioEssays* **19**, 755–765
- Epstein, J. A., Glaser, T., Cai, J., Jepeal, L., Walton, D. S., and Maas, R. L. (1994) *Genes Dev.* **8**, 2022–2034
- Kataoka, K., Nishizawa, M., and Kawai, S. (1993) *J. Virol.* **67**, 2133–2141
- Kerppola, T. K., and Curran, T. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5479–5489
- Hemesath, T. J., Steingrimsson, E., McGill, G., Hansen, M. J., Vaught, J., Hodgkinson, C. A., Arnheiter, H., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Fisher, D. E. (1994) *Genes Dev.* **8**, 2770–2780
- Turque, N., Plaza, S., Radvanyi, F., Carriere, C., and Saule, S. (1994) *Mol. Endocrinol.* **8**, 929–938
- Sakai, M., Serria, M. S., Ikeda, H., Yoshida, K., Imaki, J., and Nishi, S. (2001) *Nucleic Acids Res.* **29**, 1228–1237
- Cordes, S. P., and Barsh, G. S. (1994) *Cell* **79**, 1025–1034
- Ishibashi, S., and Yasuda, K. (2001) *Mech. Dev.* **101**, 155–166
- Liu, Q., Ji, X., Breitman, M. L., Hitchcock, P. F., and Swaroop, A. (1996) *Oncogene* **12**, 207–211
- Epstein, J., Cai, J., Glaser, T., Jepeal, L., and Maas, R. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 8355–8361
- Kerppola, T. K., and Curran, T. (1997) *EMBO J.* **16**, 2907–2916
- Cvekl, A., Sax, C. M., Bresnick, E. H., and Piatigorsky, J. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7363–7376
- Wilson, D., Sheng, G., Lecuit, T., Dostatni, N., and Desplan, C. (1993) *Genes Dev.* **7**, 2120–2134
- Haran, T. E., Kahn, J. D., and Crothers, D. M. (1994) *J. Mol. Biol.* **244**, 135–143
- Paoletta, D. N., Palmer, C. R., and Schepartz, A. (1994) *Science* **264**, 1130–1133
- Kurschner, C., and Morgan, J. I. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**, 333–339
- Furukawa, T., Morrow, E. M., and Cepko, C. L. (1997) *Cell* **91**, 531–541
- Mitton, K. P., Swain, P. K., Chen, S., Xu, S., Zack, D. J., and Swaroop, A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 29794–29799
- Herzig, S., Fuzesi, L., and Knepel, W. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 27989–27999

ARTICLE IV

Specific Pax-6/Microphthalmia Transcription Factor Interactions Involve Their DNA-binding Domains and Inhibit Transcriptional Properties of Both Proteins*

Received for publication, February 27, 2001, and in revised form, April 25, 2001
Published, JBC Papers in Press, May 11, 2001, DOI 10.1074/jbc.M101812200

Nathalie Planque, Laurence Leconte, Frédéric M. Coquelle, Patrick Martin, and Simon Saule‡

From the CNRS UMR 146, Institut Curie Section Recherche, Centre Universitaire Bâtiment 110, 91405 Orsay Cedex, France

Pax-6 and microphthalmia transcription factor (Mitf) are required for proper eye development. Pax-6, expressed in both the neuroretina and pigmented retina, has two DNA-binding domains: the paired domain and the homeodomain. Mice homozygous for Pax-6 mutations are anophthalmic. Mitf, a basic helix-loop-helix leucine zipper (b-HLH-LZ) transcription factor associated with the onset and maintenance of pigmentation, identifies the retinal pigmented epithelium during eye development. Loss of Mitf function results in the formation of an ectopic neuroretina at the expense of the dorsal retinal pigmented epithelium. In the present study, we investigated the interaction between Pax-6 and Mitf. In transient transfection-expression experiments, we found that transactivating effects of Pax-6 and Mitf on their respective target promoters were strongly inhibited by co-transfection of both transcription factors. This repression was due to direct protein/protein interactions involving both Pax-6 DNA-binding domains and the Mitf b-HLH-LZ domain. These results suggest that Pax-6/Mitf interactions may be critical for retinal pigmented epithelium development.

Eye development proceeds from two principal tissue components: the neural ectoderm, which buds from the forebrain to form the optic vesicle, and the surface ectoderm, which forms the lens. The optic vesicle invaginates, producing the optic cup with an inner layer that forms the neural retina (NR)¹ and an outer layer that forms the retinal pigmented epithelium (RPE), which can be related to melanocytes on the basis of its melanin content. RPE and NR embryonic cells have a common precursor and share the characteristic of remaining plastic after they have reached their terminal differentiation stage. Indeed, cells from the RPE have the potential to transdifferentiate into lens or neuronal cells (1–4), and conversely, cells from the NR have

the potential to transdifferentiate into pigmented cells (5). Cell differentiation is the product of differential gene expression, and transcription factors regulate such events.

Recent progress in the genetics of vertebrate eye development is linked to the discoveries of genes encoding transcription factors, such as Pax-6, which is able to initiate an entire cascade of gene activity sufficient to generate a complete eye (6). Pax-6, a member of the paired domain family of transcription factors, has a specialized homeodomain, which is downstream of a DNA-binding paired domain and upstream of a C-terminal activation domain (7, 8). Pax-6 encodes five proteins through alternative splicing and internal initiations (9). Three proteins of 48, 46, and 43 kDa contain a paired domain, but two proteins of 33 and 32 kDa are devoid of this DNA-binding domain. Pax-6 is known to be critical for eye development (10). Mutations in the PAX-6 gene cause the aniridia syndrome in humans (11) and the small eye phenotype in mice (12). Pax-6 is expressed in presumptive eye tissues, and both the semi-dominant pattern of inheritance of the Pax-6 mutant phenotype (10, 12) and experimental manipulations using transgenes based on the Pax-6 locus (13) indicate that achieving the correct level of Pax-6 is important for development of a normal eye.

Mutation of the microphthalmia-associated transcription factor (Mitf, a b-HLH-LZ family member) (14) induces the human Waardenburg syndrome type 2, a hereditary disorder associated with melanocyte abnormalities (15, 16). This gene is of special interest in relation to the NR and RPE development and transdifferentiation phenomenon because it has been shown to play a critical role in RPE development. Mutation of Mitf in *mi* mice results in microphthalmia associated with an abnormal development of the RPE, which appears unpigmented and often pluristratified (17–19). Spontaneous transdifferentiation of quail RPE *in vivo* is accompanied by a mutation in this gene (20), suggesting a role for Mitf in both cellular differentiation and control of cell division. We have previously found that chicken or quail NR cells expressing Mitf are responsive to FGF2 and that these cells become rapidly pigmented *in vitro*, in contrast to the control cells transfected with the empty DNA vector (21). Mitf regulates the expression of genes involved in melanogenesis, including *QNR-71*, which encodes a melanosomal protein (5), and several enzyme-encoding genes controlling the melanin synthesis. These genes include the tyrosinase (22, 23) and tyrosinase-related peptide 1 (24). All of these genes are regulated by Mitf through a direct binding at the CATGTG hexameric motif (E-box) present in their promoter regions (5, 25, 23).

Experiments have shown that Pax-6 can interact with homeodomain-containing transcription factors (27–29), CBP/p300 co-factors (30), and with members of the tumor suppressor retinoblastoma protein (pRB) (31). Mitf also interacts with pRB (24) and CBP/p300 (33). Thus, in view of the importance of both

* This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut Curie, the Association Retina France, the Association pour la Recherche contre le Cancer, the Ligue Nationale contre le Cancer, the Fondation pour la Recherche Médicale, and the Association de Secours des Amis des Sciences. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-1 69 86 71 53; Fax: 33-1 69 07 45 25; E-mail: Simon.Saule@curie.u-psud.fr.

¹ The abbreviations used are: NR, neural retina; RPE, retinal pigmented epithelium; b-HLH-LZ, basic helix-loop-helix leucine zipper domain; FGF, fibroblast growth factor; GST, glutathione S-transferase; BHK, baby hamster kidney; CAT, chloramphenicol acetyltransferase; PBS, phosphate-buffered saline; EGFP, enhanced green fluorescent protein; Pipes, 1,4-piperazinediethanesulfonic acid.

Pax-6 and Mitf for eye development, and because the two proteins are simultaneously present in the developing RPE, we tested whether they could interact with each other. This interaction would be of particular interest for RPE differentiation because Mitf-deficient mice or quails exhibit spontaneous neuronal transdifferentiation of depigmented RPE *in vivo* (20).

The present results showed that both DNA-binding domains of Pax-6 interact with the b-HLH-LZ domain of Mitf. This interaction strongly reduces transactivation of Pax-6 as well as Mitf-responsive promoters. No inhibition is observed with the mi mutant form of Mitf. Based on these data, we consider that Pax-6 and Mitf interaction may be required for normal retinal pigmented epithelium differentiation *in vivo*.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mitf and Pax-6 Constructs—The pSFCV-LE-Mi (see Ref. 21) was digested with *EcoRI* to produce construct pSG5-Mitf (amino acids 1–413). pCRII-Mitf(193–413) (see Ref. 21) was digested with *BamHI* to produce construct pSG5-Mitf(193–413) using a modified pSG5 including an AUG upstream of the *BamHI* site. The pSG5-Mitf(1–413) plasmid was digested with *PstI/SpeI*, blunt-ended with mung bean nuclease, and ligated to produce construct pSG5-Mitf(1–318). pSG5-Mitf(193–413) was digested with *AgeI/SpeI*, end-filled with Klenow, and ligated to make construct pSG5-Mitf(193–297). pSG5-Mitf was digested with *XbaI*. The resulting vector was then digested with *SpeI/BamHI*, blunt-ended with mung bean nuclease, and ligated to obtain pSG5-Mitf(1–140). pSG5-Mitf(193–413) was digested with *SpeI/XhoI*, end-filled with Klenow, and ligated. The resulting plasmid was then digested with *BamHI/AgeI*, end-filled with Klenow, and ligated, giving construct pSG5-Mitf(297–413). The pEF-BOS-Mitf wild type and mi mutant constructs have been described previously (34) and were kindly provided by Dr. S. Nomura. A Mitf cDNA fragment corresponding to the full-length protein was amplified by polymerase chain reaction using oligonucleotides 5'-CAC GAA TTC CAT GCT GGA AAT GCT AGA A-3' (position +45) and 5'-TGT GCG GCC GCC TAA CAC GCA TGC TCC GT-3' (position +1270). The amplification product was cloned in pCRII and sequenced. The Mitf cDNA was then inserted between the *EcoRI-NotI* sites of pGEX-4T3. pCRII-Mitf(193–413) was digested with *EcoRI* and cloned in the *EcoRI* site of pGEX-1 λ T. These two subclonings resulted in the in-frame fusion of the desired sequence to the GST protein.

pSG5-p46* encodes a Pax-6 p46 isoform containing three point mutations in the paired domain (S93A, F95N, and E98Q). To generate this mutant, we used the Chameleon double-stranded site-directed mutagenesis kit (Stratagen) using pSG5-p46 (8) as a template and oligonucleotide 5'-CGA GAG TGC CCC GCC ATC AAT GCG TGG CAG ATT CGA GAC-3'. PAX-3-encoding vector pSRa MSV/PAX-3 was kindly provided by Dr. M. F. Roussel (35).

Cell Cultures, Transfections, and Luciferase and CAT Assays—Baby hamster kidney (BHK)-21 cells were cultured in 10% fetal calf serum in Dulbecco's modified Eagle's medium. Dissociated RPE dissected from 8-day-old quail embryos was plated in Dulbecco's modified Eagle's medium/F-12 containing 10% fetal calf serum, 1% vitamins, 100 \times minimum Eagle's medium, and 10 μ g/ml conalbumin. Cells were seeded 24 h prior to transfection as described previously (36). BHK21 cell transfections were performed with PEI reagent (Exgen 500, Euromedex, Souffelweyersheim) according to the instructions of the manufacturer. Varying amounts of expression plasmid were co-transfected as indicated in the respective figures. The total amount of transfected DNA was kept constant by adding empty expression vector DNA. Tyrosinase promoter was a pGL2 vector (pMT2.2, kindly provided by Dr. R. Ballotti (37)). Details on QNR-71 has been published previously (5) as well as the G3–138 glucagon promoter (28). A RSV-LacZ or a pcDNA3-LacZ vector was co-transfected for normalization of luciferase and CAT assays by controlling the β -galactosidase activity. RPE cells transfections were performed by the calcium phosphate method. After transfection (48 h), cells were harvested and lysed in reporter lysis buffer (Promega). Luciferase and CAT assays were performed as described previously (36). The levels of CAT activity were quantified after exposure of the thin-layer chromatograms to a PhosphorImager screen.

In Vitro Translation and Glutathione S-transferase (GST) Pull-down Assays—The ³⁵S-radiolabeled proteins were translated *in vitro* using the TNT system (Promega). The GST chimerical proteins were extracted from bacteria following the manufacturer's instructions (Amersham Pharmacia Biotech). Labeled proteins were pre-incubated with empty glutathione-Sepharose beads for 30 min at 4 °C. GST proteins on glutathione-Sepharose beads were pre-incubated with 40 μ g of bovine

serum albumin. Bead volumes were kept constant by adding empty beads. The pull-down assays were performed in 25 mM Hepes, pH 7.5, 150 mM KCl, 12.5 mM MgCl₂, 0.1% Nonidet P-40, and 20% glycerol. Proteins were incubated for 1 h at 4 °C, and then the beads were washed four times in 20 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 0.5% Nonidet P-40. Bound proteins were eluted by boiling and analyzed on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The gel was treated with 16% sodium salicylate to amplify signals and dried before exposure to a phosphorimaging screen.

Electrophoretic Mobility Shift Assay—The DNA probe used was the P6CON double-stranded oligonucleotide (5'-GGA TGC AAT TTC ACG CAT GAG TGC CTC GAG GGA TC-3') [γ -³²P]ATP-labeled with the PolyNucleotide kinase T4. G1–51 (5'-CAA AAC CCC ATT ATT TAC AGA TGA GAA ATT TAT ATT GTC AGC GTA ATA TCT-3') is a wild type glucagon promoter element that has been shown to bind Pax-6 (28). Gel retardation assays were performed as described previously (36) with 50 ng of bacterially expressed proteins.

Immunocytochemistry—Transfected cells cultured on 16-mm microscope coverslips were fixed for 1 h with 2% paraformaldehyde in PBS and then treated with serum MiC (see 21). Anti-Mi-reactive proteins were detected with CY3-labeled goat anti-rabbit immunoglobulin secondary reagent (Jackson ImmunoResearch).

EGFP and DsRed Fusion Protein Constructs—To visualize both Pax-6 and Mitf proteins, enhanced green fluorescent protein (EGFP, CLONTECH) and *Discosoma striata* red protein (DsRed, CLONTECH) were used as fusion partners of p46 and Mitf, respectively. The following plasmids were constructed: a *BglII-NotI* EGFP fragment was ligated to the *BglII* and *Bsp120I* sites of pVNC3 (modified from pVMI16 (38)) to produce pVNC3EGFP. A *BamHI-Bsp120I* Pax-6 fragment was inserted into the *NotI* and *BglII* sites of pVNC3EGFP to make pVNC3Pax6-EGFP, which was then digested by *HindIII* and *BamHI* and Klenow-treated, giving pVNC3Pax6EGFP. A *BglII-NotI* DsRed fragment was ligated to the *BamHI* and *Bsp120I* sites of pVNC3 producing pVNC3Red. A *HindIII-SalI* fragment encompassing the whole Mitf coding region was inserted in the *HindIII-SalI* sites of pVNC3Red to produce pVNC3 MiRed. An EGFP-*myc* fusion was used as a negative control. An *EcoRI-Bsp1407* Klenow-treated EGFP fragment (from pEGFP-1, CLONTECH) was ligated to an *EcoRV-SphI* Klenow-treated v-Myc fragment (from MC29) and inserted into the *EcoRI* and *BglII* Klenow-treated sites of pVNC7 (which is the pVNC3 plasmid with an inverted multiple cloning site) to produce pVNC7EGFPmyc. pVNC3MiRed was co-transfected with either pVNC3Pax6EGFP or pVNC7EGFPmyc into E8 quail retinal pigmented cells. To determine the two chimera localization, cells were fixed for 20 min at room temperature in 3% paraformaldehyde in PHEM buffer (60 mM Pipes, 25 mM Hepes, 10 mM EGTA, 1 mM magnesium acetate, pH 6.9). Cells were washed three times in PBS and permeabilized for 25 min in 0.1% Triton X-100 in PBS. Chromosomes were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) for 5 min. After a rinse in PBS, coverslips were mounted in 50% PBS-glycerol containing anti-fading reagent 1.4 diazabicyclo-(2–2–2)octane (DABCO, Sigma) at 100 mg/ml.

Wide Field Optical Sectioning Fluorescence Microscopy—Pictures of fixed cells were collected using a three-dimensional deconvolution imaging system, the detailed description and validation of which will be published elsewhere.² Briefly, it consisted of a Leica DM RXA microscope equipped with a piezoelectric translator (PIFOC, Physik Instruments, Waldbronn, Germany) placed at the base of a 100 \times PlanApo N.A. 1.4 objective, and a 5-MHz Micromax 1300Y interline CCD (charge-coupled device) camera (Roper Instruments, France). For the acquisition of Z-series, the camera was operated at full speed and controlled the Piezo translator at the start of each CCD chip read-out. Stacks containing fluorescence images were collected automatically at 0.2 μ m Z-intervals (Metamorph software, Universal Imaging). Wavelength selection was achieved by switching to the corresponding motorized selective Leica filter block before each stack acquisition. Tests using 50-nm Tetraspec beads (Molecular Probes) showed that the system did not generate x-y pixel shifts, and that Z-plane shifts between colors, due to chromatic aberrations, were reproducible and could be corrected for. Exposure times were adjusted to provide ~3000 gray levels at sites of strong labeling. Automated batch deconvolution of each Z-series was computed using a measured point spread function and constrained iterative deconvolution with a custom-made software package. The point spread function of the optical system was extracted from three-dimensional images of fluorescent beads 0.1 μ m in diameter (Molecular Probes) collected at each wavelength.

² J. B. Sibarita and J. R. De Mey, manuscript in preparation.

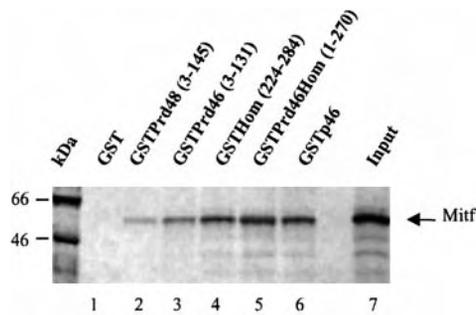


FIG. 1. Both the Pax6 paired domain and homeodomain interact with Mitf. The ^{35}S -labeled full-length Mitf protein was translated *in vitro* and incubated with GST-Pax6 proteins. The GST protein showed no interaction with the translated Mitf protein (lane 1). Mitf interacted with paired domains of p46 or p48 (lanes 2 and 3) as well as p46 homeodomain (lane 4). Stronger interaction was observed when both domains were present (lane 5) or with the full-length protein (lane 6).

The Z-series were pseudocolored and overlaid, and maximal pixel intensity projections were calculated with the help of Metamorph software (Universal Imaging).

RESULTS

Pax-6 Interacts with Mitf—To test the hypothesis that Pax-6 interacts physically with Mitf, we prepared affinity columns consisting of glutathione-Sepharose coupled with a GST Paired fusion protein containing the paired domain from the p46 (GSTPrd46, amino acids 3–131) or the p48 (GSTPrd48, amino acids 3–145) and GST-Hom, containing the p46 homeodomain (amino acids 224–284), GST-Prd46-Hom (amino acids 3–270) and GST-p46 containing the full-length Pax-6 product. We also used GST as a negative control. *In vitro* radiolabeled Mitf protein was loaded onto these columns and washed, and bound proteins were eluted by boiling and analyzed on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The percentage of bound radioactivity was calculated using a PhosphorImager. A comparable amount of radiolabeled Mitf was recovered on GST-Paired (1.7% of the input, Fig. 1, lane 3) and GST-Hom (3.7% of the input, Fig. 1, lane 4). These results indicated that Mitf associated directly with both the paired and homeodomains of Pax-6. Similar results were obtained with the p48 paired domain (0.75% of the input; Fig. 1, lane 2), suggesting that both Pax-6 isoforms interacted with Mitf. In addition, we observed a more efficient binding to Mitf using the GST-Prd46-Hom (4.6%) than with the paired or homeodomain alone, suggesting that Mitf interacted simultaneously with both of these DNA-binding domains (Fig. 1, compare lanes 3, 4, and 5). Stronger retention was not observed with the full-length p46 (3.9%), indicating that the p46 C terminus is not a Mitf-interacting domain (Fig. 1, lane 6).

To identify the regions in Mitf required for physical interaction with the Pax-6 p46, we carried out *in vitro* binding experiments by using various deletion mutants of Mitf (Fig. 2A). As shown in Fig. 2B, both the N terminus of the protein (amino acids 1–140, lane 5) and the b-HLH-LZ domains (193–297, lane 4) were able to bind to GST-p46 with weak and strong affinities, respectively. The C terminus of Mitf (amino acids 298–413, lane 6) was unable to bind, whereas similar amounts of the truncated proteins were synthesized in the reticulocyte lysate (Fig. 2C, lane 6). Binding results obtained with the GST-p46 (Fig. 2B) were also observed with GST-Paired and GST-Hom (data not shown), indicating that the b-HLH-LZ domain of Mitf interacts with both of the Pax-6 DNA-binding domains.

Mitf Recognizes the p46 Paired Domain through the C-terminal Subdomain and Can Inhibit the DNA Binding Activity of Pax-6—It has been shown that the Pax-5 paired domain can

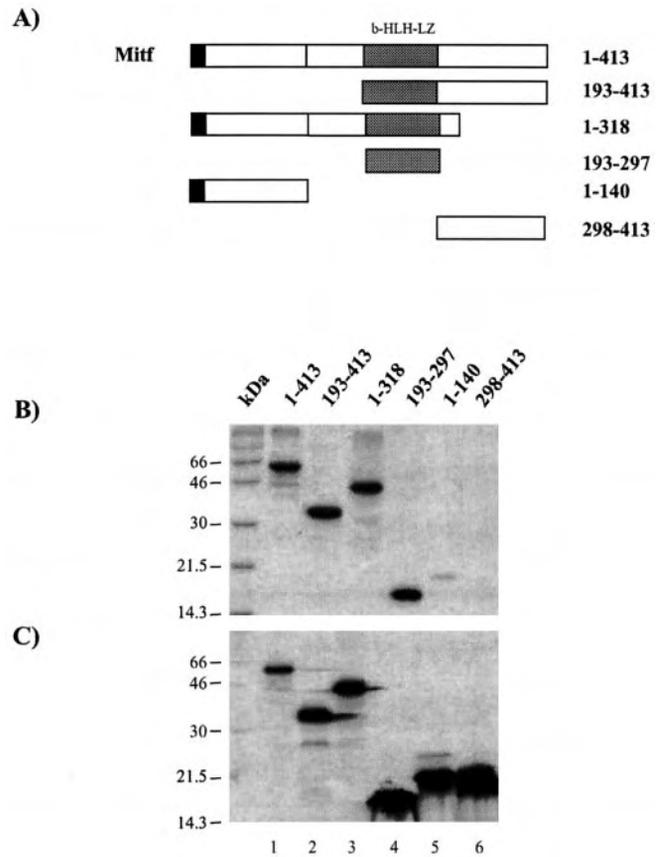


FIG. 2. Mitf b-HLH-LZ domain is required for interaction with Pax6. A, schematic representation of the Mitf constructs used for *in vitro* translation and the GST pull-down assay. Lane 1 shows the full-length Mitf protein of 413 amino acids with its b-HLH-LZ domain. Lanes 2–6 represent various Mitf deletion constructs used in this study. The numbers refer to amino acids. B, autoradiograph of the GST pull-down assay (overnight exposure). ^{35}S -Labeled Mitf proteins were translated *in vitro* and incubated with truncated GST-p46 proteins. The strongest Pax6/Mitf interaction was observed when the b-HLH-LZ domain was included (lanes 1–4). A faint interaction was seen with the N-terminal part of Mitf protein (amino acids 1–140) (lane 5). No interaction was detected with the C-terminal part of Mitf (298–413) (lane 6). C, autoradiograph of the inputs exposed for 2 h.

recruit Ets DNA-binding domains to the Pax-5 C-terminal subdomain DNA-binding site to form ternary complexes on a B-cell-specific promoter (39). The structure and docking of Pax-5 should be nearly identical to Pax-6, because their C-terminal subdomains are 75% identical and all DNA-contacting residues are conserved (40). Modeling the C-terminal subdomain of paired with the Max b-HLH shows that residues of the second helix of the paired C-terminal subdomain (Ser-93, Phe-95, and Glu-98; see Fig. 5A) can pack against the loop of Max HLH and interact with the Asp-236, Asp-238, and Arg-240 (equivalent amino acids in Mitf). To test the possibility that these residues are involved in the Pax-6/Mitf interaction, we replaced by directed mutagenesis S93A, F95N, and E98Q in the p46 protein and D236N, D238N, and R240N in the Mitf protein. Wild type Pax-6 (Fig. 3 lane 5) or mutagenized Pax-6 proteins (Fig. 3, lane 6) synthesized *in vitro*, were loaded onto GST columns. The percentage of bound radioactivity was calculated using a PhosphorImager. 23% (Fig. 3, lane 3) of the wild type p46 Pax-6 protein recognized the GST-Mitf (193–413), but only a 3% residual binding (Fig. 3 lane 4) was detected using the mutagenized p46 (p46*) protein. This residual binding could be observed because of the presence of the homeodomain in the p46*, since this DNA-binding domain can also bind the Mitf protein (Fig. 1). However, the paired-less proteins (p32–33)

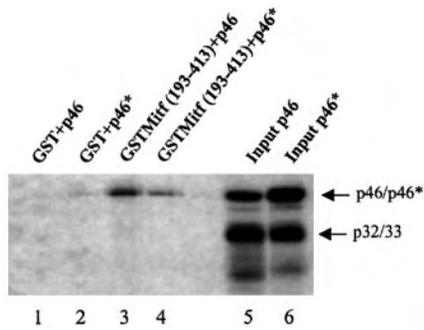


FIG. 3. Mutations in the p46 paired domain result in weak Pax6/Mitf interaction. Autoradiograph of the GST pull-down assay. ^{35}S -labeled wild type p46 or mutated p46* were translated *in vitro* and incubated with GST alone or GST-Mitf-(193–413). Note that the paired-less p32/33 proteins were not recognized. Lane 3, 23% retention; lane 4, 3% as calculated from PhosphorImager exposure.

synthesized *in vitro* (Fig. 3, lane 5) were not recognized by Mitf protein (Fig. 3, lanes 3 and 4, compare with lanes 5 and 6). However, no difference was observed in the amount of radiolabeled Mitf protein recovered on the GST-Prd46 column between the wild type (12.5% of the input) or the Mitf triple mutant (D236N,D238N,R240N, 12.8% of the input) showing that the modifications introduced into the loop of the HLH domain still allow protein/protein interaction with Pax-6 (data not shown).

Because Mitf and Pax-6 interacted through the paired domain, we tested whether Mitf binding to the p46 protein was able to modulate the DNA binding activity of this Pax-6 product by using the p46 ability to bind an oligonucleotide bearing a high affinity paired binding site named Pax6CON (41). As shown in Fig. 4A, when GST-Mitf-(193–413) or GST-Mitf-(1–413) proteins were co-incubated with GSTPrd46, a marked decrease in binding to Pax6CON oligonucleotide was observed (Fig. 4A, compare lane 2 with lanes 3 and 4). However, because the Pax6CON binding site was not a real binding site present in a Pax-6 target promoter, we performed a similar experiment using an oligonucleotide containing the Pax-6 binding site of the G1 element present in the glucagon promoter. As for the Pax6CON, co-incubation with GST-Mitf-(193–413), which is unable to bind this probe (lane 3), reduced significantly the Pax-6 binding on this oligonucleotide (Fig. 4B, lane 4).

Effects of Pax-6/Mitf Protein Interaction on Their Transactivating Properties—The Mitf factor is essential for melanocyte differentiation and is able to activate the promoter of several genes involved in melanogenesis (5, 14, 22, 24, 42). We tested for whether the Pax-6/Mitf interaction observed was able to regulate Mitf-dependent *QNR-71* and tyrosinase promoter expression (Fig. 5B). The *QNR-71* promoter (pP Δ 71–220; 0.2 μg) or tyrosinase constructs (1 μg) were co-transfected into RPE cells with the vector expressing the murine Mitf protein and increasing amounts of the pSG5-Pax-6 vector expressing either the p46 or the p48 isoforms (Fig. 5A). Cell lysates were collected 2 days after transfection, and the levels of CAT and luciferase activities present in the lysates were determined. Co-transfection of the pP Δ 71–220 with the vector expressing the murine Mitf protein resulted in an 8-fold increase of CAT activity relative to the vector control. A strong increase in luciferase activity (40-fold) was also observed with the tyrosinase promoter in response to the Mitf protein expression (Fig. 5C). Co-transfection of the Mitf-responsive promoters with the vectors expressing the Pax-6 isoforms alone (Fig. 5A) did not modify their activity level relative to the control vector (Fig. 5C). Co-transfection of either *QNR-71* or tyrosinase promoter with the vectors expressing the Mitf and p46 Pax-6 proteins resulted in an 80–90% reduction of the Mitf transactivational

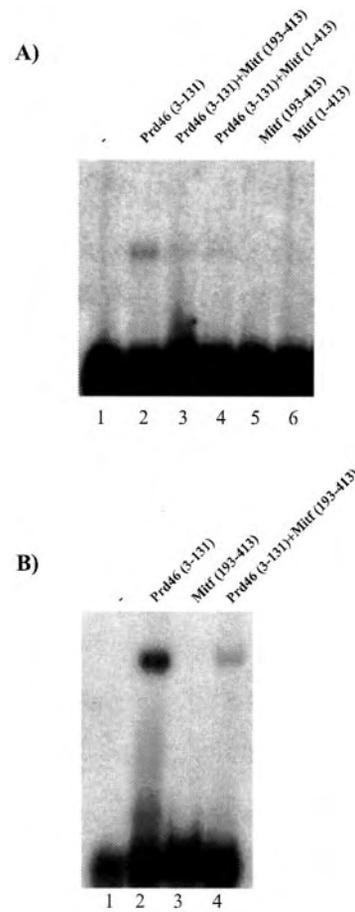


FIG. 4. Mitf inhibits Pax6 DNA-binding on its specific gene target. A, electrophoretic mobility shift assay using a specific p46 oligonucleotide radioactive probe P6CON and GST-Prdp46, GST-Mitf-(1–413), or GST-Mitf-(193–413). Lane 1, GST protein alone was used as a negative control. Lane 2, P6CON forms a DNA-protein complex with the p46 paired domain. Lane 3, formation of this complex was inhibited by the addition of GST-Mitf-(193–413) or GST-full-length Mitf (lane 4). Mitf-(193–413) or full-length Mitf do not bind the DNA probe (lanes 5 and 6). B, electrophoretic mobility shift assay using a G1–51 glucagon-derived Pax-6-binding site radioactive probe and GST-Prdp46 or GST-Mitf-(193–413). Lane 1, GST protein alone was used as a negative control. Lane 2, G1–51 forms a DNA-protein complex with the p46 paired domain. Mitf-(193–413) do not bind this DNA probe (lane 3). Lane 4, formation of the paired domain-DNA complex was inhibited by the addition of GST-Mitf-(193–413).

effect in a dose-dependent manner (Fig. 5C). Similar results were obtained with the p48 isoform (Fig. 5C). This Pax-6 inhibition was specific to Mitf transcription factor, because no repression was observed on the 4xGal4 thymidine kinase promoter activated by the Gal4VP16 protein co-transfected with the p46 encoding vector (data not shown).

Because the Pax-6 proteins were able to repress Mitf activity, we investigated whether Mitf was able to repress the Pax-6 transactivating properties. For that purpose, we used as a target the glucagon promoter linked to the CAT gene, which is strongly activated by the p46 protein (28). To demonstrate that in the same cells we could obtain both positive and negative effects on transcriptional regulation, we introduced the tyrosinase promoter linked to the luciferase reporter gene (activated by Mitf) together with the glucagon promoter linked to the CAT gene (activated by Pax-6). Luciferase and CAT activities present in the lysates were determined, and both were found to have decreased strongly when compared with the activities obtained with Pax-6 or Mitf transcription factor alone (Fig. 5D). No effect of Mitf or Pax-6 (alone or together) was observed on the β -galactosidase activity of a cytomegalovirus promoter in-

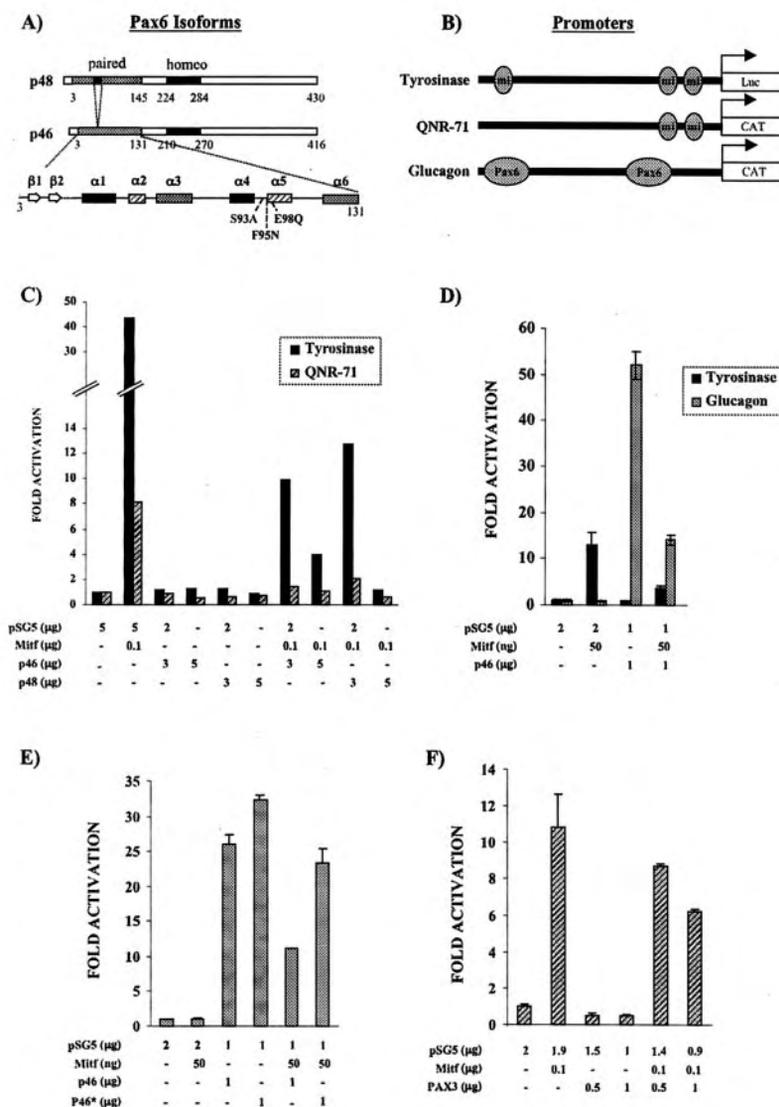


FIG. 5. Co-expression of Pax-6 and Mitf inhibits their transactivation effects on their target promoters. *A*, representation of two Pax-6 isoforms used in this study, namely p46 and p48. Both isoforms contain two DNA-binding domains: the paired box and the homeodomain. p48 contains an additional 42-base pair exon (4A) located in the paired domain. The numbers refer to amino acids. *B*, reporter gene promoter constructs used in the transfection assays. DNA-binding sites for Mitf (*mi*) or Pax6 are indicated in the promoters, which drive either luciferase (*Luc*) or CAT gene expression. *C*, tyrosinase and *QNR-71* promoter transactivation assays. E8 quail RPE cells were transiently transfected with 1 μ g of pMT2.2 (pGL2tyrosinase) or 200 ng of p Δ 71–220. The total amount of transfected DNA was kept constant by adding pSG5 empty vector to the reaction. *D*, tyrosinase and glucagon promoter transactivation assays. BHK21 cells were transiently transfected with 500 ng of pMT2.2 (pGL2tyrosinase) and 200 ng of pG3–138 (pBLCAT3 glucagon). The results were normalized to β -galactosidase activity derived from a co-transfected pcDNA3-LacZ expression plasmid. *E*, effect of paired domain mutations in Pax-6/Mitf interactions. 50 ng of pSG5-Mitf was transiently co-transfected into BHK21 cells with 1 μ g of a plasmid encoding either the wild type Pax6 (pSG5-p46) or the p46* mutated in the paired domain and 200 ng of a CAT reporter glucagon promoter construct (pG3–138). CAT activities were expressed relative to the value for the pG3–138 with the empty vector (set at a value of 1). Thin lines indicate standard deviations calculated from transfections performed in duplicate. The mutant p46* is as efficient as the wild type p46, but its transactivation effect on the glucagon promoter is only marginally repressed by Mitf. *F*, co-expression of PAX-3 and Mitf inhibits their transactivation effects on *QNR-71* promoter. BHK21 cells were transiently transfected with 10 ng of p Δ 71–220 and 100 ng of pSG5-Mitf and 500 ng or 1 μ g of PAX3-encoding vector pSR α MSV/PAX-3. The total amount of transfected DNA was kept constant by adding pSG5 empty vector to the reaction.

cluded as a control in the experiment. When we used instead in this assay the p46* (which interacted poorly with Mitf, Fig. 3), this protein activated the glucagon promoter as efficiently as the wild type protein but was 2-fold less repressed by Mitf (Fig. 5E). This result confirms that the C terminus of the paired domain is an important domain of interaction between the two proteins.

Because Pax-3, a Pax family member expressed in the neural crest-derived melanocytes, activated the Mitf promoter (43, 44), we tested whether PAX-3 was able to repress Mitf activity. As shown in Fig. 5F, PAX-3 was able to reduce Mitf activity on the *QNR-71* promoter but to a lesser extent than Pax-6.

Next we asked whether a mutation abrogating the Mitf

activity (deletion of one amino acid in the DNA-binding domain (34)) and resulting in transdifferentiation of dorsal retinal pigment epithelium into neural retina (19) could have any effect on Pax-6 transactivation. This was indeed the case, as shown in Fig. 6. The mutant (Fig. 6C) and wild type proteins (Fig. 6B) were expressed with a similar efficiency, but only the wild type protein inhibited the Pax-6 transactivating properties (Fig. 6A).

Parts of Pax-6 and Mitf Co-localize in the Nucleus—To demonstrate that Pax-6 and Mitf are able to interact *in vivo*, we co-transfected vectors expressing p46, tagged with the enhanced green fluorescent protein (EGFP), and Mitf, tagged with the DsRed protein. Expression of these vectors into E8

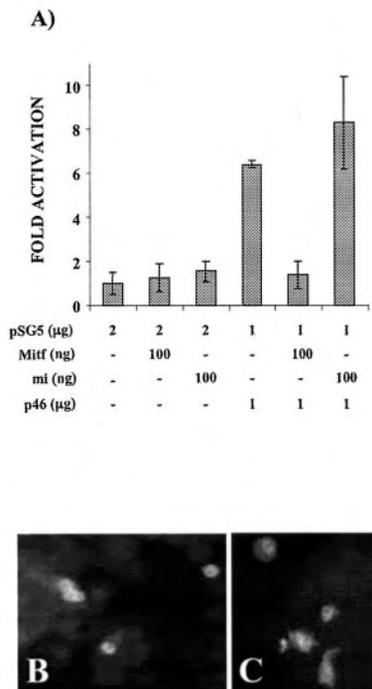


FIG. 6. Effect of a mutation in the Mitf basic domain on Pax6/Mitf interaction. The *mi* mutation is a 3-base pair deletion that removes one of the three arginines at the C terminus of the Mitf basic region. **A**, constructs expressing either the wild type (pEF-BOS-Mitf wild type) or the mutated Mitf (pEF-BOS-*mi*) were transiently co-transfected into BHK21 cells with a plasmid encoding Pax-6 (pSG5-p46) and a CAT reporter glucagon promoter construct (pG3-138). CAT activities were expressed relative to the value for the pG3-138 with the empty vector (set at a value of 1). *Thin lines* indicate standard deviations calculated from transfections performed in duplicate. Wild type Mitf repressed transactivation of the glucagon promoter by wild type p46, whereas the mutated allele *mi* had no inhibitory effect on p46 transactivation. **B**, Mitf immunodetection on BHK21 cells transfected with a plasmid expressing the wild type Mitf protein (pEF-BOS-Mitf). **C**, Mitf immunodetection on BHK21 cells transfected with a vector expressing the mutated Mi protein (pEF-BOS-*mi*).

quail RPE cells allowed detection of both proteins in cell nuclei (Fig. 7, **A** and **B**). Fig. 7**C** shows the overlap of the two fluorescent proteins by maximal pixel intensity projections of a representative nucleus. If a portion of the protein was localized in distinct parts of the nucleus, a significant amount of the *yellow labeling* could be observed suggesting that, *in vivo*, p46 and Mitf proteins can co-localize in the nucleus. To demonstrate that such a co-localization is not an artifact due to a random effect, we performed a similar co-transfection experiment with a v-Myc protein (which has been shown not to interact with Mitf *in vitro* (42)) tagged with GFP and Mitf tagged with DsRed. In contrast to Pax-6 and Mitf, the overlap of the two fluorescent proteins revealed that Mitf and v-Myc do not substantially co-localize (Fig. 7**F**).

DISCUSSION

This study provided evidence that Pax-6 interacts with the Mitf transcription factor and that this interaction suppresses the function of these molecules as transactivators. Furthermore, we observed that this interaction involved their respective DNA-binding domains. Because Pax-6 and Mitf form a protein-protein complex, they are no longer able to bind DNA and to transactivate their target promoters. We then investigated which regions of Pax-6 and Mitf DNA-binding domains may be required for their interaction. The paired domain of Pax-6 can be divided into two DNA-binding subdomains (45): the N-terminal domain (PAI) and the C-terminal domain (RED). Several data indicate that Pax-6/Mitf interactions im-

ply the C terminus of the p46 paired domain. First, the p46 and p48 paired domains differ only in their N terminus (45) and are both efficient in Mitf binding and trans-inhibition. In addition, specific mutagenesis of 3 amino acids in the C terminus (Ser-93, Phe-95, and Glu-98; see Fig. 5**A**) of the p46 paired domain strongly reduced both the interaction with and the repression by Mitf of a Pax-6-responsive promoter. Interestingly, Pax-3 repressed Mitf activity to a lesser extent than Pax-6. Close examination of the Pax-3 paired domain reveals that if Phe-95 and Glu-98 are conserved in the paired domains of both proteins, Ser-93 of Pax-6 corresponds to a Gly in Pax-3 (46). Therefore, this amino acid may be important for protein interaction with Mitf. In contrast to the homeodomain alone (Fig. 1, *lane 4*), the paired-less proteins (p32-33) synthesized *in vitro* (Fig. 3, compare *lanes 5* and 3) were not recognized by the Mitf protein. That the paired domain may be able to modulate the function of the homeodomain intramolecularly (47) explains why the Mitf protein may bind the homeodomain in the context of p46, explaining the residual interaction observed with the p46* containing the mutagenized paired domain (Fig. 3, *lane 4*). Indeed, it has been shown recently that C-terminal amino acid 422 is also critical for the DNA binding activity of the homeodomain in the p46 protein (48). These data suggest that folding of the homeodomain is controlled by both the N and C termini of the p46. Therefore, the folding of the homeodomain in paired-less p32-33 proteins may be different from that of the p46. However, it remains to be formally demonstrated that the homeodomain in the p46 binds Mitf. Such an inhibitory interaction has already been observed between paired domain transcription factors of the Pax-2/5/8 subfamily with a HLH Id protein (49). This binding occurred through the paired domain and resulted in the disruption of DNA-bound complexes. Thus, the HLH Id protein dissociated the complex formed between the Ets family member Elk1 and Pax-2/5/8 proteins (49). As for Mitf, the paired C terminus was involved in the interaction between Pax-5 and Ets family members (40). Amino acids involved in this interaction (Trp-97, Arg-100, and Val-117) are very close to those involved in the interaction between Pax-6 and Mitf, suggesting that the HLH Id protein may dissociate the Pax-5/Elk1 complex by directly competing for the same protein/protein interaction domain.

In contrast to the inhibitory effect of the Pax-6/Mitf interaction, activatory interactions between homeodomain-containing factors and b-HLH proteins have already been reported (50-52). The presence of many other factors and co-factors in a cell nucleus *in vivo* may influence the DNA-binding and transactivation properties of these proteins. In this respect, it is interesting to note that the p300 co-factor, which is coupled to the basal transcription machinery, is able to bind both Pax-6 and Mitf. This interaction enhances the synergistic effect of Pax-6 and homeodomain-containing protein *cdx2* on the glucagon promoter (30). Such a factor could modulate the interaction between Pax-6 and Mitf and dictate the inhibitory or activatory nature of the interaction. Inhibition of Pax-6 DNA binding is not restricted only to Mitf, because we previously reported that homeodomain containing *Engrailed 1* and *2* factors inhibited Pax-6 DNA binding and transactivation (27).

What could be the consequence of the inhibitory interaction between Pax-6 and Mitf for eye development? It is well established that the division of the optic neuroepithelium into two domains, the presumptive neuroretina and the pigmented retina, is critical for the development of the vertebrate eye. The notion that the early optic epithelium is bipotential may be reflected by the fact that distinct transcription factors that are later important separately for NR or RPE are initially co-expressed. For example, in cultured optic vesicles, Mitf expres-

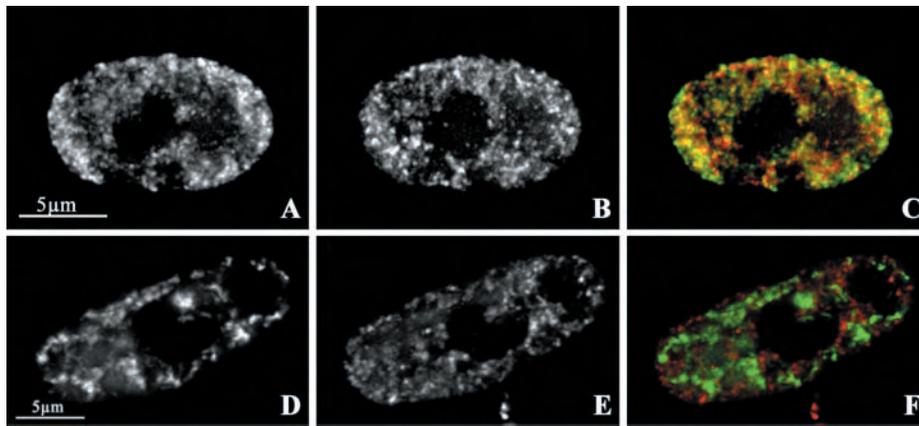


FIG. 7. Expression of Pax-6-EGFP and Mitf-DsRed fusion proteins in RPE cells shows co-localization in nuclei. Pax-6-EGFP and Mitf-DsRed fusion proteins were transfected into quail retinal pigmented cells, and the subcellular localization of the fusion proteins was determined by three-dimensional fluorescence microscopy of fixed cells. *A*, Pax-6-EGFP expression in cell nuclei. *B*, Mitf-DsRed expression in cell nuclei. *C*, overlay of these two expression patterns (*A* and *B*) showing co-localization of Pax-6-EGFP and Mitf-DsRed fusion proteins in the cell nuclei (see yellow spots). As a control we determined the subcellular localization of v-Myc and Mitf. *D*, EGFP-myc expression in cell nuclei. *E*, Mitf-DsRed expression in cell nuclei. *F*, overlay of these two expression patterns (*D* and *E*) showing no co-localization of EGFP-myc and Mitf-DsRed fusion proteins in the cell nuclei (compare with panel *C*).

sion was restricted to the RPE layer, whereas Pax-6 staining was found in both RPE and NR (53). Implantation of FGF1-coated beads resulted in down-regulation of Mitf and up-regulation of Pax-6 and Chx10. Then RPE thickened and differentiated along the neuroretinal pathway (53), suggesting that Mitf down-regulation is required to initiate neuronal differentiation. Introduction of Mitf-expressing vectors into the avian neuroretina *in vitro* induced the differentiation of pigmented cells in the culture (21) showing that Mitf is dominant over neuroretinal factors to induce a pigmented phenotype. Consistent with these observations, when a functional Mitf was missing *in vivo*, as in *mi/mi* mice, the RPE (at least its dorsal part) lost the expression of RPE-specific genes, thickened, and then became a laminated second neuroretina (19). Therefore, if we expect the Pax-6/Mitf interaction to be a critical event in RPE differentiation, the mutant Mi protein should abolish such an interaction. This mutant (34) lacks an arginine in the basic region of the nuclear localization signal, resulting in a cytoplasmic misrouting of an important part of the protein and lack of DNA-binding capability. In cotransfection experiments with both Pax-6 and *mi* coding vectors, we detected a substantial part of the Mi protein in the nucleus of the transfected cells, but we noticed a complete lack of Pax-6 inhibition. *In vitro* pull-down experiments performed with the Mi protein translated in a reticulocyte lysate revealed a 33% interaction with the p46 protein when compared with Mitf set at 100%, suggesting that the basic domain of Mitf is indeed critical (directly or indirectly) for the interaction with Pax-6 (data not shown). That Pax-6, activated by the lack of interaction with *mi* mutant, is involved in the neuronal transdifferentiation of the RPE remains to be demonstrated. Several lines of evidence suggest a direct involvement of Pax-6 in neuronal differentiation of the retina. First, mice lacking Pax-6 function do not develop retina (12). In accordance with this finding, it has been shown that in zebrafish with an experimentally reduced number of Pax-6-expressing cells in the optic vesicle, retinal differentiation is restricted to cells that retain the Pax-6 protein (54). Pax-6 ectopic expression in cells nonspecified to generate neurons, both in invertebrates and vertebrates, is able to specify retinal identity (6, 10). Finally, introduction of the Pax-6 coding vector into the cultured RPE cells, in contrast to the empty control vector, induced expression of HuD into the culture (data not shown). HuD is an RNA-binding protein specifically expressed in neurons. Mis-expression of HuD in cultured neural crest

cells results in a dramatic increase in the proportion of cells exhibiting neuronal morphology, neuronal markers, and neurotrophin dependence (26). Thus, Pax-6 is able to induce expression of a neuronal marker into RPE cells. Pax-6 may therefore play a role in the *in vivo* neuronal transdifferentiation of RPE cells observed in the *mi* mutant, where an inhibitory interaction with Mitf is no longer possible.

Another Pax family member, Pax2, is expressed in the ventral optic vesicle, later being confined to the proximal region destined to contribute to the optic nerve. Pax2 null mutant mice show an extension of the RPE into the optic stalk and failure of the optic fissure to close (32). As for Pax-6, Mitf suppressed the Pax2 transactivating function (data not shown), suggesting that one function of Pax2 may be at least to restrict Mitf activity in the optic stalk area. Therefore, direct interaction of Pax family members with Mitf may be a general rule.

Acknowledgments—We thank Drs. R. Wintjens and E. Buisine from the NMR group (UMR 8525, Institut de Biologie de Lille) for help in designing the Pax-6 and Mitf mutations. We thank Neda Zahedi for comments on the manuscript.

REFERENCES

- Agata, K., Kobayashi, H., Itoh, Y., Mochii, M., Sawada, K., and Eguchi, G. (1993) *Development* **118**, 1025–1030
- Park, C. M., and Hollenberg, M. J. (1989) *Dev. Biol.* **134**, 201–205
- Pittack, C., Jones, M., and Reh, T. A. (1991) *Development* **113**, 577–588
- Okada, T. S. (1980) in *Current Topics in Developmental Biology* (Moscona, A. A., and Monroy, A., eds) pp. 349–380, Academic Press, New York
- Turque, N., Denhez, F., Martin, P., Planque, N., Bailly, M., Begue, A., Stehelin, D., and Saule, S. (1996) *EMBO J.* **15**, 3338–3350
- Chow, R. L., Altmann, C. R., Lang, A. R., and Hemmati-Brivanlou, A. (1999) *Development* **126**, 4213–4222
- Martin, P., Carriere, C., Dozier, C., Quatannens, B., Mirabel, M. A., Vandembunder, B., Stehelin, D., and Saule, S. (1992) *Oncogene* **7**, 1721–1728
- Carriere, C., Plaza, S., Caboche, J., Dozier, C., Bailly, M., Martin, P., and Saule, S. (1995) *Cell Growth Differ.* **6**, 1531–1540
- Carriere, C., Plaza, S., Martin, P., Quatannens, B., Bailly, M., Stehelin, D., and Saule, S. (1993) *Mol. Cell Biol.* **13**, 7257–7266
- Callaerts, P., Halder, G., and Gehring, W. J. (1997) *Annu. Rev. Neurosci.* **20**, 483–532
- Glaser, T., Walton, D., Cai, J., Epstein, J., Jepeal, L., and Maas, R. L. (1995) in *Molecular Genetics of Ocular Disease* (Wiggs, J., ed) pp. 55–81, Wiley, New York
- Hill, R. E., Favor, J., Hogan, B., Ton, C. C., Saunders, G., Hanson, I., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N. and Heyning, V. V. (1991) *Nature* **354**, 522–525
- Schedl, A., Ross, A., Lee, M., Engelkamp, D., Rashbass, P., van Heyning, V., and Hastie, N. D. (1996) *Cell* **86**, 71–82
- Hodgkinson, C. A., Moore, K. J., Nakayama, A., Steingrimsson, E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Arnheiter, H. (1993) *Cell* **74**, 395–404
- Tachibana, M., Perez-Jurado, L. A., Nakayama, A., Hodgkinson, C. A., Li, X., Schneider, M., Miki, T., Fex, J., Francke, U., and Arnheiter, H. (1994) *Hum. Mol. Genet.* **3**, 553–557
- Tassabehji, M., Newton, V. E., and Read, A. P. (1994) *Nat. Genet.* **8**, 251–255

17. Boissy, R. E., Boissy, Y. L., Krakowsky, J. M., Lamoreux, M. L., Lingrel, J. B., and Nordlund, J. J. (1993) *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **25**, 319–332
18. Nakayama, A., Nguyen, M. T., Chen, C. C., Opdecamp, K., Hodgkinson, C. A., and Arnheiter, H. (1998) *Mech. Dev.* **70**, 155–166
19. Bumsted, K., and Barnstable, C. J. (2000) *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**, 903–908
20. Mochii, M., Ono, T., Matsubara, Y., and Eguchi, G. (1998) *Dev. Biol.* (196), 145–159
21. Planque, N., Turque, N., Opdecamp, K., Bailly, M., Martin, P., and Saule, S. (1999) *Cell Growth Differ.* **10**, 525–536
22. Bentley, N. J., Eisen, T., and Goding, C. R. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7996–8006
23. Yasumoto, K., Yokoyama, K., Shibata, K., Tomita, Y., and Shibahara, S. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 8058–8070
24. Yavuzer, U., Keenan, E., Lowings, P., Vachtenheim, J., Currie, G., and Goding, C. R. (1995) *Oncogene* **10**, 123–134
25. Aksan, I., and Goding, C. R. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6930–6938
26. Wakamatsu, Y., and Weston, J. A. (1997) *Development* **124**, 3449–3460
27. Plaza, S., Langlois, M. C., Turque, N., LeCornet, S., Bailly, M., Begue, A., Quatannens, B., Dozier, C., and Saule, S. (1997) *Cell. Growth Differ.* **8**, 1115–1125
28. Ritz-Laser, B., Estreicher, A., Klages, N., Saule, S., and Philippe, J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 4124–4132
29. Mikkola, I., Bruun, J. A., Holm, T., and Johansen, T. (2000) *J. Biol. Chem.* **276**, 4109–4118
30. Hussain, M. A., and Habener, J. F. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 28950–28957
31. Cvekl, A., Kashanchi, F., Brady, J. N., and Piatigorsky, J. (1999) *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, 1343–1350
32. Torres, M., Gomez-Pardo, E., and Gruss, P. (1996) *Development* **122**, 3381–3391
33. Sato, S., Roberts, K., Gambino, G., Cook, A., Kouzarides, T., and Goding, C. R. (1997) *Oncogene* **14**, 3083–3092
34. Takebayashi, K., Chida, K., Tsukamoto, I., Morii, E., Munakata, H., Arnheiter, H., Kuroki, T., Kitamura, Y., and Nomura, S. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1203–1211
35. Lam, P. Y., Sublett, J. E., Hollenbach, A. D., and Roussel, M. F. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 594–601
36. Plaza, S., Dozier, C., and Saule, S. (1993) *Cell. Growth Differ.* **4**, 1041–1050
37. Bertolotto, C., Bille, K., Ortonne, J. P., and Ballotti, R. (1996) *J. Cell Biol.* **134**, 747–755
38. Klemppner, K.-H., Arnold, H., and Biedenapp, H. (1989) *Genes Dev.* **3**, 1582–1589
39. Fitzsimmons, D., Hodsdon, W., Wheat, W., Maira, S. M., Wasyluk, B., and Hagman, J. (1996) *Genes Dev.* **10**, 2198–2211
40. Xu, H. E., Rould, M. A., Xu, W., Epstein, J. A., Maas, R. L., and Pabo, C. O. (1999) *Genes Dev.* **13**, 1263–1275
41. Epstein, J., Cai, J., Glaser, T., Jepeal, L., and Maas, R. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 8355–8361
42. Hemesath, T. J., Steingrimsson, E., McGill, G., Hansen, M. J., Vaught, J., Hodgkinson, C. A., Arnheiter, H., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Fisher, D. E. (1994) *Genes Dev.* **8**, 2770–2780
43. Watanabe, A., Takeda, K., Ploplis, B., and Tachibana, M. (1998) *Nat. Genet.* **18**, 283–286
44. Potterf, S. B., Furumura, M., Dunn, K. J., Arnheiter, H., and Pavan, W. J. (2000) *Hum. Genet.* **107**, 1–6
45. Epstein, J. A., Glaser, T., Cai, J., Jepeal, L., Walton, D. S., and Maas, R. L. (1994) *Genes Dev.* **8**, 2022–2034
46. Goulding, M. D., Chalepakis, G., Deutsch, U., Erselius, J. R., and Gruss, P. (1991) *EMBO J.* **10**, 1135–1147
47. Singh, S., Stellrecht, C. M., Tang, H. K., and Saunders, G. F. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 17306–17313
48. Singh, S., Chao, L. Y., Mishra, R., Davies, J., and Saunders, G. F. (2001) *Hum. Mol. Genet.* **10**, 911–918
49. Roberts, E. C., Deed, R. W., Inoue, T., Norton, J. D., and Sharrocks, A. D. (2001) *Mol. Cell. Biol.* **15**, 524–533
50. Knoepfler, P. S., Bergstrom, D. A., Uetsuki, T., Dac-Korytko, I., Sun, Y. H., Wright, W. E., Tapscott, S. J., and Kamps, M. P. (1999) *Nucleic Acids Res.* **27**, 3752–3761
51. Poulin, G., Lebel, M., Chamberland, M., Paradis, F. W., and Drouin, J. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4826–4837
52. Ohneda, K., Mirmira, R. G., Wang, J., Johnson, J. D., and German, M. S. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 900–911
53. Nguyen, M., and Arnheiter, H. (2000) *Development* **127**, 3581–3591
54. Macdonald, R., Barth, K. A., Xu, Q., Holder, N., Mikkola, I., and Wilson, S. W. (1995) *Development* **121**, 3267–3278

RESUME :

La CLIP-170 (Cytoplasmic Linker Protein of 170 kDa) est requise, *in vitro*, pour l'établissement d'un lien statique entre les endosomes et les microtubules (MTs). Elle se localise, *in vivo*, aux bouts « plus » des MTs polymérisant et semble participer ainsi à la capture de ces derniers au cortex cellulaire et aux kinétochores. Elle contribue au contrôle de la dynamique des MTs et semble aussi recruter le complexe moteur dynéine/dynactine sur les extrémités « plus » des MTs, *via* son domaine C-terminal. La CLIP-170 s'associe également aux kinétochores d'une façon dépendante du complexe dynéine/dynactine et de son domaine C-terminal. Ce domaine C-terminal contient deux motifs de type « doigt de zinc » (proximal et distal) probablement impliqués dans des interactions avec d'autres protéines.

Nous rapportons ici la démonstration d'une interaction directe entre la CLIP-170 et LIS1, une protéine capable, par ailleurs, d'interagir directement avec le complexe dynéine/dynactine. LIS1 est mutée chez de nombreux patients atteints d'une lissencéphalie de type I et semble jouer le rôle de co-facteur activateur de la dynéine cytoplasmique. Nous avons montré que cette interaction dépend du doigt de zinc distal de la CLIP-170 et nous avons apporté des éléments indiquant une possible régulation de cette interaction par phosphorylation.

L'étude des fonctions cellulaires potentielles de cette interaction nous a permis de mettre en évidence un enrichissement de LIS1 aux extrémités « plus » des MTs. Elle a fourni des éléments substantiels laissant supposer que cette localisation, comme celle de la dynactine au même endroit, est dépendante du domaine C-terminal de la CLIP-170. Par ailleurs, nous avons démontré que la localisation de la CLIP-170 sur le kinétochore dépend de son domaine d'interaction avec LIS1, et que le recrutement de LIS1 au même site dépend du complexe dynéine/dynactine. L'ensemble de ces données suggère que LIS1 constitue un adaptateur entre la CLIP-170 et le complexe moteur dynéine/dynactine.

Parallèlement, nous avons entamé l'étude de protéines LIS1 qui présentent chacune une mutation ponctuelle dans diverses régions conservées. Ces mutations ponctuelles ont été découvertes chez des patients atteints d'une lissencéphalie de type I plus ou moins sévère. Par des approches biochimiques, moléculaires et cellulaires, nous avons montré que, selon la sévérité de la maladie, les différentes propriétés de LIS1 (repliement, stabilité, localisations sub-cellulaires, interaction avec ses partenaires et liaison aux MTs) sont plus ou moins affectées. A l'occasion de cette étude, nous avons également identifié les domaines de LIS1 impliqués dans l'interaction avec les MTs et avec d'autres partenaires comme les sous-unités catalytiques du PAFAH(I) (Platelet-Activating Factor Acétylhydrolase).

DISCIPLINE : Biologie Moléculaire de la Cellule

MOTS-CLES : CLIP-170, LIS1, dynéine cytoplasmique, dynactine, microtubules, kinétochores, sites corticaux, mitose, lissencéphalie

LABORATOIRE : Institut Curie – Section de Recherche ; UMR 146 du CNRS
Centre Universitaire d'Orsay, 91405 ORSAY CEDEX