

Sujet n°1

**Biologie**  
**Epreuve de culture scientifique**

Le chimiotactisme, ou la migration orientée de cellules en réponse à des signaux chimiques externes, est essentiel à une multitude de processus biologiques chez des organismes variés. L'amibe *Dictyostelium discoideum* est reconnue comme un système modèle pour l'étude du chimiotactisme chez les eucaryotes et a contribué à notre compréhension actuelle de ce processus complexe.

Dans la décennie qui a suivi sa découverte par Sutherland et Rall (1958), l'adénosine 3'-5' monophosphate cyclique (AMPc) s'est avérée être la molécule chimioattractive responsable de l'agrégation chez *D. discoideum*. Au milieu des années 1970, il a été démontré que les cellules de *D. discoideum* en cours d'agrégation expriment à leur surface des récepteurs à l'AMPc. Depuis les années 1980, des études approfondies se sont focalisées sur l'identification des protéines impliquées dans les réponses chimiotactiques grâce à des approches de biologie moléculaire, de biochimie et de génétique. La première avancée fut de découvrir que les récepteurs à l'AMPc de *D. discoideum* appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs). Par la suite, de nombreux composants du chimiotactisme ont été découverts, offrant un cadre pratique pour comprendre le réseau moléculaire qui sous-tend le chimiotactisme. Plus récemment, l'étude de protéines fluorescentes a révélé la nature dynamique de ce réseau dans les cellules vivantes.

Afin de localiser les sous-unités  $\beta\gamma$  de la protéine G dans des cellules vivantes au cours du processus chimiotactique, la GFP (green fluorescent protein) est fusionnée à l'extrémité N-terminale de l'unique sous-unité  $G\beta$  présente chez *D. discoideum*. La sous-unité  $G\beta$  étiquetée GFP (GFP- $G\beta$ ) est exprimée de façon stable dans des mutants de *D. discoideum* qui n'expriment pas naturellement la sous-unité  $G\beta$  (cellules  $g\beta^-$ ) [Figure 1] et la distribution de GFP- $G\beta$  est comparée à celle du récepteur à l'AMPc, cAR1, lui-même fusionné à la GFP (cAR1-GFP) [Figure 2].

**1 – Quelle est l'organisation d'ensemble d'un RCPG ?**

*Expliquez comment un signal extracellulaire reçu par un RCPG est transduit à une protéine effectrice via une protéine G hétérotrimérique en décrivant avec précision le cycle de la protéine G.*

**2 – Expliquez comment la protéine de fusion GFP- $G\beta$  peut être construite.**

*Suggérez des expériences permettant d'estimer le niveau d'expression de GFP- $G\beta$  dans les cellules  $g\beta^-$ . Commentez les diverses fonctions de la protéine de fusion GFP- $G\beta$  après interprétation minutieuse des résultats présentés Figure 1.*

**3 – Quels contrôles préliminaires doivent être effectués sur les cellules *car1* ?**

*Qu'est-il possible de conclure quant à la distribution de GFP- $G\beta$  et cAR1-GFP dans les cellules chimiotactiques ?*

Le transfert d'énergie de fluorescence (FRET) est utilisé pour étudier l'activation de la protéine G. Dans ce but, les sous-unités  $G\alpha_2$  et  $G\beta$  sont d'abord étiquetées, avant que les activités des protéines de fusion ne soient évaluées par sauvetage phénotypique de cellules qui n'expriment pas  $G\alpha_2$  et  $G\beta$  [Figure 3]. Par la suite, la fluorescence des cellules transformées est étudiée, tout comme les conséquences de leur stimulation par l'AMPc et certains de ses analogues [Figure 4].

**4 – Pourquoi est-il possible de détecter  $G\alpha_2$ -CFP and  $G\beta$ -YFP à l'aide d'antisérums anti-GFP ?**

*D'après vos connaissances, suggérez une voie par laquelle la molécule chimioattractive AMPc peut déclencher la polymérisation d'actine.*

**5 – Expliquez le phénomène de FRET.**

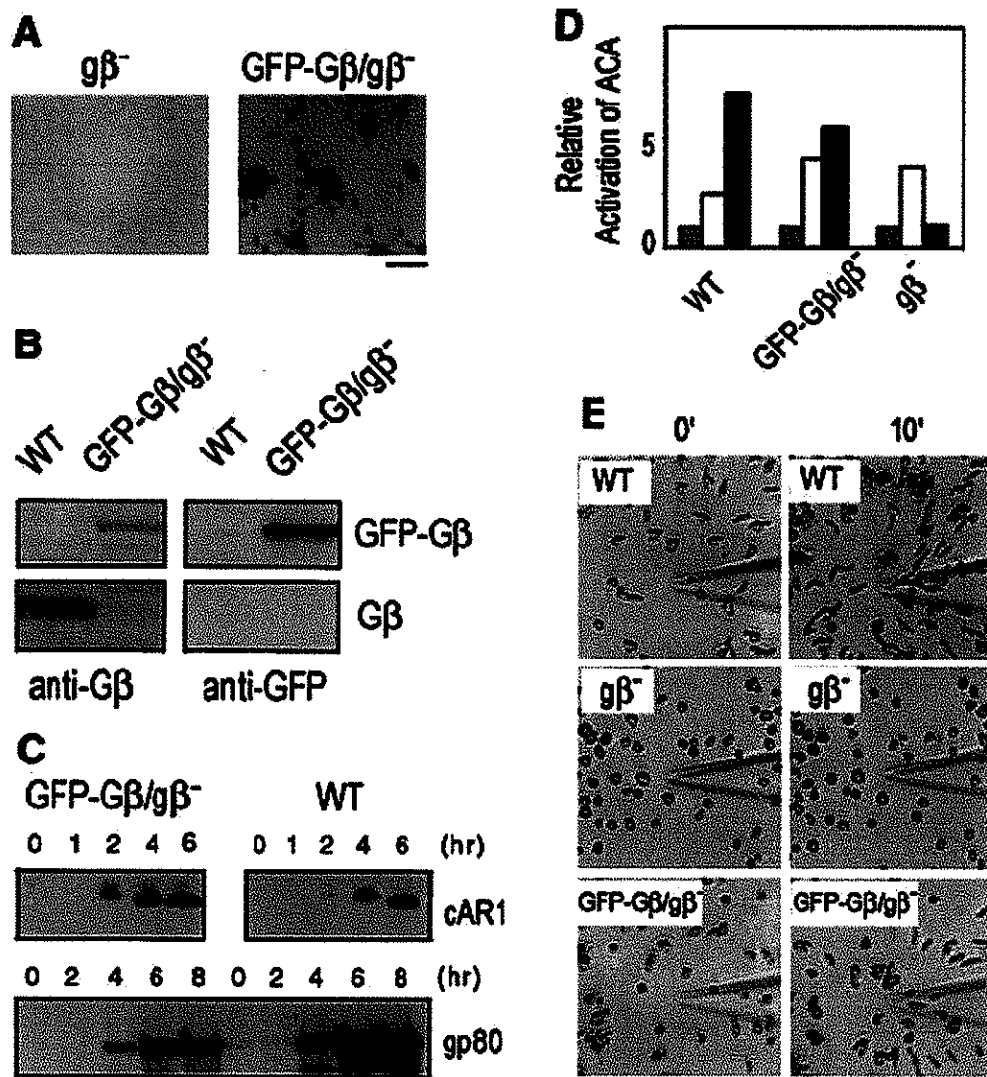
*Que permet de démontrer cette technique dans le contexte de la signalisation via les protéines G ? Commentez en particulier les résultats présentés Figure 4A & B. Suggérez d'autres applications possibles de cette technique.*

**6 – Qu'est-il possible de conclure de la Figure 4C ?**

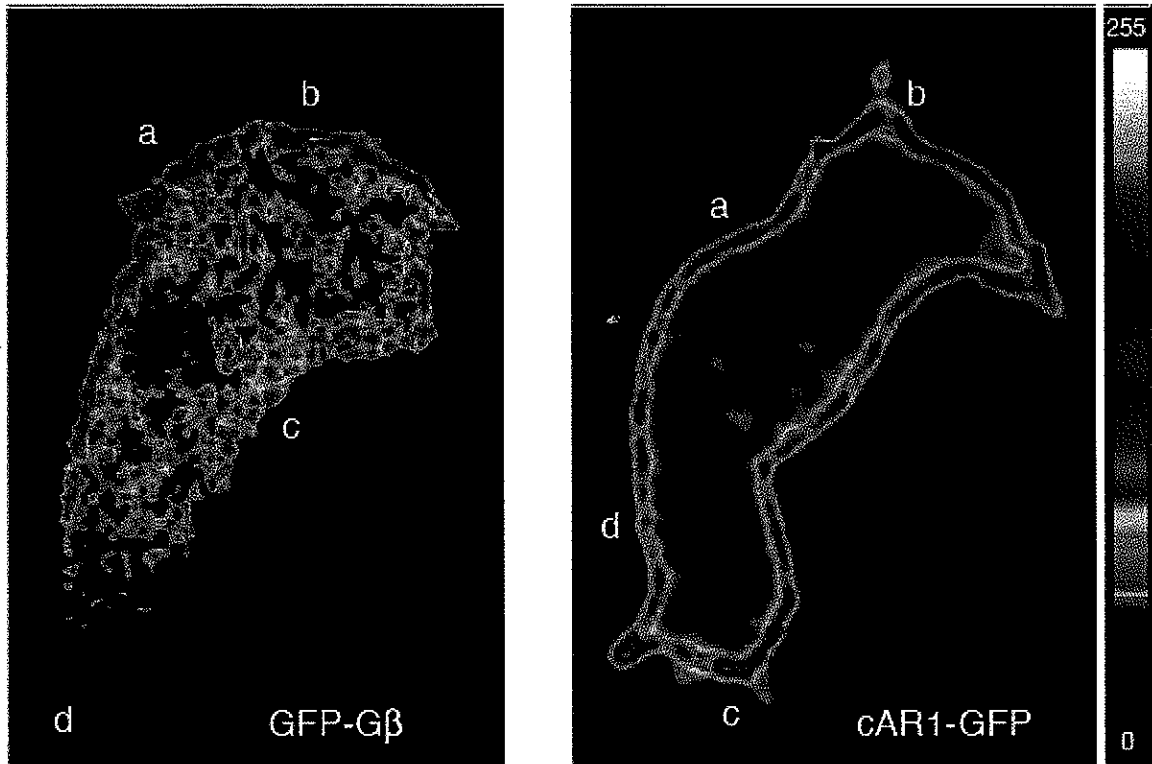
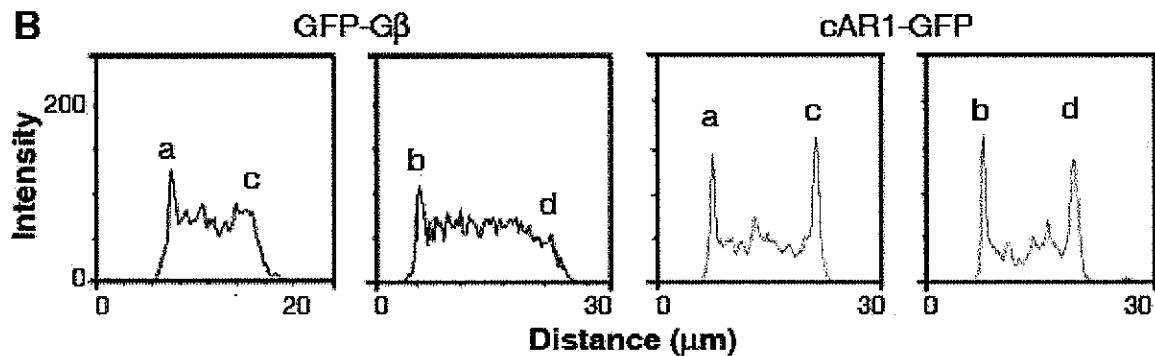
*Quantifiez la réponse à l'AMPc et à ses analogues en estimant leurs  $CE_{50}$ s. Discutez du niveau d'activation de la protéine G par rapport à l'occupation du récepteur connaissant leurs affinités pour cAR1 :  $K_D \approx 180$  nM (cAMP),  $1 \mu\text{M}$  ( $2'$ -dcAMP) et  $32 \mu\text{M}$  (8-Br-cAMP).*

**7. – Commentez les résultats présentés Figure 4E. Comment est-il possible d'expliquer l'augmentation graduelle de la fluorescence FRET après 18 min d'exposition à l'AMPc ?**

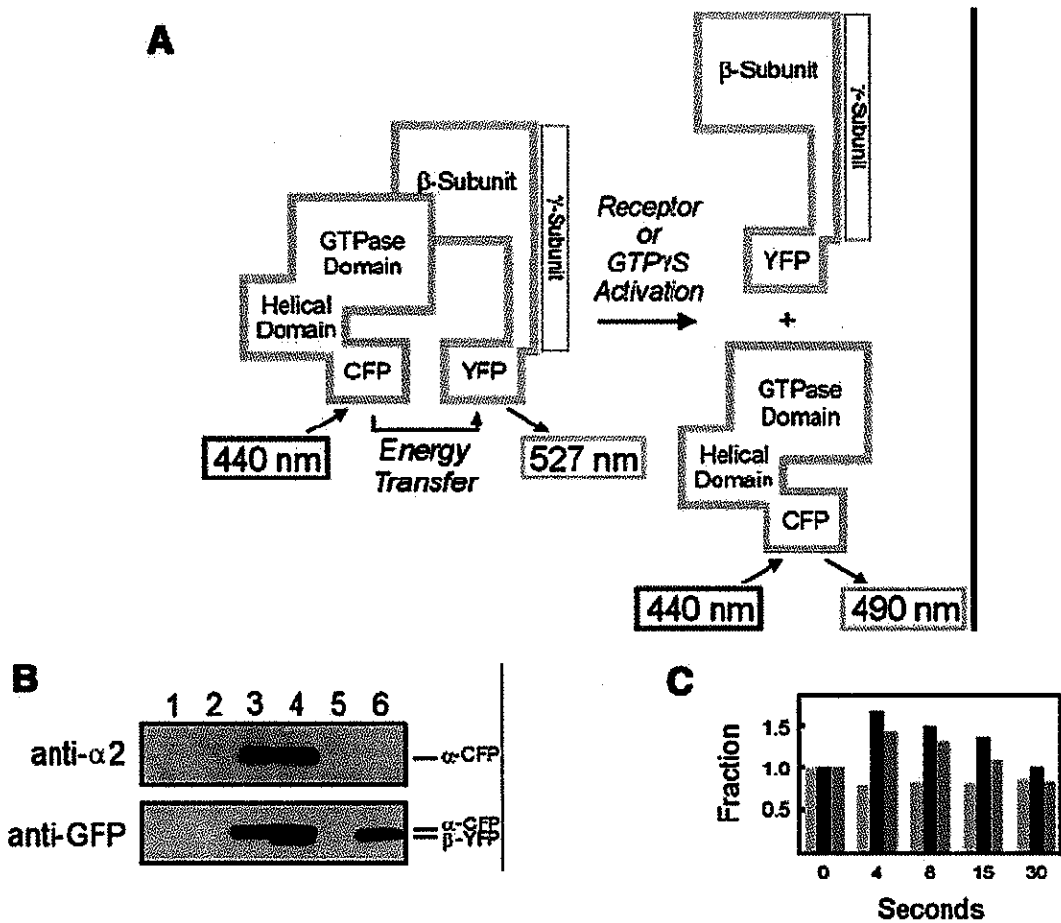
*D'après les résultats présentés Figure 4E & F, suggérez-vous l'existence d'un mécanisme d'« adaptation » au niveau de la protéine G ? Justifiez votre réponse. L'« adaptation » peut être définie comme un processus par lequel les réponses cellulaires se terminent spontanément après quelques minutes de stimulation soutenue.*



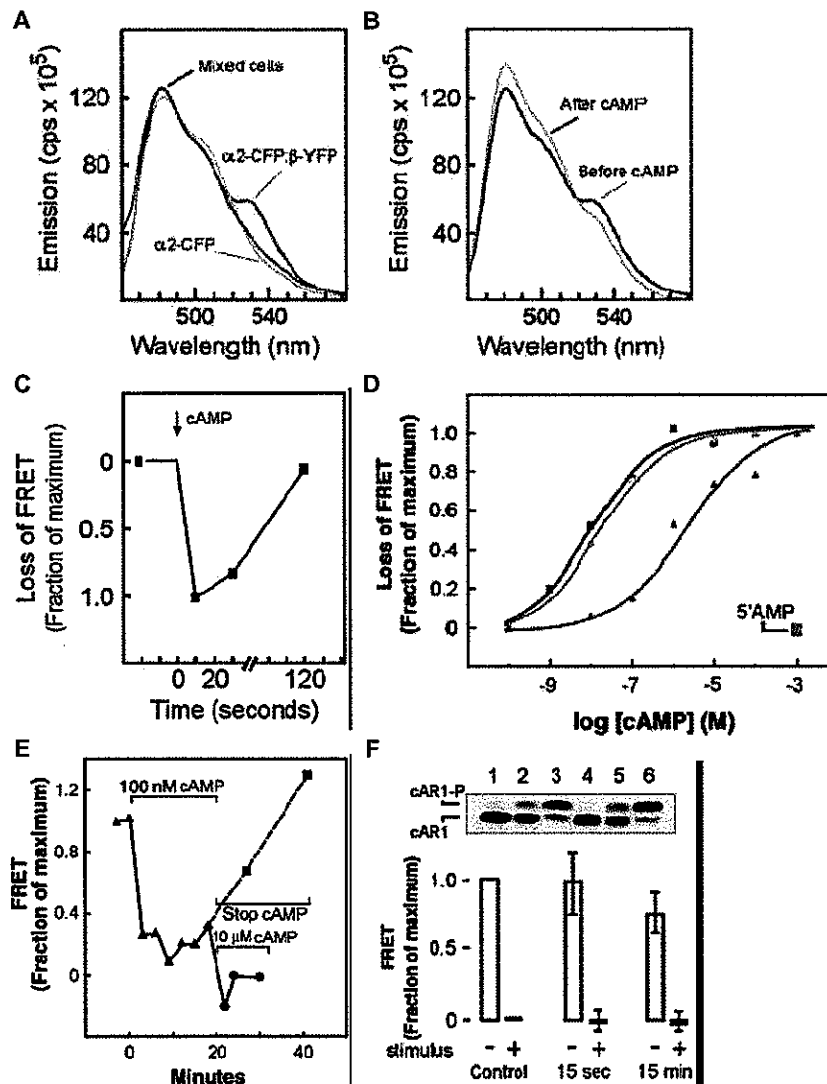
**Figure 1** – Fonctions de la protéine de fusion GFP-G $\beta$ . **(A)** Phénotype des cellules GFP-G $\beta/g\beta^-$ . Les cellules sont récoltées à partir de cultures agitées, lavées et étalées sur agar non nutritif. Les clichés sont pris 36h après étalement. Barre d'échelle : 2 mm. **(B)** Expression des protéines GFP-G $\beta$ . Des lysats de cellules sauvages (WT) et GFP-G $\beta/g\beta^-$  sont analysés par immunoblot à l'aide d'un anticorps dirigé contre G $\beta$  (anti-G $\beta$ ) et d'un anticorps dirigé contre GFP (anti-GFP). **(C)** Expression de « gènes d'agrégation » dans les cellules GFP-G $\beta/g\beta^-$ . Des cellules GFP-G $\beta/g\beta^-$  et sauvages sont stimulées avec 100 nM AMPc pendant 6 heures toutes les 6 minutes. Des échantillons sont prélevés aux temps d'incubation indiqués et les lysats sont analysés par immunoblot pour mettre en évidence le récepteur à l'AMPc, cAR1, et la protéine d'adhérence, gp80. **(D)** Activité de l'adénylate cyclase (ACA). L'activité de l'adénylate cyclase de lysats de cellules sauvages, de cellules GFP-G $\beta/g\beta^-$  et de cellules  $g\beta^-$  est mesurée dans du tampon (barres grises), en présence  $Mn^{2+}$ , pour une mesure de l'activité intrinsèque non régulée de l'enzyme (barres blanches) et en présence de GTP- $\gamma$ -S (barres noires). **(E)** Chimiotactisme des cellules GFP-G $\beta/g\beta^-$ . Des cellules sont autorisées à se différencier jusqu'à l'étape d'agrégation par stimulation avec de l'AMPc pendant 7 heures. Ces cellules sont lavées, placées sur des lamelles de verre et leur réponse chimiotactique à l'AMPc est étudiée par un « test micropipette ». A t=0, une micropipette remplie avec 1  $\mu$ M AMPc est appliquée à la surface de la lamelle. Les positions des cellules aux temps 0 et 10 min sont présentées. Largeur des champs : 150  $\mu$ m.

**A****B**

**Figure 2** – Quantification de la distribution cellulaire des protéines GFP-G $\beta$  et cAR1-GFP dans des cellules chimiotactiques. **(A)** Images confocales de GFP-G $\beta$  et cAR1-GFP dans des cellules chimiotactiques. Une cellule GFP-G $\beta$ /g $\beta^-$  et une cellule cAR1-GFP/car1 $^-$  se déplacent par chimiotactisme vers le milieu supérieur des cadres. La distribution des protéines GFP-G $\beta$  et cAR1-GFP est présentée sous la forme de l'intensité de leur fluorescence. La barre de couleurs figure de façon arbitraire l'intensité de fluorescence. a, b, c et d représentent des points de la surface cellulaire. **(B)** Analyses quantitatives de la distribution de GFP-G $\beta$  et cAR1-GFP. Les intensités de fluorescence sont mesurées le long des segments a - c et b - d et représentées en fonction de la distance.



**Figure 3** – Interaction fonctionnelle de  $G\beta$ -YFP et  $G\alpha 2$ -CFP dans des cellules vivantes. **(A)** CFP est insérée dans le domaine hélicoïdal de  $G\alpha 2$ , alors que YFP est fusionnée à l'extrémité N-terminale de  $G\beta$ . Les protéines fluorescentes cyan et jaune, appelées respectivement CFP et YFP, sont des variantes de la GFP. **(B)** Les lysats de cellules  $g\alpha 2^-$  (piste 1), sauvages (piste 2),  $G\alpha 2$ -CFP/ $g\alpha 2^-$  (piste 3),  $\alpha 2$ -CFP: $\beta$ -YFP (piste 4),  $g\beta^-$  (piste 5) et  $G\beta$ -YFP/ $g\beta^-$  (piste 6) sont analysés par immunoblot à l'aide d'antisérums dirigés contre  $G\alpha 2$  (anti- $\alpha 2$ ) et contre GFP (anti-GFP). **(C)** Essais in vivo de polymérisation de l'actine de cellules  $g\alpha 2^-$  (bleu clair), sauvages (bleu foncé) et  $\alpha 2$ -CFP: $\beta$ -YFP (vert). Les cellules sont stimulées avec 100 nM AMPc à  $t = 0$  et fixées aux temps indiqués.



**Figure 4** – Spectres de fluorescence de différentes lignées cellulaires. **(A)** Des cellules Ga<sub>2</sub>-CFP/ga<sub>2</sub><sup>-</sup> (bleu clair), des cellules α<sub>2</sub>-CFP:β-YFP (bleu foncé) et un mélange d'un nombre équivalent de cellules Ga<sub>2</sub>-CFP/ga<sub>2</sub><sup>-</sup> et Gβ-YFP/gβ<sup>-</sup> (vert) sont excitées à 440 nm et leurs spectres d'émission sont enregistrés entre 460 et 580 nm. **(B)** Spectres d'émission de cellules α<sub>2</sub>-CFP:β-YFP avant (bleu foncé) et après (bleu clair) traitement par 100 µM AMPc. **(C)** Cinétique d'évolution de la fluorescence FRET après addition de 100 µM AMPc à des cellules α<sub>2</sub>-CFP:β-YFP. **(D)** Des cellules α<sub>2</sub>-CFP:β-YFP sont traitées avec des concentrations croissantes d'AMPc (bleu foncé), de 2'-dcAMP (bleu clair) et de 8-Br-cAMP (vert) et avec du 5'-AMP (orange). Le 5'-AMP ne se lie pas au récepteur à l'AMPc, cAR1. **(E)** Des cellules α<sub>2</sub>-CFP:β-YFP sont traitées avec 3 mM caféine, sont maintenues à 100 nM AMPc par addition d'AMPc supplémentaire toutes les minutes pendant 18 minutes et sont ensuite divisées en deux lots. Un lot ne reçoit plus d'AMPc, alors que l'autre reçoit jusqu'à 10 µM AMPc. La caféine inhibe la phosphodiésterase spécifique qui convertit l'AMPc en 5'-AMP. **(F)** Des lots identiques de cellules α<sub>2</sub>-CFP:β-YFP reçoivent du tampon (contrôle), un ajout de 100 µM AMPc pendant 15s (15 sec) ou 15 ajouts, un par minute (15 min). Tous les lots sont ensuite lavés à 0°. Les barres figurent la fraction (± écart-type) de fluorescence FRET avant (-) et après (+) une deuxième stimulation par AMPc (10 µM). Des immunoblots présentent la distribution du doublet cAR1 entre ses formes moins mobile (non phosphorylée) et plus mobile (phosphorylée). La phosphorylation de cAR1 diminue son affinité pour AMPc. Les immunoblots de cAR1 dans des échantillons prélevés après lavage et avant restimulation présentent le contrôle (pistes 1 et 4), le traitement 15s (pistes 2 et 5) et le traitement 15 min (pistes 3 et 6).

## Sélection Internationale Sujet de Biologie 2

**Les questions sont indiquées en gras.**

(Sujet réalisé à partir de : Marc *et al.* (2002) *EMBO reports* **3**, 159-164 ; Sylvestre *et al.* (2003) *Mol. Biol. Cell* **14**, 3848-3856 ; Garcia *et al.* (2007) *Mol. Biol. Cell* **18**, 362-368).

Les protéines présentes dans la mitochondrie sont, soit codées par le génome mitochondrial et synthétisées à l'intérieur de la mitochondrie, soit, pour la majorité d'entre elles, codées par le génome nucléaire. Dans cette dernière catégorie, les gènes peuvent être d'origine procaryotique et avoir été, depuis la symbiose qui a donné naissance aux mitochondries, transférés au noyau, ou bien être d'origine eucaryotique. Dans les deux cas, les ARN messagers sont traduits dans le cytosol, et les protéines importées dans la mitochondrie.

Il a été montré récemment que certains des ARN messagers synthétisés dans le noyau et codant pour des protéines mitochondriales étaient associés aux mitochondries. L'ensemble des expériences décrites ci-dessous vise à préciser la nature des ARN ainsi localisés à la mitochondrie, et les mécanismes de cette localisation.

**Que connaissez-vous des mécanismes d'adressage des protéines aux différents compartiments cellulaires ? Quels sont les signaux qui permettent l'adressage à la mitochondrie ? Rappeler la structure d'une mitochondrie, et les mécanismes par lesquels les protéines entrent dans la mitochondrie.**

La Figure 1 décrit le protocole expérimental permettant de caractériser les ARN messagers qui sont associés à la mitochondrie. **Expliquez rapidement le principe de l'expérience.** Les cellules représentées sur la Figure sont des levures – yeast en anglais.

Les ARN ainsi isolés peuvent être aussi caractérisés par Northern blot, et les résultats d'une telle expérience sont représentés sur la Figure 2. On distingue les polysomes associés aux mitochondries (M-P) et les polysomes non associés (F-P). Tous les ARN testés codent pour des protéines mitochondriales. **Quelles conclusions tirez-vous de cette expérience ?**

Les auteurs ont estimé quantitativement pour chaque ARN la fraction qui est associée aux mitochondries. Ils ont déterminé qu'en dessous de 8%, l'association peut être considérée comme non-spécifique. **Quelles expériences ont permis de fixer cette valeur limite ?**

107 ARN messagers, codant pour les protéines de différents complexes mitochondriaux ont été analysés par RT-PCR. Une quarantaine se sont révélés associés aux mitochondries. Tous ont une origine procaryotique. **Quelle conclusion en tirez-vous ?**

Il est aussi possible (**dites comment**) de localiser directement les mitochondries et les ARN messagers dans une cellule, et de déterminer visuellement ceux des ARN messagers qui sont associés à la mitochondrie. Cette nouvelle approche a confirmé les résultats précédents.

La Figure 3 montre les résultats obtenus par RT-PCR avec des cellules humaines et des cellules de levures (ATP : sous-unités de l'ATPase membranaire ; ACT1 : actine ; OXA et COX : complexes d'oxydation). **Commentez, et éventuellement critiquez ces résultats.**

Des levures, dans lesquelles le gène *oxa1*, codant pour une des sous-unités de la cytochrome oxydase, a été délété ( $\Delta oxa1$ ) ont été transformées avec le gène homologue humain *Hoxa1* entier (forme dite longue, HOXA11), ou une forme tronquée dans le domaine N-terminal (HOXA1s), et la croissance des levures testée sur glycérol et glucose. **Commentez les résultats présentés dans la Figure 4. Expliquez pourquoi le mutant  $\Delta oxa1$  ne pousse pas sur glycérol contrairement au sauvage (On rappelle que le glycérol peut être utilisé par la levure comme source de carbone, et sera d'abord phosphorylé et oxydé).**

Le système expérimental ainsi mis au point a permis de tester le rôle de différents domaines de l'ARN messager HOXA1 dans l'attachement à la mitochondrie. A correspond à la forme longue dans laquelle la partie 3' non traduite de l'ARN messager a été délétée, et B la forme courte délétée de ces mêmes séquences. Les levures  $\Delta OXA1$  sont transformées avec les différentes constructions, et leur croissance testée (Figure 5 ; WT : type sauvage).

**Où semblent situés les signaux responsables de la localisation préférentielle des ARN messagers à la mitochondrie ? Quelles sont les autres interprétations possibles de ces expériences ? Quelles expériences complémentaires seraient nécessaires pour choisir entre ces différentes hypothèses ?**

**Quel(s) mécanisme(s) proposeriez-vous pour rendre compte de cette localisation préférentielle ? Comment démontrer l'existence de tels mécanismes ? Si les ARN messagers de certaines protéines importées dans la mitochondrie sont traduits en protéines à sa surface, quelle relation peut-on imaginer entre la synthèse des protéines et leur importation ? Quelles expériences pourraient être faites pour tester cette hypothèse ?**



Figure 1

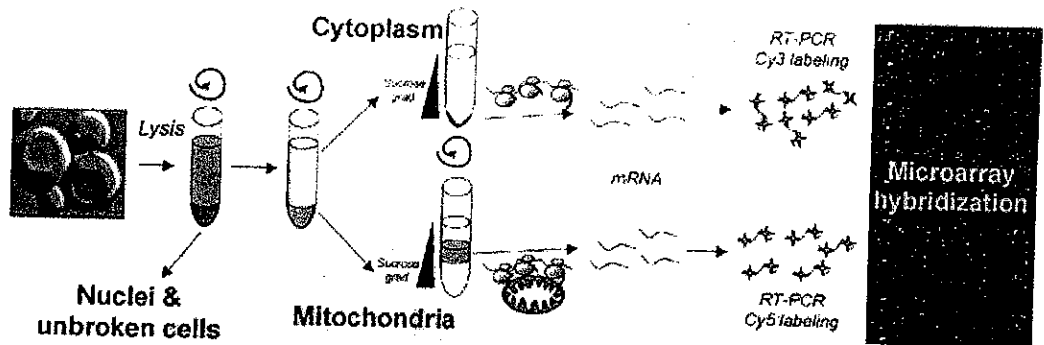


Figure 2

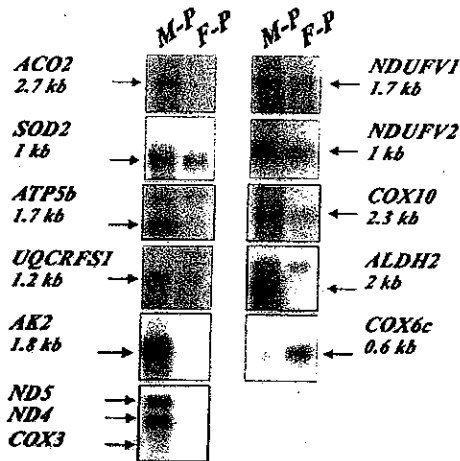
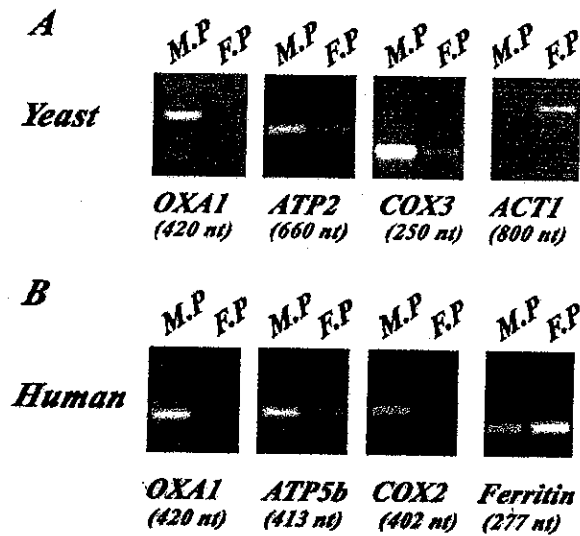
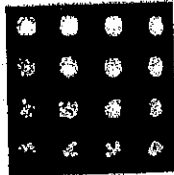


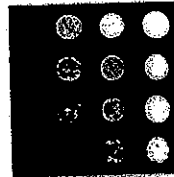
Figure 3



*ΔoxAI*  
*HOXAII*  
*HOXAIs*  
*WT*



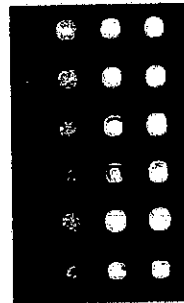
*Glucose*



*Glycerol*

Figure 4

*Glucose*



*Glycerol*



*ΔoxAI*  
*WT*  
*A*  
*H OXAI*  
*B*  
*HOXAs*

Figure 5

Test n° 1

**Biology**  
**Scientific culture assessment**

Chemotaxis, or the directed migration of cells in response to external chemical cues, is essential for a multitude of biological processes in a diverse array of organisms. The free-living soil amoeba *Dictyostelium discoideum* has been established as a key model system for the study of eukaryotic chemotaxis and as such has contributed to the current understanding of this complex process.

Within a decade of its discovery by Sutherland and Rall (1958), cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate (cAMP) was found to be the chemoattractant responsible for aggregation of *D. discoideum*. By the mid 1970s, it was established that aggregating *D. discoideum* cells express cell-surface receptors for cAMP. Since the 1980s, extensive studies have been focused on identification of proteins that are involved in chemotactic responses using molecular biology, biochemistry and genetic approaches. The first breakthrough was the discovery that cAMP receptors in *D. discoideum* belong to the family of G-protein-coupled receptors (GPCRs). Subsequently, many molecular components involved in chemotaxis have been identified, providing a practical framework for understanding the molecular network underlying chemotaxis. More recently, studies of fluorescent proteins have revealed the dynamic nature of this network in living cells.

In order to localize the G-protein  $\beta\gamma$ -subunits in living cells during chemotaxis the green fluorescent protein (GFP) is fused to the  $\text{NH}_2$ -terminus of the unique  $\text{G}\beta$  subunit of *D. discoideum*. The GFP-tagged  $\text{G}\beta$  (GFP- $\text{G}\beta$ ) subunit is stably expressed in *D. discoideum* mutants that do not naturally express the  $\text{G}\beta$  subunit ( $\text{g}\beta^-$  cells) [Figure 1] and the distribution of GFP- $\text{G}\beta$  is compared to that of the chemoattractant receptor for cAMP, cAR1, also fused to GFP (cAR1-GFP) [Figure 2].

**1 – What is the general structure of GPCRs ?**

**Explain how a GPCR extracellular signal is transduced to an effector protein via a heterotrimeric G-protein by describing the G-protein heterotrimer cycle precisely.**

**2 – Explain how a GFP- $\text{G}\beta$  fusion protein can be constructed.**

**Suggest experiments to estimate the level of expression of GFP- $\text{G}\beta$  in  $\text{g}\beta^-$  cells.**

**Comment on the various functions of the GFP- $\text{G}\beta$  fusion protein by careful interpretation of the results presented in Figure 1.**

**3 - What kind of preliminary controls have to be made on *car1* cells ?**

**What can be concluded as to the distribution of GFP- $\text{G}\beta$  and cAR1-GFP in chemotaxing cells ?**

Fluorescence resonance energy transfer (FRET) is used to study the G-protein activation. For that purpose the  $\text{G}\alpha_2$  and  $\text{G}\beta$  subunits are first tagged, before the activities of the fusion proteins are assessed by phenotypic rescue of mutant cells that do not express  $\text{G}\alpha_2$  and  $\text{G}\beta$  [Figure 3]. Subsequently, the fluorescence of the transformed cell lines is studied and the consequences of stimulation by cAMP and some of its analogs are investigated [Figure 4].

**4 – Why is it possible to detect  $\text{G}\alpha_2$ -CFP and  $\text{G}\beta$ -YFP using antisera against GFP ?**

**According to your knowledge, suggest a pathway by which the chemoattractant cAMP can trigger actin polymerization.**

**5 – Explain the FRET phenomenon.**

**What can be demonstrated with this technique in the context of G-protein signalling. In particular, comment on the results presented in Figure 4A & B.**

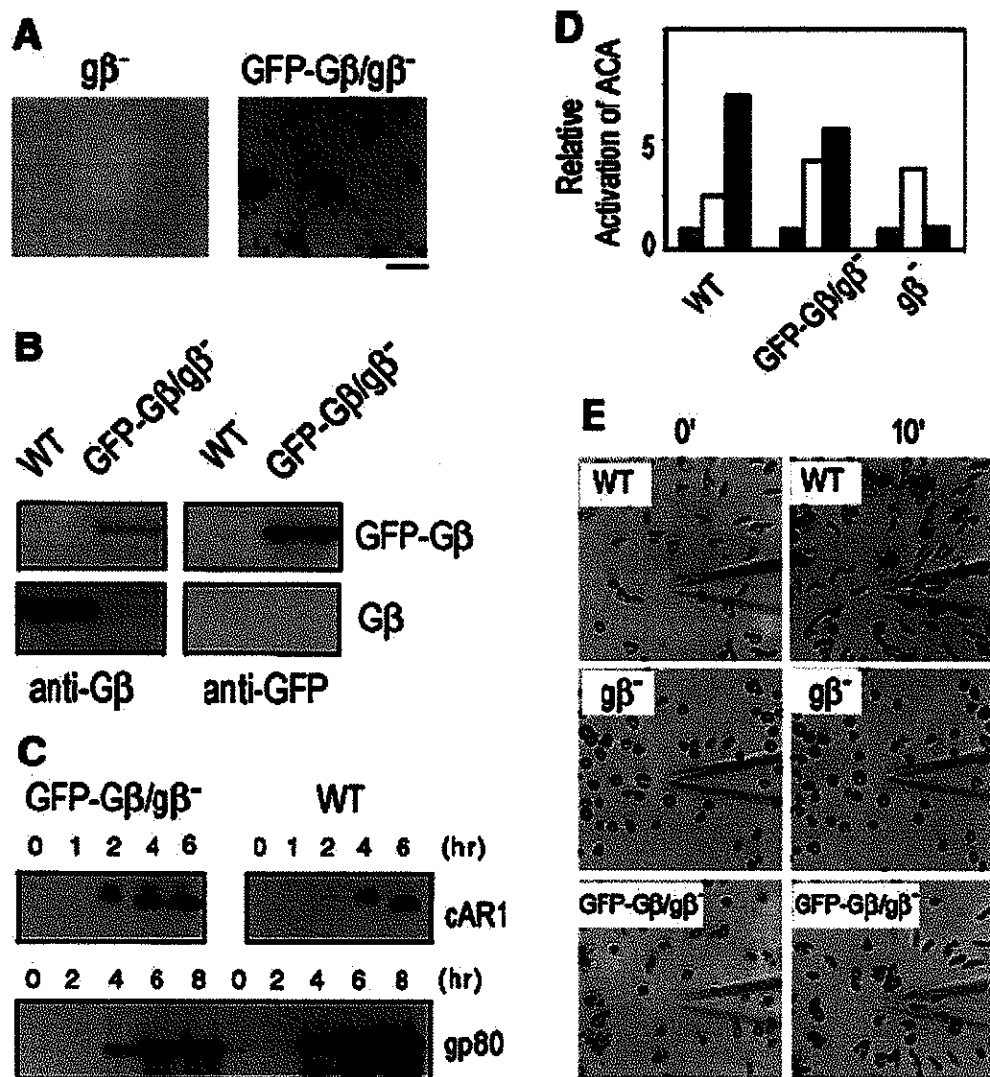
**Suggest other possible applications of this technique.**

**6 – What can be concluded from Figure 4C ?**

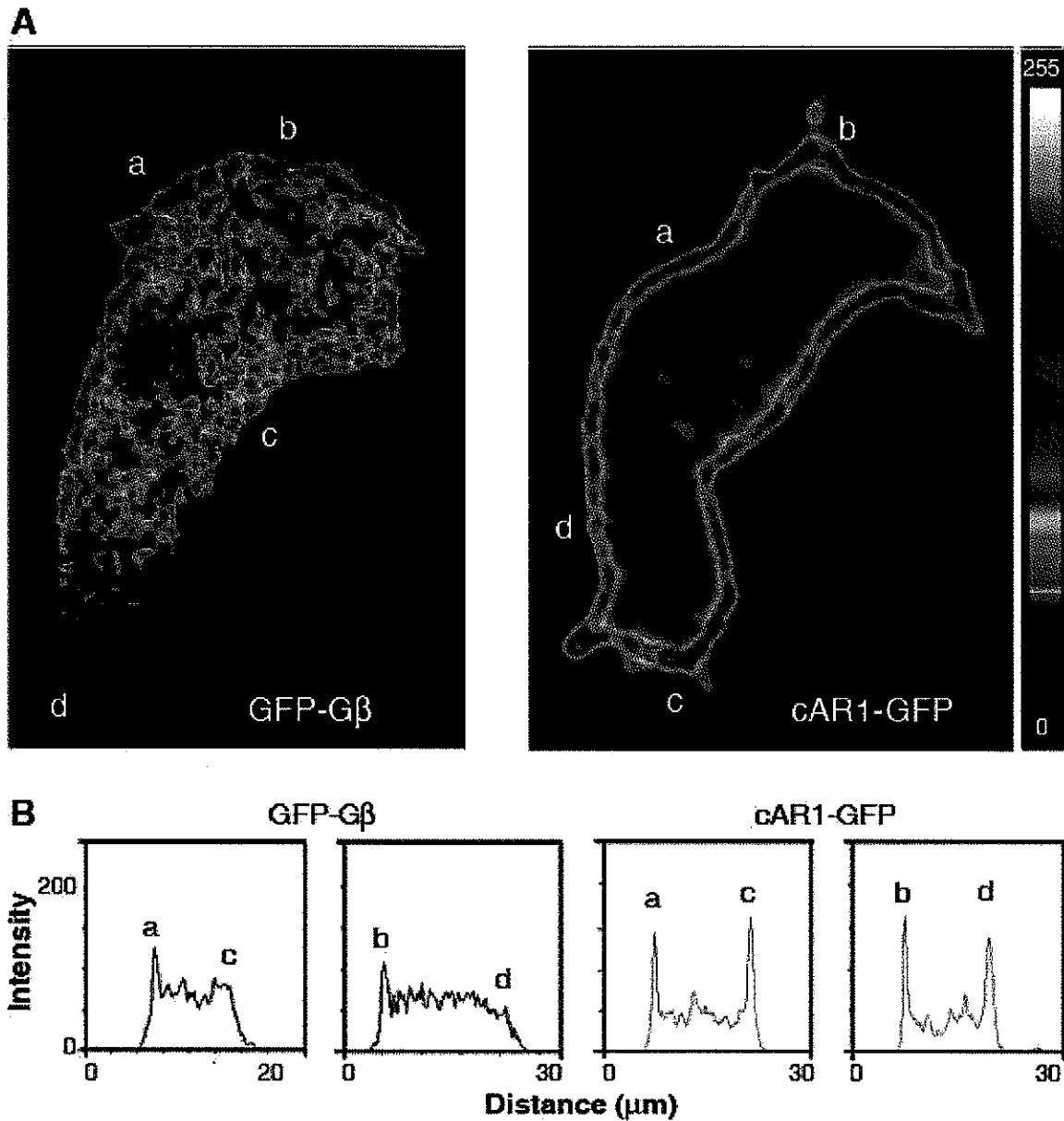
**Quantitate the response for cAMP and its analogs by estimating their  $\text{EC}_{50}$ s. Discuss the level of G-protein activation in relation to receptor occupation knowing their reported affinities for cAR1 :  $K_D \approx 180 \text{ nM}$  (cAMP),  $1 \mu\text{M}$  (2'-dcAMP) and  $32 \mu\text{M}$  (8-Br-cAMP).**

**7 – Comment on the results presented in Figure 4E. How can the gradual increase in FRET fluorescence after 18 min exposition to cAMP be explained?**

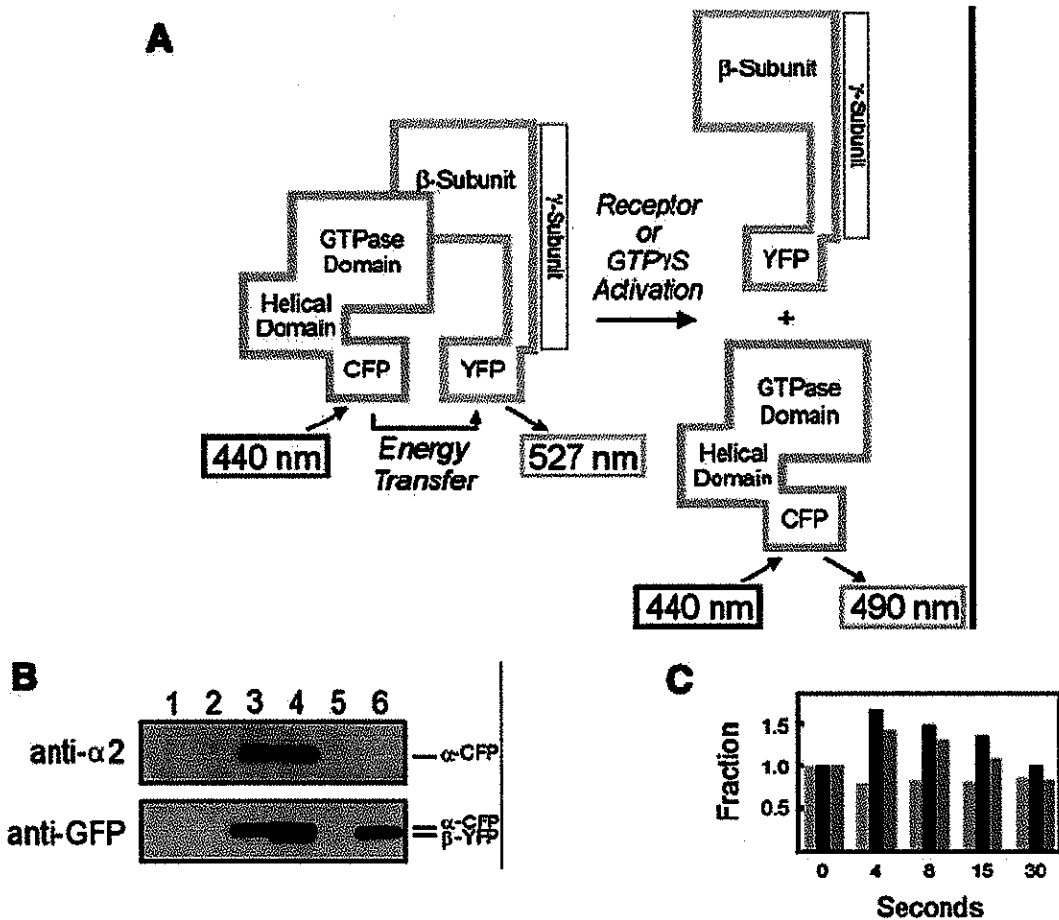
**According to the results presented in Figure 4E & F, would you suggest the existence of a mechanism of "adaptation" at the G-protein level ? Justify your answer. "Adaptation" can be defined as a process by which cellular responses terminate spontaneously after a few minutes of sustained stimulation.**



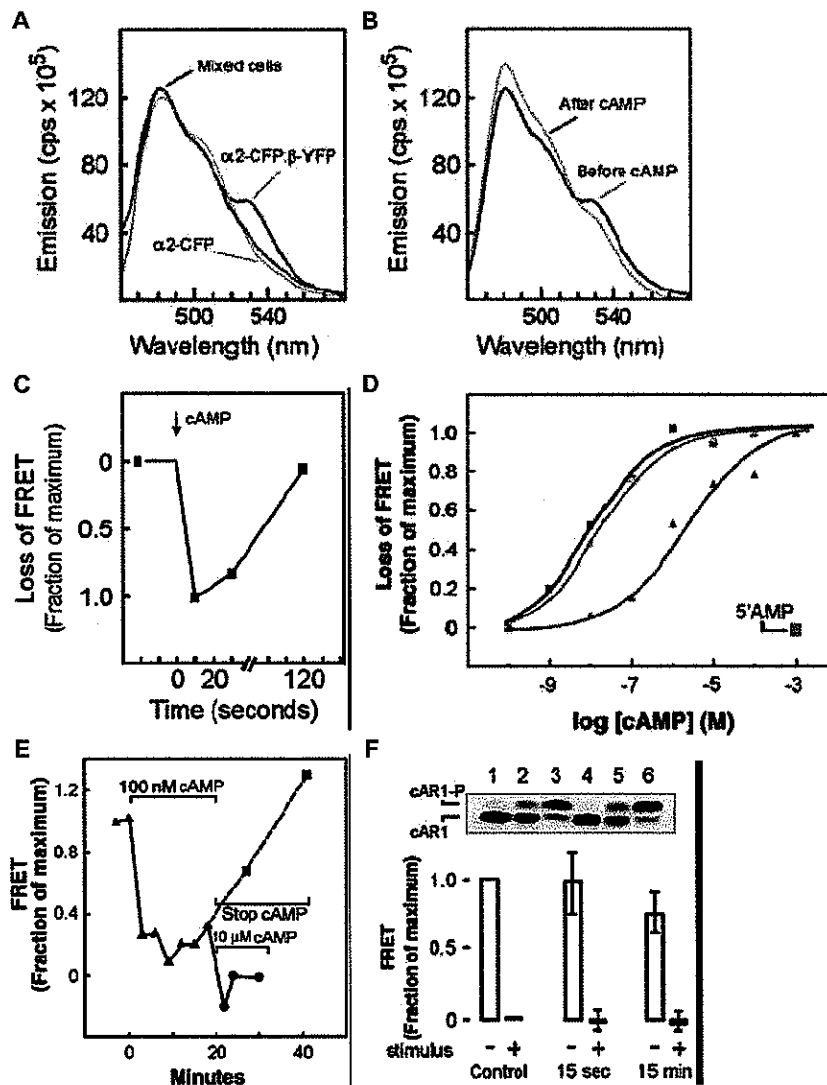
**Figure 1** – Functions of the GFP-G $\beta$  fusion protein. **(A)** Developmental phenotype of GFP-G $\beta/g\beta^-$  cells. Cells are harvested from shaking cultures, washed, and plated on nonnutrient agar. Pictures are taken 36 hours after the cells were plated. Calibration bar is 2 mm. **(B)** Expression of GFP-G $\beta$  proteins. Lysates of wild-type (WT) and GFP-G $\beta/g\beta^-$  cells are subjected to protein immunoblot analyses using an antibody to G $\beta$  (anti-G $\beta$ ) and an antibody to GFP (anti-GFP). **(C)** Aggregative-gene expression in GFP-G $\beta/g\beta^-$  cells. GFP-G $\beta/g\beta^-$  and wild-type cells are stimulated with 100 nM cAMP at 6 minutes intervals for 6 hours. Cell samples are taken after the indicated incubation periods, and lysates are subjected to protein immunoblot analyses of the chemoattractant receptor, cAR1, and the adhesion glycoprotein, gp80. **(D)** Activity of adenylyl cyclase (ACA). Adenylyl cyclase activity in lysates of wild-type, GFP-G $\beta/g\beta^-$ , and  $g\beta^-$  cells is measured in buffer (grey bars), in the presence of Mn<sup>2+</sup>, which measures unregulated intrinsic activity of the enzyme (open bars), and in the presence of GTP- $\gamma$ -S (black bars). **(E)** Chemotaxis of the GFP-G $\beta/g\beta^-$  cells. Cells are allowed to differentiate to aggregation stage by stimulating them with cAMP for 7 hours. These cells are washed, placed on glass cover slides, and then examined for chemotactic response to cAMP in a micropipette assay. At time 0, a micropipette filled with 1  $\mu$ M cAMP is applied to the surface of the slide. The positions of the cells at time 0 and 10 min are shown. Widths of fields are 150  $\mu$ m.



**Figure 2** – Quantitation of cellular distribution of GFP-G $\beta$  and cAR1-GFP in chemotactic cells. **(A)** Confocal images of GFP-G $\beta$  and cAR1-GFP in chemotaxing cells. A GFP-G $\beta$ /g $\beta$ <sup>-</sup> cell and a cAR1-GFP/car1<sup>-</sup> cell are chemotactically moving toward the upper middle of the frames. Distribution of GFP-G $\beta$  subunits and of cAR1-GFP is shown as intensity of the fluorescent signals. Color bar shows arbitrary intensity of fluorescence. a, b, c, and d represent points on the cell surface. **(B)** Quantitative analyses of the distribution of GFP-G $\beta$  and cAR1-GFP. Fluorescence intensities are measured along the lines a to c and b to d and plotted as a function of distance.



**Figure 3** – Functional interaction of G $\beta$ -YFP and G $\alpha 2$ -CFP in living cells. **(A)** CFP is inserted into the helical domain of G $\alpha 2$ , while YFP is fused to the NH<sub>2</sub>-terminus of G $\beta$ . The cyan and yellow fluorescent proteins, CFP and YFP respectively, are GFP variants. **(B)** Lysates of  $g\alpha 2^-$  (lane 1), wild-type (lane 2), G $\alpha 2$ -CFP/ $g\alpha 2^-$  (lane 3),  $\alpha 2$ -CFP: $\beta$ -YFP cells (lane 4),  $g\beta^-$  cells (lane 5), and G $\beta$ -YFP/ $g\beta^-$  cells (lane 6) are subjected to immunoblot analyses using antisera against G $\alpha 2$  (anti- $\alpha 2$ ) and against GFP (anti-GFP). **(C)** In vivo actin polymerization assays of  $g\alpha 2^-$  (light blue), wild-type (dark blue), and  $\alpha 2$ -CFP: $\beta$ -YFP (green) cells. Cells are stimulated with 100 nM cAMP at  $t = 0$  and fixed at times shown.



**Figure 4** – Fluorescence spectra of different cell lines. **(A)** Ga2-CFP/ga2<sup>-</sup> cells (light blue), α2-CFP:β-YFP cells (dark blue), and mixture of equal number of Ga2-CFP/ga2<sup>-</sup> and Gβ-YFP/gβ<sup>-</sup> cells (green) are excited at 440 nm and emission spectra are recorded between 460 and 580 nm. **(B)** Emission spectra from α2-CFP:β-YFP cells before (dark blue) and after (light blue) treatment with 100 μM cAMP. **(C)** Kinetics of evolution of FRET fluorescence after addition of 100 μM cAMP to α2-CFP:β-YFP cells. **(D)** α2-CFP:β-YFP cells are treated with increasing concentrations of cAMP (dark blue), 2'-dcAMP (light blue), and 8-Br-cAMP (green), and 5'-AMP (orange). 5'-AMP does not bind to the cAMP receptor cAR1. **(E)** α2-CFP:β-YFP cells are treated with 3 mM caffeine, are maintained at 100 nM cAMP by adding fresh cAMP every minute for 18 min and then divided into two sets. One set receives no further cAMP, whereas the second is increased to 10 μM cAMP. Caffeine inhibits the specific phosphodiesterase converting cAMP to 5'-AMP. **(F)** Identical sets of α2-CFP:β-YFP cells receive buffer (control), one addition of 100 μM cAMP for 15s (15 sec), or 15 additions, once per minute (15 min). All sets are then washed at 0°. Bars show the fraction (± SD) of FRET fluorescence before (-) and after (+) addition of a second cAMP stimulus (10 μM). Immunoblot analyses show separation of the cAR1 doublet into its lower (phosphorylated) and higher (nonphosphorylated) mobility forms. Phosphorylation of cAR1 decreases its affinity for cAMP. Immunoblot analyses of cAR1 in samples taken after washing and before restimulation show control (lanes 1 and 4), 15 s treated (lanes 2 and 5), and 15 min treated (lanes 3 and 6).



## International Selection Biological subject 2

**Questions are indicated in bold.** The subject has been elaborated from the following articles: Marc *et al.* (2002) *EMBO reports* **3**, 159-164 ; Sylvestre *et al.* (2003) *Mol. Biol. Cell* **14**, 3848-3856 ; Garcia *et al.* (2007) *Mol. Biol. Cell* **18**, 362-368).

Mitochondrial proteins are either encoded in the mitochondrial genome, and synthesized within mitochondria, or for most of them, encoded in the nuclear genome. In the latter case, genes have either a prokaryotic origin and have been transferred from mitochondria to the nucleus since the symbiosis between eukaryotic cells and bacteria was established, or have an eukaryotic origin. In both cases, messenger RNAs are translated in the cytosol, and proteins imported into mitochondria.

It has recently been shown that a fraction of the messenger RNAs synthesized in the nucleus, and coding for mitochondrial proteins are physically associated with mitochondria. The experiments which are described below aim at revealing the nature of these RNAs, and the mechanisms of their localization.

**What are the mechanisms by which the proteins are addressed to the different cell compartments ? What are the signals which are necessary to address a protein to mitochondria ? Briefly remind the structural organization of a mitochondrion, and the mechanisms by which proteins enter mitochondria.**

On Figure 1 is described the experimental procedure allowing the characterization of the messenger RNAs which are associated with the mitochondria. **Briefly explain the principle of this protocol.**

The RNAs which have been isolated by the previous procedure can be also characterized by Northern blot, and the results of this experiment are shown on Figure 2. The polysomes associated with mitochondria (M-P) are distinguished from those which are not associated (F-P). All the RNAs which have been tested encode mitochondrial proteins. **What are the conclusions of this experiment ?**

The fraction associated with mitochondria has been measured for each messenger RNA. Below 8%, this association is considered as non-specific. **What are the experiments which were necessary to determine this value of 8% ?**

107 different types of messenger RNAs, encoding the components of different mitochondrial complexes, have been analyzed by RT-PCR. Forty have been shown to be associated with mitochondria. All of them have a prokaryotic origin. **Discuss the meaning of this observation.**

It is also possible to directly and visually localize mitochondria and messenger RNAs within a cell. **Describe the methods to do that.** The results obtained by these technologies are identical to those that were previously described.

The results obtained with human cells and with yeast cells are compared on Figure 3 (ATP: subunits of the ATPase ; ACT1: actin ; OXA and COX: respiratory chain complexes). **How do you explain these results ? Eventually, criticize the way the experiments were conducted.**

Yeast cells in which the *oxal* gene encoding one of the cytochrome oxidase subunit has been deleted, were transformed with the homologous human gene *Hoxa1* (form called « long », HOXA11), or with a short form of the gene, truncated in the N-terminal part of the protein (HOXA1s), and yeast growth assayed on glycerol and glucose. **Describe the results shown on Figure 4. Explain why the  $\Delta$ oxa1 mutant is unable to grow on glycerol, whereas the wild type is able to grow** (Glycerol can be used by yeast as a carbon source ; in a first step, it is phosphorylated and oxidized).

This experimental system has been used to test the role of different parts of the *HOXA1* messenger RNA on its attachment to mitochondria. A corresponds to the long form of the gene in which the 3'-untranslated part of the messenger RNA has been deleted ; B corresponds to the short form of the gene, with the same deletion in the 3'-part.

$\Delta$ oxa1 yeasts were transformed with the different constructs, and their growth measured (Figure 5 ; WT: wild type).

**Where are the signals which are responsible for the preferential localization of messenger RNAs on the surface of mitochondria ? What are other alternative interpretations of the data ? What would be the additional experiments required to choose between these different hypotheses ?**

**What kind of mechanisms would you propose to explain this preferential localization ? How would it be possible to demonstrate the existence of such mechanisms ? If one admits that certain messenger RNAs corresponding to proteins imported into mitochondria are translated in proteins on their surface, what kind of relation might be imagined between protein synthesis and mitochondrial import ? What kind of experiments would be necessary to test this hypothesis ?**

Figure 1

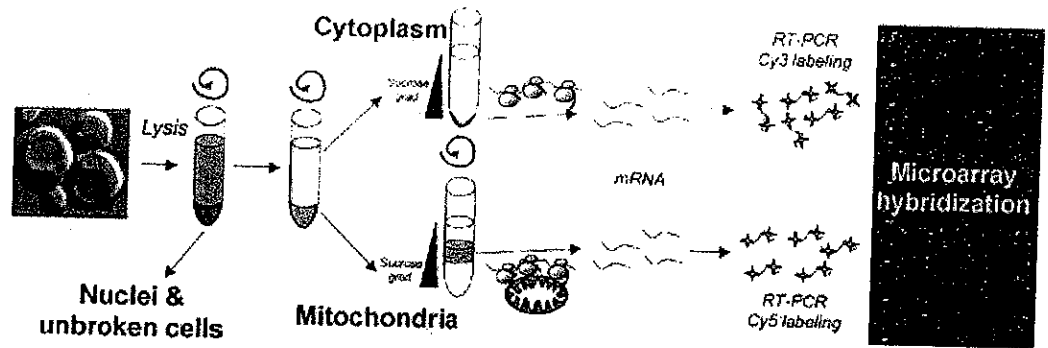


Figure 2

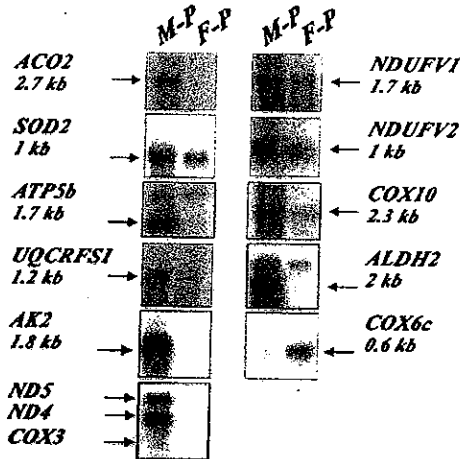
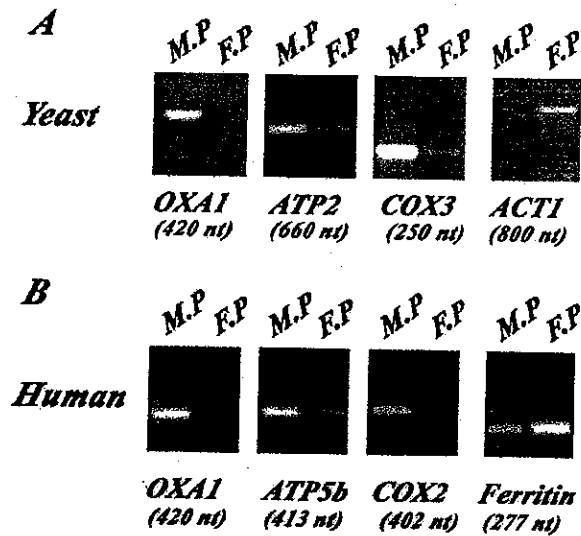


Figure 3



*Δoxa1*  
*HOXA11*  
*HOXA1s*  
*WT*

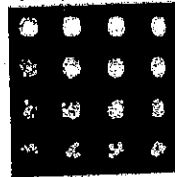
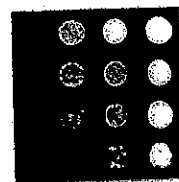
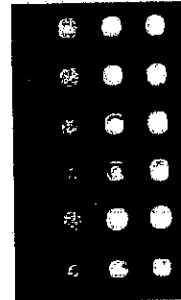


Figure 4



*Glycerol*

*Glucose*



*Glycerol*



*Δoxa1*  
*WT*  
*A*  
*H OXA1*  
*B*  
*HOXAs*

Figure 5