



Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa
Mestrado em Bioquímica
Regulação da Expressão Génica, 4 de Abril de 2019
Professor: Luísa Cyrne
Autores: Carolina Borlido nº 47226; Mafalda Manso nº 46341

Papel das Proteínas Staufen (Stau)

Resumo

As proteínas Staufen (Stau) são *RNA-binding proteins* que desempenham um papel importante no transporte de mRNA, na regulação da síntese proteica, no *decay* e estabilidade dos mRNAs. Em mamíferos esta proteína é expressa durante a oogénese e a espermatogénese. Uma vez que se tratam de *double-stranded RNA binding proteins* (dsRBP), associadas a polissomas, apresentam vários domínios que possuem diferentes funções na localização e tradução do mRNA [1,2,9]. Existem duas isoformas de proteínas staufen sendo elas a Staufen 1 (Stau1) e a Staufen 2 (Stau2), a Stau1 foi identificada como necessária para a manutenção de *dendritic spines* maduras e para a atividade sináptica. A Stau2 é necessária na localização de RNA dendrítico e na plasticidade sináptica em neurónios de mamíferos [2].

O gene da staufen de mamíferos e de *Drosophila* codifica uma proteína que contém vários domínios de ligação conservados, sendo que a sua expressão em mamíferos ocorre no hipocampo [1,3]. A staufen de mamíferos forma grânulos que são transportados para a dendrite distal durante a maturação neuronal. Estes grânulos co-localizam com partículas ribonucleares que transportam mRNA para as dendrites estes se movem ao longo dos microtúbulos [11,12,13].

Índice

Introdução.....	2
Staufen na Estabilização de mRNA	4
• Staufen-mediated RNA <i>decay</i>	4
Staufen na Tradução, Localização e Transporte	5
• Staufen 2 (Stau2)	7
• Staufen 1 (Stau1)	7
Conclusão.....	8
Referências Bibliográficas	8
Anexos	10

Introdução

Todos os organismos mantêm a homeostase através de uma dinâmica regulação da expressão dos seus genes. A regulação dos genes codificantes de proteínas ocorre durante a síntese ou *decay* dos seus RNAs mensageiros (mRNA) [7].

A proteína staufen pertence à família das *double-stranded RNA binding proteins* (dsRBP) que possuem vários domínios de ligação ao RNA. Este domínio foi encontrado em diversas proteínas incluindo nucleases, helicases, cinases, entre outras, que estão implicadas em vários processos biológicos como as proteínas Staufen [1]. As *RNA-binding proteins* são proteínas que participam na formação de complexos de ribonucleoproteínas. Estas proteínas contêm vários domínios estruturais, tais como o domínio de reconhecimento de RNA, domínios de ligação de dsRNA, mencionado acima, *zinc fingers*, entre outros. São proteínas citoplasmáticas e nucleares, no entanto, uma vez que a maioria dos RNAs maduros sai do núcleo com relativa rapidez, sendo este o local onde se realiza a tradução, a maioria das RBPs que aqui se encontram existem sob a forma de complexos de proteínas e pré-mRNA, designados por partículas de ribonucleoproteínas heterogéneas [1-3,7,8,10].

Mais especificamente, os *double stranded RNA-binding domains* estão maioritariamente envolvidos na regulação pós-traducional dos genes, por exemplo através da prevenção da expressão de proteínas ou mediando a localização de RNAs. Este domínio é também encontrado em *RNA editing proteins* (modificações discretas em sequências específicas de nucleótidos) [7,13].

As proteínas Staufen estão envolvidas na tradução localizada de mRNAs específicos e formam complexos que incluem proteínas envolvidas na tradução. Estão também presentes proteínas motoras que permitem o seu movimento dentro da célula, mas o mecanismo subjacente à repressão da tradução nestes complexos ainda não é bem compreendido.

Em mamífero foram caracterizadas duas isoformas desta proteína, Staufen 1 (Stau1) e Staufen 2 (Stau2). A Stau1 encontra-se localizada no retículo endoplasmático (ainda suscita algumas dúvidas), polissomas e forma grandes complexos ribonucleoproteicos designados por grânulos de RNA. Estes grânulos foram originalmente identificados como estruturas macromoleculares em neurónios, que se movimentam ao longo dos microtúbulos das dendrites, ligando-se através da tubulina, uma vez que esta é uma proteína constituinte dos microtúbulos [5,6,11,14].

Os complexos Stau1 possuem uma localização dendrítica em células do hipocampo de rato, co-localizam-se com o citoesqueleto e estão envolvidos no transporte de proteínas relacionadas com a cinesina e a dineína. Isto sugere que a Stau1, em mamíferos, tem um papel importante no transporte e tradução localizada de mRNA. Para além destes grânulos esta proteína está também associada ao *decay* do RNA, regulação da tradução, infeções virais, entre outros, **Figura 1** [12].

A Stau2 encontra-se em grandes quantidades no cérebro e é importante para a morfogénese da estrutura dendrítica, que representa sinapses excitatórias. É vista como um dos melhores marcadores para acompanhar o transporte de RBPs devido ao seu rápido movimento bidirecional ao longo dos microtúbulos dendríticos. Esta proteína modula a expressão, mais concretamente a estabilização, de um subconjunto de RNA que codifica para proteínas sinápticas [4].

De uma forma geral, os estudos efetuados mostraram que a Staufen apresenta um papel importante em vários processos biológicos como o transporte de RNA, a sua estabilização, tradução e ancoragem (pouco caracterizada), como iremos falar mais à frente neste trabalho [1-5].

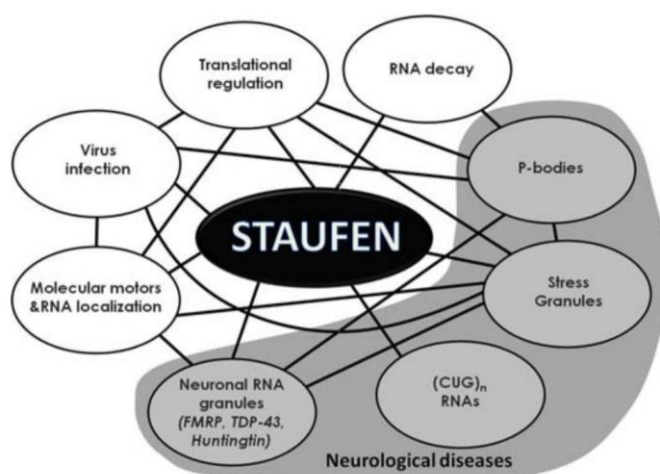


Figura 1 - Rede de interações físicas e funcionais da proteína Staufen. A Staufen interage com uma variedade de moléculas e estruturas celulares [12].

O homólogo da Staufen em mamíferos, uma proteína envolvida na localização dos mRNAs durante a oogénese e no desenvolvimento do sistema nervoso central inicial em *Drosophila* foi identificado no início deste milénio. O gene da proteína Staufen de mamíferos codifica uma proteína que contém vários *double-stranded mRNA binding domains* conservados e é expressa nos neurónios do hipocampo. Os domínios conservados são: dsRBD2, dsRBD3, dsRBD4 E dsRBD5, **Figura 2** [6].

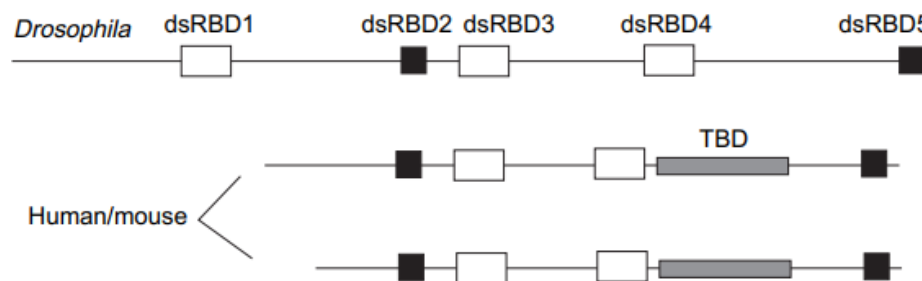
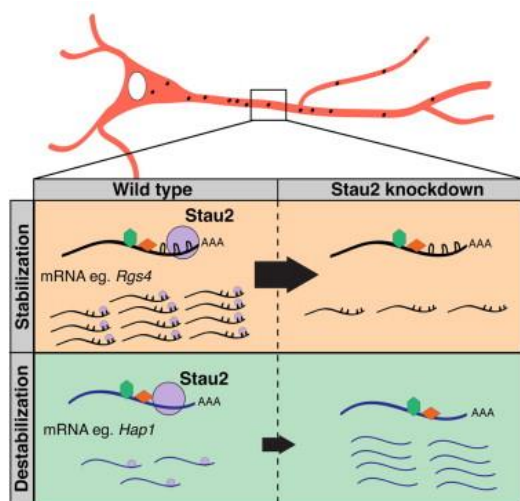


Figura 2: Estrutura dos homólogos da proteína Staufen em *Drosophila* e mamíferos (humano e rato). O gene da *Drosophila* contém dois domínios curtos (caixas pretas) e três domínios longos (caixas brancas) que se ligam ao *double-stranded RNA* (dsRBD). O de mamífero contém dois domínios curtos (caixas pretas) e dois domínios longos (caixas brancas) para além de possuir um domínio de ligação à tubulina (TBD - caixa cinzenta) [6].

Staufen na Estabilização de mRNA



A estabilização do mRNA ocorre *downstream* dos neurónios deficientes em Stau2, salientando a importância da Stau2 na regulação da tradução (e da transcrição - comprovado anteriormente [9]) enquanto que para a Stau1 foi previamente demonstrado que aquando da sua interação com o RNA não codificante longo, possui um papel importante ao estabilizar a diferenciação de queratinócitos (células diferenciadas do tecido epitelial) de Humanos, comprovando o seu papel na estabilização do mRNA. Desta forma é possível inferir que as proteínas Staufen agem enquanto reguladores pós-traducionais [4,9].

Figura 3: Estabilização da expressão do mRNA na sinalização sináptica. A estabilização da expressão de um componente da sinalização sináptica, o *regulator of G protein signalling 4* (Rgs4) regula o mRNA via 3'UTR. Este estudo permite definir o impacto da Stau2 nos mRNAs em neurónios, revelando um papel na estabilização ao nível dos alvos sinápticos [4].

A desregulação de Rgs4 (*Regulator of G protein signaling 4*) seguida do *knockdown* da Stau2 podem conduzir a uma desregulação neuronal sináptica, podendo esta desregulação estar ligada a distúrbios neuropsiquiátricos. Pode assim inferir-se que em neurónios, a Stau2, enquanto RBP, desempenha um papel importante na localização do mRNA, estabilidade e tradução, sendo possível estabelecer uma correlação entre estabilização dos alvos de RNA sinápticos [4]. Um dos mecanismos de estabilização de mRNA regulado pelas Staufen é o processo de degradação de mRNA [10].

- Staufen-mediated RNA decay

O SMD (*Staufen-mediated RNA decay*) é um processo de degradação *downstream* de mRNA em células de mamífero que é mediado pela ligação das Staufen (SBS - *Staufen-binding site*) à região 3'-UTR dos mRNA alvos, sendo este processo regulado pelo UPF1 (*Up-frameshift 1*, que funciona como helicase) [5,7].

O NMD (*Nonsense-Mediated mRNA decay*), ao contrário do anterior é um processo de degradação *upstream* de mRNA. Este é ativado por um complexo EJC (*exon-junction complex*), do qual fazem parte os fatores UPF1 e UPF2 [5,7].

As Staufen interagem diretamente com o UPF1 através do seu recrutamento pela ligação ao domínio SBS destas proteínas, o que promove uma alteração conformacional do UPF1 devido à sua fosforilação e consequente ativação deste fator. A atividade helicase do UPF1 promove assim a degradação de mRNA [5,7].

As Staufen (via SMD), competem com o UPF2 (via NMD) pela ligação ao UPF1, dado que este se encontra presente em ambas as vias [5,7].

Ao contrário do que ocorre na via SMD (promoção da função helicase do UPF1 através da sua fosforilação), o UPF2 promove a atividade ATPase do UPF1. Desta forma, é possível inferir que o SMD e o NMD são duas vias competitivas durante o processo de degradação de mRNA [9].

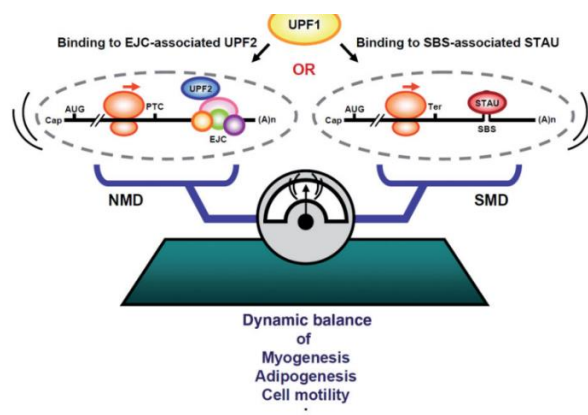


Figura 4: Modelo que mostra a competição entre SMD e NMD. SMD e NMD competem entre eles porque a Staufen, que funciona no SMD, compete com o UPF2, que tem funções no NMD, pela ligação ao UPF1, que funciona nas duas vias [7].

Staufen na Tradução, Localização e Transporte

Os sinais que permitem o reconhecimento dos mRNAs enquanto alvos para transporte e consequente localização ocorrem em regiões 3' não-traduzidas (UTRs), foi também demonstrado que a localização dos mRNAs ocorre através de um mecanismo de transporte ativo, que possui múltiplas etapas e que é dependente de elementos do citoesqueleto [5, 10].

A Staufen liga o dsRNA e a tubulina através de ligações a domínios específicos. Desta forma, foi possível comprovar que a Staufen se encontra presente no citoplasma e associada ao retículo endoplasmático Rugoso (RER), na qual se encontra ancorada, inferindo que esta proteína possui um papel importante no *targeting* do RNA no seu local de tradução, bem como o seu transporte ao longo dos microtúbulos [8,10].

Os componentes principais para o mecanismo de tradução incluem ribossomas, tRNAs, fatores de iniciação e elongação, o retículo endoplasmático e complexo de Golgi, que estão implicados em modificações pós-traducionais encontradas em dendrites [5].

Para tradução local nas dendrites, o mRNA têm de estar localizado primeiramente nestas. O mRNA nas dendrites foi pela primeira vez identificado no cérebro de um rato em desenvolvimento, no qual a proteína MAP2 (*Microtubule-Associated Protein 2*) foi visualizada utilizando hibridação *in situ* [5].

Existem diversos tipos de mRNAs que são distribuídos para as dendrites nos neurónios. Alguns dos quais, por exemplo mRNAs de MAP2 e da proteína cinase dependente de cálcio/calmodulina (CAMKII α) foram encontrados em dendrites que dependem do elemento de *targeting* dendrítico

específico (DTE - *dendritic targeting element*) que se encontra na região UTR. Estes mRNAs estão presentes nos grânulos de RNA e mecanismos de transporte de RNA dendrítico [3-5,10].

Nos neurónios, a Stau1 e Stau2 estão localizadas no compartimento somatodendrítico (região do neurónio que possui o corpo celular - célula soma - e a dendrite, mas não possui o axónio) estando associadas aos grânulos de RNA, como referido anteriormente [8]. No entanto, a Stau1 e Stau2 não se co-localizam entre si em dendrites na região distal, sugerindo assim que cada uma destas proteínas se localiza em grânulos de RNA distintos [5].

A localização dos mRNAs nas sinapses foi proposta como um mecanismo de estabilidade para a memória sináptica e manutenção da plasticidade sináptica. O *targeting* dos mRNAs específicos nas sinapses podem criar domínios pós-sinápticos ao longo da tradução local destes mRNAs. A análise ultraestrutural das regiões pós-sinápticas demonstram que as Staufen estão associadas a estruturas tubulares que se assemelham ao ER e são ricas em regiões nas quais estão presentes microtúbulos. Quando comparadas com a distribuição de partículas que contém mRNA, as Staufen são regularmente co-localizadas com estas partículas ribonucleares (RNPs), no entanto, nem todas as RNPs possuem Staufen. As Staufen não co-localizam com ribossomas [6].

No neurónio em desenvolvimento, as Staufen podem ser responsáveis pela formação de RNPs grandes que transportam mRNAs específicos ao longo dos microtúbulos até às dendrites. Este transporte poderá contribuir para a morfogénese da dendrite ao fornecer mRNAs para a região de síntese proteica. Nos neurónios completamente diferenciados, as Staufen continuam a sua função de transporte de mRNAs específicos para a sinapse de forma a produzir um microambiente sináptico através da zona de síntese proteica [6].

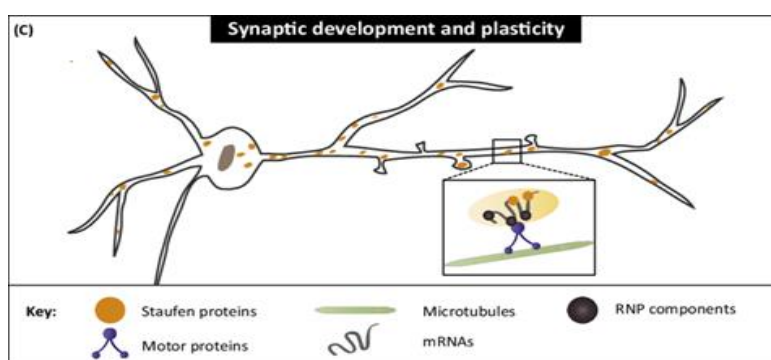


Figura 5: Representação da localização somatodendrítica das proteínas Staufen (representado a laranja) num neurónio maduro. A proteína forma RNPs com mRNAs e outras proteínas que permitem o tráfego bidirecional nas dendrites ao longo dos microtúbulos. As proteínas Stau estão envolvidas na formação da memória e na plasticidade, possuindo também um papel importante no transporte e na tradução dependente da atividade dos mRNAs localizados [10].

- Staufen 2 (Stau2)

Apesar da Staufen ser predominantemente localizada no citoplasma, foi recentemente descoberto que a Stau2 pode realizar o transporte entre o núcleo e o citoplasma. A importação nuclear da Stau2 depende da região entre os *double-stranded RNA Binding Domain* dsRBD3 e dsRBD4 [5-8].

Existem duas vias para a exportação nuclear da Stau2, uma via dependente de exportina-5 (Exp-5) e outra dependente de CRM1/exportina-1 (proteína de exportação maioritária nos mamíferos). Exp-5 é um membro da família das β importinas, que reconhece mini-hélice contendo RNA numa ligação de GTP dependente de RanGTPase (RanGTP) e exporta-as para o núcleo. O fator de elongação eucariótico 1A interage com a Exp-5, dependendo do tRNA, e é exportado do núcleo pelo Exp-5. A exportação nuclear dependente de Exp-5 é uma via comum para todas as isoformas de Stau2. A Stau2 interage com Exp-5 através da dsRBD3 e dependente de RanGTP. Foi também comprovado que a Stau259 (isoforma da Stau2) [Anexo Figura 1] é também exportada pela via dependente de CRM1 existindo reconhecimento do sinal de exportação nuclear (NES - que é frequentemente composto por aminoácidos hidrófobos, tais como leucina e isoleucina) por parte da CRM1 no N-terminal da Stau259 através de *splicing* alternativo. As proteínas exportadas do núcleo pela CRM1 possuem um sinal de exportação nuclear. Quando fora do núcleo, a Stau2 liga-se aos grânulos de RNA que se deslocam ao longo dos microtúbulos [5].

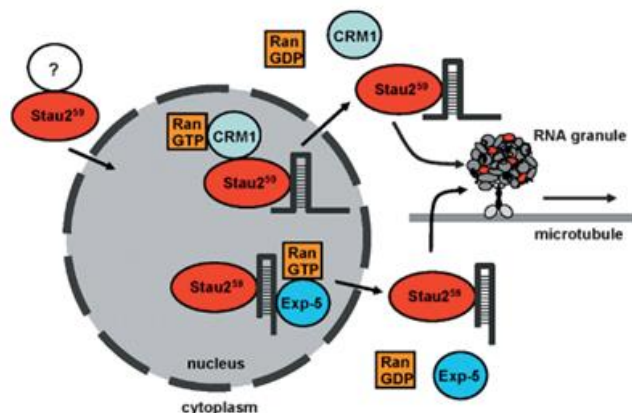


Figura 6: Modelo da exportação nuclear de RNA no qual a Stau2 atua como adaptador da exportação – Na via dependente de Exp-5, a mini-hélice contendo RNA que permite a “ponte” entre Stau2 e Exp-5 é exportada. Na via dependente de CRM1, o RNA pode ligar-se à Stau2 mas não à Exp-5. Após exportação, Exp-5 ou CRM1 dissocia, como resultado da hidrólise de GTP pelo Ran, e o complexo Stau2-RNA entra no grânulo de RNA para transporte dendrítico [5].

- Staufen 1 (Stau1)

A Stau1, predominantemente localizada no citoplasma, foi recentemente descoberta no núcleo o que sugere a possibilidade da Stau1 ser capaz de efetuar transporte entre o núcleo e o citoplasma. Apesar do mecanismo ainda não ter sido investigado em pormenor, foi provado que o RBD2 da Stau-1 interage com a Exp-5 [5].

Conclusão

A investigação desenvolvida até agora conseguiu encontrar algumas das funções da proteína Staufen, estando estas ligadas à sua capacidade de estabilizar os mRNA, participa na tradução, localização, transporte e degradação (através de duas vias) de mRNA. Os mRNA alvo desta proteína codificam diversos fatores necessários para a maturação neuronal e para a plasticidade sináptica, por exemplo. Por isso, como já foi descrito ao longo do trabalho, esta proteína participa em processos biológicos importantes para a homeostasia das células e por sua vez do organismo.

Sabe-se também que esta proteína possui duas isoformas e que estas duas possuem diversas variantes. É conhecido que a Staufen é um dos componentes dos grânulos de RNA e por isso possui um papel importante no transporte de RNA dendrítico em neurónios. Uma vez, que está associada à plasticidade sináptica e a mecanismos ligados ao desenvolvimento dos neurónios, um maior conhecimento desta proteína poderia também ajudar na perceção do normal funcionamento do cérebro assim como em estados de patologia, possivelmente.

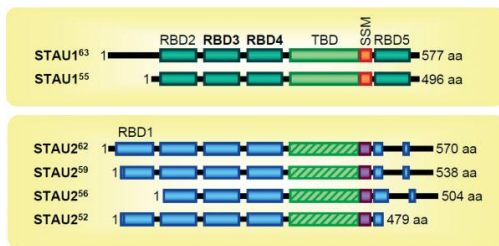
Em suma, é necessário fazer um estudo mais aprofundado e abrangente à proteína Staufen uma vez que muitos dos mecanismos aos quais se encontra associada não estão ou estão pouco caracterizados. Desta forma, este seria um bom tema de estudo para se ter um conhecimento mais real das funções e mecanismos aos quais está associada.

Referências Bibliográficas

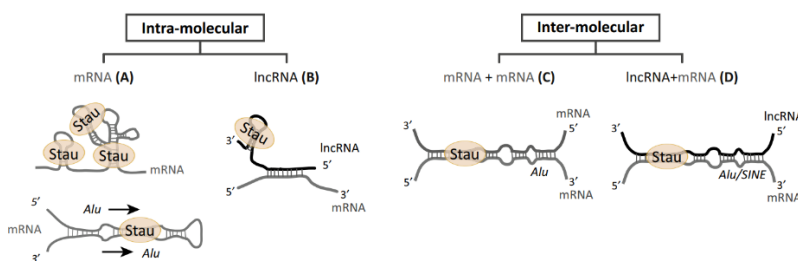
- [1] Tian, B., & Mathews, M. B. *Phylogenetics and Functions of the Double-Stranded RNA-Binding Motif: A Genomic Survey*. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. 2003;74:123-58.
- [2] Peredo, J., Villacé, P., Ortín, J., & De Lucas, S. *Human Staufen1 associates to MiRNAs involved in neuronal cell differentiation and is required for correct dendritic formation*. PLoS ONE. 2014 ;9(11):e113704
- [3] Lebeau, G., DesGroseillers, L., Sossin, W., & Lacaille, J. C. *MRNA binding protein staufen 1-dependent regulation of pyramidal cell spine morphology via NMDA receptor-mediated synaptic plasticity*. Molecular Brain. 2011; 4: 22.
- [4] Heraud-Farlow, J. E., Sharangdhar, T., Li, X., Pfeifer, P., Tauber, S., Orozco, D., ... Kiebler, M. A. *Staufen2 regulates neuronal target RNAs*. Cell Reports. 2013 ;5(6):1511-8
- [5] Miki, T., Takano, K., & Yoneda, Y. *The Role of Mammalian Staufen on mRNA Traffic: a View from Its Nucleocytoplasmic Shuttling Function*. Cell Structure and Function. 2005;30(2):51-6
- [6] Roegiers, F., & Jan, Y. N. *Staufen: A common component of mRNA transport in oocytes and neurons?* Trends in Cell Biology. 2000;10(6):220-4.
- [7] Park, E., & Maquat, L. E. *Staufen-mediated mRNA decay*. Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA. 2013;4(4):423-35

- [8] Wickham, L., Duchaîne, T., Luo, M., Nabi, I. R., & DesGroseillers, L. *Mammalian staufer is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum*. *Molecular and Cellular Biology*. 1999;19(3):2220-30
- [9] Park, E., Gleghorn, M. L., & Maquat, L. E. *Staufen2 functions in Staufen1-mediated mRNA decay by binding to itself and its paralog and promoting UPF1 helicase but not ATPase activity*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(2):405-12
- [10] Heraud-Farlow, J. E., & Kiebler, M. A. *The multifunctional Staufen proteins: Conserved roles from neurogenesis to synaptic plasticity*. *Trends in Neurosciences*. 2014;37(9): 470–479.
- [11] Thomas, M. G., Martinez Tosar, L. J., Desbats, M. A., Leishman, C. C., & Boccaccio, G. L. *Mammalian Staufen 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly*. *Journal of Cell Science*. 2009;122(Pt 4):563-73
- [12] Boccaccio, G. L. *Staufen from embryo polarity to cellular stress and neurodegeneration*. *Frontiers in Bioscience*. 2012;4:432-52.
- [13] Kim, Y. K., Furic, L., DesGroseillers, L., & Maquat, L. E. *Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay*. *Cell*. 2005;120(2):195-208.
- [14] Villacé, P., Marión, R. M., & Ortín, J. *The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs*. *Nucleic Acids Research*. 2004;32(8):2411-20

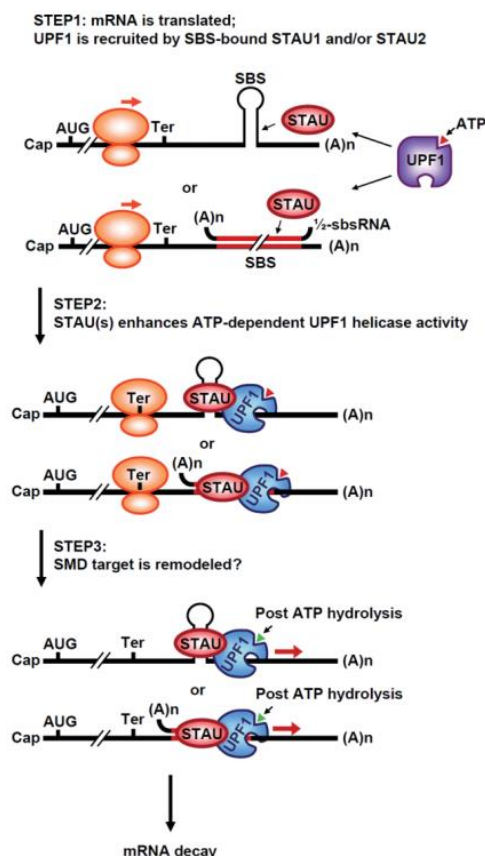
Anexos



Anexo Figura 1: Diagrama das isoformas de Stau1 e Stau2. Os números escritos acima da linha dizem respeito à massa aproximada de cada isoforma (kDa), as caixas representam domínios funcionais e/ou estruturais. O número 1 corresponde ao N-terminal, RBD - *dsRNA binding domain* (os que estão a negrito possuem a capacidade de se ligar a dsRNA), TBD - *tubulin-binding domain* (em que o TDB em Stau2 é aproximadamente 18% igual ao de Stau1), SSM - *staufen-swapping motif*, aa – aminoácidos [7].



Anexo Figura 2: Diversidade de estruturas reconhecidas pela Staufen [10].



Anexo Figura 3: Modelo para o mecanismo de SMD. A Stau1 e/ou a Stau2, individualmente (como representado pela figura) ou em homo ou heterodímeros, pode também ocorrer em multímeros, liga-se ao SBS da 3'-UTR que pode ser formado pelo emparelhamento de bases intra ou intermolecular [7].