

Université de Montréal

Rôle du complexe NF45-NF90 dans la régulation post-transcriptionnelle du cycle cellulaire

par

Sami Nourreddine

Programmes de Biologie Moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D)

en Biologie Moléculaire

option Biologie des Systèmes

2021

©Sami Nourreddine

Résumé

Le cycle cellulaire eucaryote se divise en une série de phases ordonnées qui ont pour finalité la division cellulaire. Ce processus est primordial dans la prolifération des cellules normales et le développement, mais il est aussi très fortement dérégulé dans les cellules cancéreuses. Les phases de cycle cellulaire sont différenciées par les tâches effectuées au cours de celles-ci et requièrent l'expression de gènes spécifiques à chacune des phases. Chez l'humain, il existe environ 1000 gènes dont l'expression est dépendante de la phase du cycle cellulaire. Les mécanismes impliqués dans le contrôle de l'expression périodique de ces gènes ont principalement été étudié aux niveaux transcriptionnels et post-traductionnels. Cependant, la régulation post-transcriptionnelle demeure encore peu étudiée dans le contexte du cycle cellulaire, malgré son importance dans le contrôle de l'expression génique. Afin d'identifier des régulateurs post-transcriptionnels du cycle cellulaire, nous avons analysé la corrélation existante entre l'expression des gènes périodiques du cycle cellulaire et celle de 687 protéines liant l'ARN (*RNA-binding protein*; RBP) sur plus de 1000 spécimens de cancer du sein. Cette analyse nous a permis d'identifier 39 RBP dont les protéines *Nuclear Factor 45* (NF45) et *Nuclear Factor 90* (NF90). NF45 et NF90 forment un hétérodimère qui lie des structures d'ARN double brin et qui contrôle l'expression génique à différents niveaux de l'épissage à la stabilisation des ARNm. La déplétion de NF45 ou NF90 inhibe la prolifération des cellules en induisant de nombreux défauts mitotiques qui résultent d'une baisse d'expression de plusieurs gènes essentiels à la mitose. D'autre part, à l'aide d'une méthode de protéomique nous avons réalisé l'interactome du complexe NF45-NF90 afin de déterminer à quels niveaux ce mécanisme de régulation prend place et avons identifié une interaction avec le complexe *Staufen1/2-UPF1* responsable de la dégradation des ARNm. Ainsi, les niveaux d'expression de certains ARNm importants à la mitose sont conditionnés par une compétition entre NF45-NF90 et *Staufen1/2* pour la liaison à ces ARNm. Dans une seconde étude, nous avons recherché les régulations potentielles sur NF45 et NF90 au cours du cycle cellulaire et avons

découvert des évènements de phosphorylation sur NF90 prenant place en phase G2/M. Nous avons montré que cette phosphorylation est médiée par CDK1, et l'activation de CDK1 provoque la translocation de NF90 du noyau vers le cytoplasme. Enfin, au vu de l'implication du complexe NF45-NF90 dans la prolifération des cellules cancéreuses, nous avons réalisé un essai de criblage à haut débit de 120 000 molécules sur l'interaction entre NF45 et NF90. Cet essai nous a permis d'identifier plus de plus 1000 molécules pouvant potentiellement interférer avec le complexe NF45-NF90. Parmi celles-ci, nous avons retrouvé 14 molécules de la famille des glycosides cardiaques, qui sont des composés antiarythmiques mais qui par ailleurs possèdent des effets anticancéreux décrits depuis plusieurs décennies. De façon intéressante, le traitement des cellules à ces composés mène à un phénotype mitotique très similaire à la déplétion de NF45 ou NF90, suggérant une implication du complexe NF45-NF90 dans les effets antimitotiques induits par les glycosides cardiaques. En conclusion, ces études nous ont permis d'éclairer le rôle du complexe NF45-NF90 dans la prolifération cellulaire, mais aussi d'approfondir la compréhension des différents mécanismes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire.

Mots clés : cycle cellulaire ; protéine liant l'ARN ; cancer ; NF45 ; NF90 ; Staufen ; CDK1 ; glycosides cardiaques

Abstract

The eukaryotic cell cycle is divided into a series of ordered phases leading to cell division. This process is essential in normal cell proliferation and development, but it is also largely deregulated in cancer cells. Cell cycle phases are differentiated by the different molecular processes performed and expression of specific genes at each phase is determinant. In humans, there are approximately 1000 genes that are periodically expressed throughout the cell cycle. Control of this periodic expression has been well characterized at the transcriptional and post-translational levels. However, post-transcriptional regulation remains little studied in the context of the cell cycle, despite its importance in the control of gene expression. In order to identify post-transcriptional cell cycle regulators, we have correlated the expression of cell cycle genes with the expression of 687 RNA-binding proteins (RBP) in more than 1000 breast cancer specimens. This analysis allowed us to identify 39 RBPs, including Nuclear Factor 45 (NF45) and Nuclear Factor 90 (NF90). NF45 and NF90 form a heterodimer that binds double-stranded RNA structures and controls gene expression at various levels, from splicing to stabilization of mRNAs. Depletion of NF45 or NF90 inhibits cell proliferation by inducing several mitotic defects resulting from decreased expression of many genes essential for mitosis. In order to determine at which levels this regulatory mechanism takes place, we performed a proteomic method to identify NF45-NF90 proximal interactors and identified an interaction with the Staufen1/2-UPF1 complex responsible for the degradation of mRNAs. Thus, it appears that the expression of some mitotic mRNAs is controlled by a competition between NF45-NF90 and Staufen1/2 for binding to these mRNAs. In a second study, we looked for potential regulations on NF45 and NF90 during the cell cycle and found phosphorylation events on NF90 taking place in the G2/M phase of the cell cycle. We have shown that this phosphorylation is CDK1-dependent, and that CDK1 activation leads to the translocation of NF90 from the nucleus to the cytoplasm. Finally, based on the involvement of the NF45-NF90 complex in cancer cell proliferation, we carried out a high-throughput screening assay of 120,000

molecules on the interaction between NF45 and NF90. This assay allowed us to identify more than 1000 molecules that could potentially interfere with the NF45-NF90 complex. Amongst them, we found 14 molecules belonging to the cardiac glycoside family, which are antiarrhythmic drugs that also display anticancer effects. Interestingly, treatment with cardiac glycosides leads to a mitotic phenotype very similar to the depletion of NF45 or NF90, suggesting an involvement of the NF45-NF90 complex in the antimitotic effects induced by cardiac glycosides. In conclusion, these studies have shed light on the role of the NF45-NF90 complex in cell proliferation, but also deepened our understanding of the different mechanisms involved in cell cycle control.

Key words: cell cycle; RNA binding proteins; cancer; NF45; NF90; Staufen; CDK1; cardiac glycosides

Table des matières

I. RESUME.....	I
II. ABSTRACT	II
III. TABLE DES MATIERES	III
IV. LISTE DES FIGURES.....	IV
V. LISTE DES ABREVIATIONS	V
VI. REMERCIEMENTS.....	VI
1 CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
1.1 Le cycle cellulaire	1
1.1.1 Les phases du cycle cellulaire et points de contrôles	1
1.1.1.1 L'interphase	1
1.1.1.1.1 La phase G0/G1	2
1.1.1.1.2 La phase S	3
1.1.1.1.3 La phase G2	3
1.1.1.2 La mitose	4
1.1.1.2.1 La prophase.....	4
1.1.1.2.2 La prométaphase.....	5
1.1.1.2.3 La métaphase	5
1.1.1.2.4 L'anaphase	5
1.1.1.2.5 La télophase	6
1.1.1.3 Les points de contrôle du cycle cellulaire	6
1.1.1.3.1 Les points de contrôle de la phase G1	6
1.1.1.3.2 Point de contrôle de la phase S	9
1.1.1.3.3 Point de contrôle de la phase G2	10
1.1.1.3.4 Les points de contrôle de la phase M.....	10
1.1.2 Régulation post-traductionnelle	11
1.1.2.1 Les complexes cycline-CDK.....	12
1.1.2.2 Le complexe SCF	14
1.1.2.3 Le complexe APC/C	16
1.1.3 Régulation transcriptionnelle	17
1.1.4 Régulation post-transcriptionnelle	20
1.1.4.1 La traduction et le complexe eIF4F	20
1.1.4.2 Régulation de la production des histones par SLBP	21
1.1.4.3 Les microARN.....	22
1.1.5 Cancer et cycle cellulaire.....	25
1.1.5.1 Implications des CDK et des CKI	25
1.1.5.2 Instabilité génomique et dommages à l'ADN	26
1.1.5.3 La signature du cycle cellulaire dans le cancer	27
1.2 Les protéines liant l'ARN	30
1.2.1 Les domaines de reconnaissance à l'ARN.....	30

1.2.1.1	Domaine RRM	31
1.2.1.2	Domaine KH	32
1.2.1.3	Domaine dsRBD	33
1.2.1.4	Domaine Zinc Finger	34
1.2.1.5	Domaine S1	36
1.2.1.6	Domaine PAZ et PIWI.....	36
1.2.2	Biogénèse et dégradation des ARNm	37
1.2.2.1	La maturation des ARNm	37
1.2.2.2	L'export nucléaire	38
1.2.2.3	Dégradation des ARNm.....	39
1.2.2.3.1	Dégradation des ARNm non-sens (NMD).....	39
1.2.2.3.2	Dégradation des ARNm Non-stop (NSD).....	40
1.2.2.3.3	Dégradation des ARNm Staufen-dépendante (SMD)	40
1.2.3	Le complexe NF45-NF90	40
1.2.3.1	Structure du complexe NF45-NF90.....	41
1.2.3.1.1	Le domaine d'interaction DZF	41
1.2.3.1.2	Les domaines de liaison à l'ARN de NF90.....	43
1.2.3.2	Les mécanismes de contrôle de l'expression génique par le complexe NF45-NF90 ...	45
1.2.3.2.1	Régulation transcriptionnelle	45
1.2.3.2.2	Régulation post-transcriptionnelle	46
1.2.3.2.2.1	Stabilisation des ARNm.....	47
1.2.3.2.2.2	Epissage des pre-ARNm.....	48
1.2.3.2.2.3	Biogénèse des ARN non codants	49
1.2.3.2.3	Régulation traductionnelle	51
1.2.3.3	Implications pathologiques du complexe NF45-NF90.....	52
1.2.3.3.1	Les cancers	52
1.2.3.3.2	Les Virus.....	55
1.3	Hypothèse de recherche.....	57
2	CHAPITRE 2: NF45 AND NF90 REGULATE MITOTIC GENE EXPRESSION BY COMPETING WITH STAUFEN-MEDIATED MRNA DECAY	58
2.1	Mise en contexte.....	59
2.2	Abstract	60
2.3	Introduction.....	61
2.4	Results.....	62
2.5	Discussion.....	69
2.6	Acknowledgments	71
2.7	Author contributions	72
2.8	Materials and Methods.....	72
2.9	References	82
2.10	Figures.....	92

3 CHAPITRE 3: CDK1 PROMOTES NF90 PHOSPHORYLATION AT THE G2/M PHASE OF THE CELL CYCLE..... 109

3.1 Mise en contexte..... 110

3.2 Abstract 111

3.3 Introduction..... 112

3.4 Results..... 113

3.5 Discussion..... 117

3.6 Acknowledgments 118

3.7 Author contributions 119

3.8 Materials and Methods 119

3.9 References 123

3.10 Figures..... 127

4 CHAPITRE 4 : HIGH-THROUGHPUT SCREENING IDENTIFIES CARDIAC GLYCOSIDES AS SELECTIVE MODULATORS OF THE NF45-NF90 COMPLEX 133

4.1 Mise en Contexte 134

4.2 Abstract 136

4.3 Introduction..... 137

4.4 Results..... 138

4.5 Discussion..... 142

4.6 Acknowledgment 144

4.7 Author contributions 144

4.8 Materials and Methods 144

4.9 References 147

4.10 Figures..... 152

5 CHAPITRE 5 : DISCUSSION 162

5.1 Les rôles du complexe NF45-NF90, un nouveau régulateur post-transcriptionnel de la mitose162

5.1.1 Régulation post-transcriptionnel de l'expression des ARNm mitotiques 162

5.1.2 Interactome du complexe NF45-NF90 164

5.1.2.1 L'interaction fonctionnelle avec les RBP à domaine dsRBD 164

5.1.2.2	L'interaction de proximité avec les protéines du spliceosome	166
5.2	Phosphorylation de NF90 par la protéine kinase CDK1	168
5.2.1	La phosphorylation de NF90 en G2/M.....	168
5.2.2	Fonction potentielle de la phosphorylation de NF90 en G2/M	169
5.3	Identifications des molécules ciblant l'interaction entre NF45 et NF90	169
5.3.1	Les glycosides cardiaques	170
5.3.2	Les autres inhibiteurs potentiel du complexe NF45-NF90	171
6	CONCLUSION.....	173
7	REFERENCES	175

Liste des figures

CHAPITRE 1

FIGURE 1. PROGRESSION DES PHASES DU CYCLE CELLULAIRE EUCARYOTE.....	2
FIGURE 2. LES ETAPES DE LA MITOSE (WALCZAK, CAI, AND KHODJAKOV 2010)	4
FIGURE 3. VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS L'ENGAGEMENT DE LA PHASE G1 (FOSTER ET AL. 2010).....	7
FIGURE 4. VOIES DE SIGNALISATION DE LA REPOSE AUX DOMMAGES A L'ADN (RONCO ET AL. 2017).....	9
FIGURE 5. ACTIVITE DES COMPLEXES CYCLINE-CDK ET CKI AU COURS DES PHASES DU CYCLE CELLULAIRE.	13
FIGURE 6. ACTIVITES DES COMPLEXES UBIQUITINE LIGASE AU COURS DES PHASES DU CYCLE CELLULAIRE	16
FIGURE 7. ACTIVITE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION AU COURS DES PHASES DU CYCLE CELLULAIRE	18
FIGURE 8. CONTROLE DU CYCLE CELLULAIRE PAR LES MIARN (BUENO AND MALUMBRES 2011)	24
FIGURE 9. ALTERATIONS GENETIQUES DES VOIES DE SIGNALISATION DANS LES CANCERS HUMAINS (SANCHEZ-VEGA ET AL. 2018).....	29
FIGURE 10. STRUCTURE DU DOMAINE RRM DE HNRNPA1/B2 EN INTERACTION AVEC DE L'ARN SIMPLE BRIN (WU, SU, ET AL. 2018).....	31
FIGURE 11. STRUCTURE DU DOMAINE KH DE TYPE II DE PCBP2 EN INTERACTION AVEC DE L'ARN SIMPLE BRIN (DU ET AL. 2007).....	33
FIGURE 12. STRUCTURE DES DEUX DOMAINES DSRBD DE NF90 EN INTERACTION AVEC DE L'ARN DOUBLE BRIN (JAYACHANDRAN, GREY, AND COOK 2016).....	34
FIGURE 13. STRUCTURE DES DOMAINES ZN FINGER DE TFIIA AVEC L'ARN RIBOSOMAL 5S (NOLTE ET AL. 1998).....	35

FIGURE 14. STRUCTURE DU DOMAINE S1 DE LA PNPASE (BYCROFT ET AL. 1997) ..	36
FIGURE 15. STRUCTURE DU DOMAINE PAZ INTERAGISSANT AVEC UN ARN SIMPLE BRIN (ZENG ET AL. 2011).....	37
FIGURE 16. STRUCTURE DU DOMAINE DZF DE NF45 ET NF90 (WOLKOWICZ AND COOK 2012)	43
FIGURE 17. INTERACTION DES DSRBD DE NF90 ET ADAR2 AVEC DE L'ARN 18MER (JAYACHANDRAN, GREY, AND COOK 2016)	44
FIGURE 18. ARNM STABILISES PAR NF90	47
FIGURE 19 BIOGENESE DES MIARN (WINTER ET AL. 2009)	50
FIGURE 20. TABLEAU RECAPITULATIF DES DIFFERENTS TYPES DE CANCER IMPLIQUANT UNE SUREXPRESSON DE NF45 OU NF90	54
FIGURE 21. TABLEAU RECAPITULATIF DES DIFFERENTES ESPECES DE VIRUS OU NF45-NF90 SONT DES FACTEURS D'HOTES	56

CHAPITRE 2

FIGURE 1. NF45 AND NF90 FORM AN RNA-BINDING COMPLEX THAT CORRELATES WITH CELL CYCLE MRNAS.....	93
FIGURE 2. THE NF45-NF90 COMPLEX IS REQUIRED FOR MITOTIC PROGRESSION AND CYTOKINESIS.....	94
FIGURE 3. THE NF45-NF90 COMPLEX REGULATES THE EXPRESSION OF A CLUSTER OF MITOTIC GENES.	96
FIGURE 4. THE PROXIMITY INTERACTOME OF NF45 AND NF90 REVEALS A FUNCTIONAL INTERPLAY WITH SMD COMPONENTS.....	98
FIGURE S1. IMPACT OF NF45 OR NF90 DEPLETION IN BREAST CANCER CELL LINES.	100

FIGURE S2. ANALYSIS OF MITOTIC GENE ALTERNATIVE SPLICING IN RESPONSE TO NF45 AND NF90 DEPLETION.	102
FIGURE S3. TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF MITOTIC GENES IN CELLS WITH LOSS- AND GAIN-OF-FUNCTION IN NF45 AND NF90.....	103
FIGURE S4. TRANSLATIONAL REGULATION OF MITOTIC GENES IN RESPONSE TO NF45 OR NF90 DEPLETION.	106
FIGURE S5. INTERSECTION OF NF90 AND UPF1 BINDING REGIONS ON TARGET MRNAS.....	107

CHAPITRE 3

FIGURE 1. ANALYSIS OF NF45/90 EXPRESSION THROUGH CELL CYCLE PROGRESSION.....	127
FIGURE 2. NF90 PHOSPHORYLATION IS REGULATED BY CDK1 AND PP2A IN MITOSIS	128
FIGURE 3. CDK1 DIRECTLY PHOSPHORYLATES NF90 ON THR368.	129
FIGURE 4. CDK1 ACTIVATION LEADS TO NF90 CYTOPLASMIC EXPORT.	131
FIGURE S1. NUCLEAR CYTOPLASMIC DISTRIBUTION OF NF90 WT/T368A/T368D. ...	132

CHAPITRE 4

FIGURE 1. DEVELOPMENT OF BRET-BASED BIOSENSOR MEASURING NF45-NF90 INTERACTION.....	152
FIGURE 2. HIGH-THROUGHPUT SMALL MOLECULE SCREENING OF NF45-NF90.....	154
FIGURE 3. DOSE DEPENDENT ACTIVITY OF CARDIAC GLYCOSIDES ON NF45-NF90 BRET-BASED BIOSENSORS	156
FIGURE 4. CGS TREATED CELLS DISPLAY A SIMILAR MITOTIC PHENOTYPE TO NF45 OR NF90 KNOCKDOWN.	158

FIGURE S1. CHEMICAL SUB-LIBRARIES USED IN NF45/NF90 HTS AND Z'	
DISTRIBUTION OF THE 384 WELL PLATES	160
FIGURE S2. STATISTICAL VALUES OF CGS AND AMIODARONE DOSE RESPONSES	
CURVE FITTING.....	161

CHAPITRE 5

FIGURE 1. GENES CIBLE DU CYCLE CELLULAIRE COMMUNS ENTRE NF45 ET FOXM1 (GRANT ET AL. 2013).....	163
FIGURE 2. REPRESENTATION DU RESEAU STRING D'INTERACTION DES RBP DONT L'EXPRESSION CORRELE AVEC LES GENES PERIODIQUES DU CYCLE CELLULAIRE (NOURREDDINE ET AL. 2020)	164
FIGURE 3. INTERACTEURS PROTEIQUES POTENTIELS ISSUS DU BIOID NF45-NF90 ET DE L'IP-MS NF45 (MARCHESINI ET AL. 2017)	168

v. Liste des abréviations

ADAR : Adenosine deaminases acting on RNA
ADN : acide désoxyribonucléique
AMPK : AMP-activated protein kinase
ANCHR : Abscission/NoCut checkpoint regulator
APC/C : anaphase promoting complex
ARN : acide ribonucléique
ARNcirc : ARN circulaire
ARNdb: ARN double brin
ARNm : ARN messenger
ARNnc : ARN non codant
ARNsno : ARN small nucleolar
ARNt : ARN de transfert
ATM : ataxia telangiectasia mutated
ATP : adenosine triphosphate
ATR : ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
ATRIP : ATR-interacting protein
b-Myb : Myb-related protein B
BRET : bioluminescence resonance energy transfer
CCL5 : C-C Motif Chemokine Ligand 5
CDC25c : cell division cycle 25 phosphatase
CDC7 : cell division cycle 7-related protein kinase
CDH1 : Fizzy-related protein homolog
CDK : cyclin-dependent kinases
Chk1/2 : Checkpoint kinase 1/2
CHMP4C : charged multivesicular body protein 4c
CIP : CDK inhibitory protein
CKI : cyclin-dependent kinase inhibitor
CUL1 : cullin 1
CXCL10 : C-X-C Motif Chemokine Ligand 10
DBF4 : Dumbbell former 4 protein

DGCR8 : DGCR8 Microprocessor Complex Subunit
DREAM : dimerization partner, RB-like, E2F and multi-vulval class B
DROSHA : Drosha Ribonuclease III
dsRBD : double-stranded RNA-Binding Domain
DZF : domain associated with zinc finger
E2F : E2 transcription factor
eCLIP : enhanced Cross-Link ImmunoPrecipitation
EGF : epidermal growth factor
EGFR : epidermal growth factor receptor
eiF4F : eukaryotic translation initiation factor 4F
EJC : Exon-junction complex
ESCRT-III : endosomal sorting complexes required for transport III
FBXO5 : F-box only protein 5
FBXW7 : F-box/WD repeat-containing protein 7
FOXM1 : Forkhead box protein M1
HnRNP : Heterogeneous ribonucleoprotein particle
IFIT2/3 : Interferon-Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats 2/3
IFN- β : interferon β
IGF-1 : insulin growth factor-1
IL-2 : interleukin 2
IL-6 : interleukin 6
IL-8 : interleukin 8
ILF2/3 : interleukin-enhancing factor 2/3
KIP : kinase inhibitory protein
MAD1/2 : mitotic arrest deficient 1/2
MAPK : mitogen-activated protein kinase
MHC-1 : major histocompatibility complex
miARN : micro ARN
mTORC1: mammalian target of rapamycin complex 1
MuvB : multi-vulval class B
NF45/90: Nuclear Factor 45/90
NFAT : Nuclear Factor of Activated T Cell

NMD : nonsense-mediated decay
NSD : nonstop decay
PARP1 : Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1
PKR : protein kinase R
PLK1 : polo-like kinase 1
PRMT-1 : Protein Arginine Methyltransferase 1
Rb : Retinoblastoma
RBL1/2 : RB Transcriptional Corepressor Like 1/2
RBMX : RNA Binding Motif Protein X-Linked
RBP : RNA-binding protein
RBX1: RING-box protein 1
RNP : ribonucleoprotein
RPA : replication protein A
RRM : RNA recognition motif
SAC : spindle assembly checkpoint
SCF : skp, cullin, F-box containing complex
SKP1/2 : S-phase kinase-associated protein 1/2
SLBP : Stem-Loop Binding Protein
Slu7 : SLU7 Homolog, Splicing Factor
SMD : staufen-mediated mRNA decay
SRSF : Serine/arginine-rich splicing factor 1
SRSF3 : Serine And Arginine Rich Splicing Factor 3
SURF complexe : SMG1-UPF1-eRF1-erF3
SYNCRIP : Synaptotagmin Binding Cytoplasmic RNA Interacting Protein
TAP : antigen peptide transporter
TCGA : The cancer genome atlas
TGF- β : transforming growth factor beta
TNF- α : tumor necrosis factor α
TREX : transcription export
ULK3 : Unc-51 Like Kinase 3
uPA : Urokinase-type plasminogen activator
UTR : untranslated region

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor A

VPS4A : Vacuolar protein sorting-associated protein 4A

WEE1 : Wee1-like protein kinase

β -TCRP : F-box/WD repeat-containing protein 1A

vi. Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier Philippe Roux, mon directeur de recherche, qui m'a donné l'opportunité de faire mon PhD dans son laboratoire. Nous avons eu plein de discussions scientifiques enrichissantes qui ont modelé mon esprit scientifique. D'autre part j'ai pu apprendre de nombreuses techniques et pu partager mon travail à différents congrès internationaux. Je suis très fier d'avoir reçu ma formation de chercheur à tes côtés.

Je remercie tous les membres présents et passés du labo. Merci à toi Geneviève, pour ton implication sur le projet NF45 et NF90, ton aide a été primordiale pour l'avancée de tous les projets sur lesquelles j'ai travaillé. Antoine, mon grand frère du doctorat, qui m'a accueilli quand je suis arrivé au labo et avec qui j'ai beaucoup partagé tout au long de son passage chez Philippe. Je remercie Léo, Thibault, Louis, Alizée, Neethi et Jonathan pour leurs soutiens et toutes les discussions scientifiques intéressante que nous avons eu. Je remercie la talentueuse Maya, une ancienne stagiaire d'été du labo que j'ai encadré avec grand plaisir, merci pour ton implication sur la phosphorylation de NF90.

Je remercie tous mes amis, autant ceux de Strasbourg que mes nouveaux amis que je me suis fait à Montréal. Votre présence a été très importante pour équilibrer ma vie entre charge mentale du travail et les loisirs. Merci à toi Paula, pour ton soutien pendant toutes ces années.

Je tiens à remercier Andy mon sensei de Karaté ainsi que Luciana et Koji mes sensei de Jiu Jitsu Brésilien. L'apprentissage des arts martiaux au cours des deux dernières années m'a permis d'apprendre sur moi-même, et d'améliorer mon mental.

Je dédie cette thèse à ma famille en particulier mon père Abdel Majid, ma mère Fiorella et mon Frère Elias. Sans leurs soutiens indéfectibles, je n'aurais pu réaliser mes différents projets de vie et grâce à eux j'ai pu m'épanouir dans cette passion qui est la biologie.

1 Chapitre 1 : Introduction

1.1 Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est un processus hautement conservé chez toutes les cellules du règne eucaryotes. Il se divise en deux phases majeures, l'interphase et la mitose. Durant l'interphase, la cellule duplique son génome pour ensuite être subdivisée en deux cellules filles lors de la mitose. Pour être dans des conditions favorables à la division cellulaire, la cellule passe à travers plusieurs points de contrôle afin d'assurer l'intégrité de son génome. De plus, des changements morphologiques majeurs s'opèrent pour effectuer la mitose. Tous ces processus sont étroitement contrôlés dans le temps et dans l'espace, par de nombreuses voies de signalisations (phosphorylation, ubiquitination, dégradation protéolytiques) régulant divers programmes transcriptionnels et traductionnels. Dans les prochaines sections, nous passerons en revue les différentes étapes du cycle cellulaire, ainsi que ses différentes voies de régulation.

1.1.1 Les phases du cycle cellulaire et points de contrôles

1.1.1.1 L'interphase

L'interphase est subdivisée en 3 phases : les phases d'intervalles G0/1 et G2 où s'effectuent diverses tâches métaboliques ainsi que la duplication de certaines organelles, et la phase S où prend place la réplication de l'ADN (Figure 1).

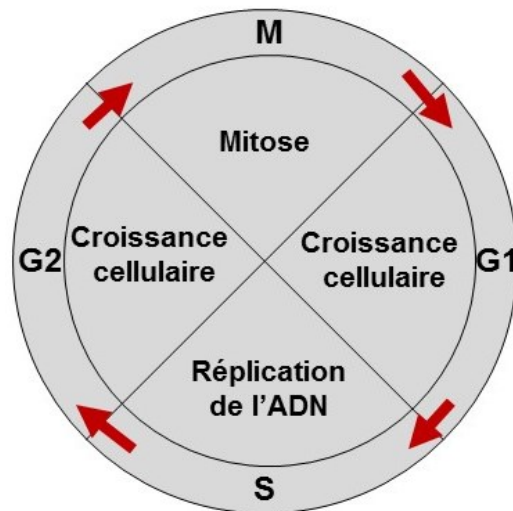


Figure 1. Progression des phases du cycle cellulaire eucaryote

1.1.1.1.1 La phase G0/G1

Durant la phase G1, les cellules ont une forte activité métabolique, elles synthétisent de l'ARN, des protéines et différents métabolites physiologiques nécessaires à la croissance cellulaire. En phase G1 précoce, la cellule doit être stimulé par des facteurs mitogéniques provenant de l'environnement comme l'EGF, ou le TGF- β pour progresser au sein de la phase G1 (Huard et al. 2012). On définit ce moment comme le point de Restriction (point R). Après avoir passé le point R, le cycle cellulaire peut continuer de façon indépendante aux facteurs mitogéniques extérieurs. Dans le cas où les cellules n'ont pas passé le point R, on parle de cellules en phase quiescente ou en phase G0. Ces dernières peuvent demeurer dans cette phase jusqu'à leur réactivation par des facteurs de croissance. Lorsque la phase G0 est irréversible, on parle des cellules sénescents.

Comparé aux autres phases du cycle cellulaire, la phase G1 est plus dépendante du type cellulaire et du contexte. En effet, de nombreux processus biologiques non liés au cycle cellulaire s'opèrent durant cette phase, comme par exemple, un lymphocyte stimulé par un antigène, ou un angioblaste répondant à une blessure vasculaire (Bartkova et al. 2003). Ainsi, au cours de la phase G1, de nombreux stimuli peuvent influencer le destin cellulaire, comme la division, la quiescence, la différenciation, l'auto-renouvellement, ou l'apoptose (Massague

2004). Cependant, indépendamment du type cellulaire ou du contexte, le passage à la phase S nécessite le même prérequis, soit le passage du point R et la production des cyclines D et E.

1.1.1.1.2 La phase S

La phase S ou phase de synthèse, est l'étape où prend place la duplication de l'ADN. Au cours des phase G1 et M, la cellule assemble des complexes *pre-RC* (*pre-Replication Complex*) inactivés sur des sites d'origine de réplication à travers le génome (Tanaka and Diffley 2002; Ballabeni et al. 2004). Durant la phase S, la cellule transforme ces complexes *pre-RC* en fourches de réplication actives et initie la duplication de l'ADN (Diffley and Labib 2002). Les cellules en phase S augmentent également la production d'histones pour emballer l'ADN *de novo* sous forme de nucléosomes. Les histones synthétisées *de novo* sont rapidement incorporées dans de nouveaux nucléosomes, et ce processus est effectué en amont et en aval des fourches de réplication. De plus, les cellules en phase S doivent passer le point de contrôle vérifiant l'intégrité du génome pour poursuivre la progression en phase G2.

1.1.1.1.3 La phase G2

La phase G2 est l'étape qui suit la phase de duplication de l'ADN. La cellule est alors tétraploïde et se prépare à la division mitotique. Afin d'assurer une division cellulaire fidèle et sécuritaire, la cellule vérifie d'abord l'intégrité de son génome. S'en suit une deuxième phase de croissance métabolique et de synthèse protéique pour fournir à la cellule les composantes nécessaires à la mitose. Par exemple, les centrosomes qui sont le centre organisateur des microtubules et donc primordial à la bonne ségrégation des chromosomes, finissent leurs maturations en phase G2 (Mattison and Winey 2006). De même pour les complexes protéiques condensines qui permettent la condensation de la chromatine en chromosome lors de la prophase (Hirano 2005).

1.1.1.2 La mitose

Le processus de mitose, est l'étape où la cellule partage l'ADN précédemment copié pour donner deux cellules filles identiques. La mitose est subdivisée en 5 étapes : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (Figure 2).

1.1.1.2.1 La prophase

Au début de la mitose, les histones H3 et H1 sont massivement phosphorylées (Hans and Dimitrov 2001). Ce signal induit la condensation de l'ADN par les condensines pour former les chromosomes (Antonin and Neumann 2016). Ainsi, les chromosomes commencent à être visible au sein du noyau. Durant ce processus, le nucléole, centre de production des ribosomes, est rompu. D'autre part, les centrosomes entament leurs mouvements dans la cellule pour se rendre aux pôles, et ainsi, le fuseau mitotique commence à s'assembler.

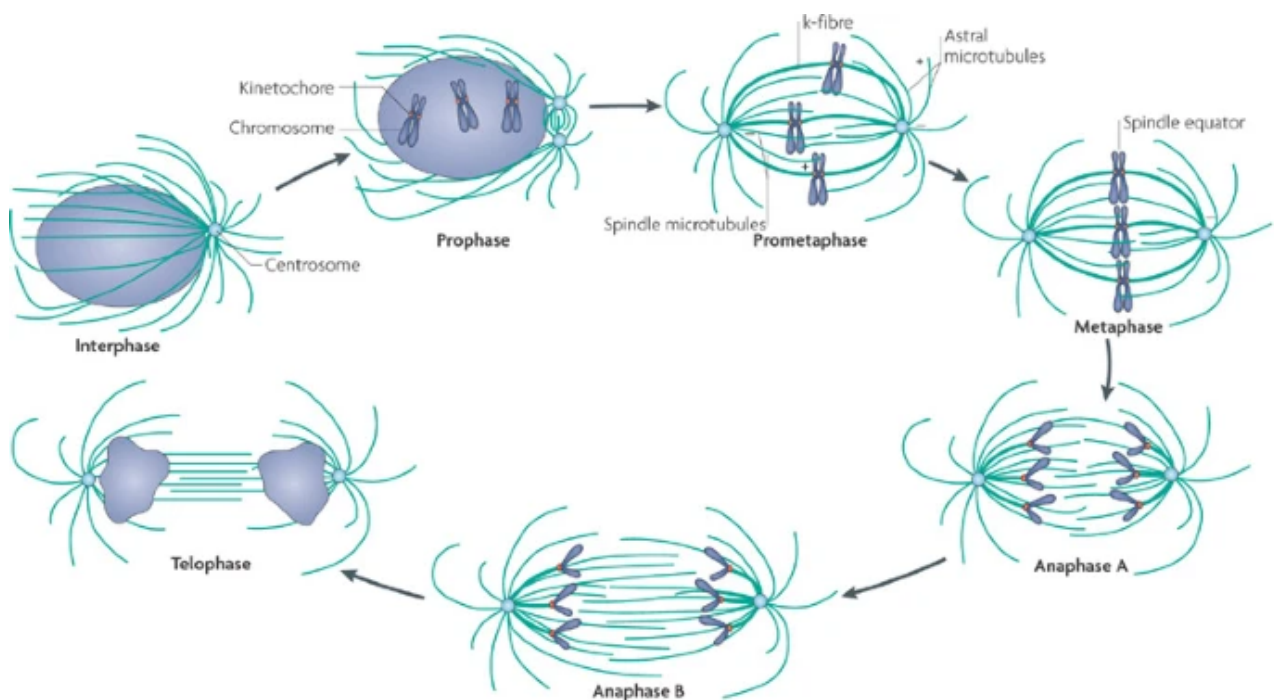


Figure 2. Les étapes de la mitose (Walczak, Cai, and Khodjakov 2010)

1.1.1.2.2 La prométaphase

Une fois les chromosomes formés, la membrane nucléaire est rompue. Les chromosomes sont alors dans le compartiment cytoplasmique, et sont ciblés par les microtubules kinétochoriens provenant des centrosomes. Chaque chromosome est attaché aux deux pôles de la cellule par ses deux chromatides sœurs. Durant la prométaphase, les cellules vont s'arrondir. Ce changement morphologique permet de donner des repères spatiaux à la cellule pour cibler les chromosomes, et pour les aligner sur la plaque équatoriale lors de la métaphase. Pour passer cette étape, chaque chromatide doit être bien attaché à un microtubule kinétochorien.

1.1.1.2.3 La métaphase

Pour garantir une séparation optimale des chromatides sœurs, les chromosomes sont alignés sur la plaque équatoriale de la cellule par le fuseau mitotique. Ce dernier est composé de trois types de microtubules, soit les microtubules astraux, kinétochoriens, ou interpolaires. Les microtubules astraux attachent les centrosomes au cortex cellulaire via les dynéines, générant ainsi une force vers l'extérieur de la cellule. En opposition, les microtubules interpolaires sont liés à des kinésines motrices produisant une force vers l'intérieur de la cellule. La résultante de ces deux forces permet à la cellule d'aligner les chromosomes à l'équateur (Civelekoglu-Scholey and Scholey 2010). Les microtubules kinétochoriens sont ceux qui interagissent directement avec les kinétochores de chaque chromosome et les relie aux centrosomes. Une fois tous les chromosomes alignés et correctement attachés aux microtubules kinétochoriens, le point de contrôle du fuseau mitotique ou SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*) est inactivé, et la mitose continue vers l'anaphase.

1.1.1.2.4 L'anaphase

L'entrée en anaphase est caractérisée par la levée de l'inhibition de la séparase. Cette dernière est une protéase qui hydrolyse les cohésines, libérant ainsi les deux chromatides sœurs (Wirth et al. 2006). Le détachement des chromatides sœurs engendre leurs

ségrégations par une rétractation des microtubules kinétochoriens vers les centrosomes. Les forces générées par les microtubules astraux et interpolaire étirent la cellule, lui donnant ainsi une forme ovale. Les chromatides sœurs se retrouvent alors à proximité de la membrane plasmique et aux pôles opposés de la cellule.

1.1.1.2.5 La télophase

Une fois que les chromosomes atteignent les pôles cellulaires, l'enveloppe nucléaire commence à se reconstituer autour des chromatides pour former le futur noyau. S'en suit la décondensation des chromosomes en chromatine, et le désassemblage du fuseau mitotique. En fin de télophase, apparaît le sillon de division au niveau du cortex cellulaire d'actine, alors la cytokinèse commence. Le sillon de division est composé d'actine et de myosine, et se situe au niveau du plan équatorial de la cellule. Il se rétracte pour atteindre un diamètre de 1-2 μm , séparant ainsi le cytoplasme en deux parties identiques (Fededa and Gerlich 2012). Cependant, les deux cellules filles demeurent interconnectées par un pont cytoplasmique. Ce dernier est éventuellement clivé lors de l'abscission par le désassemblage des protéines cytosquelettiques contenues dans le sillon de division.

1.1.1.3 Les points de contrôle du cycle cellulaire

Des erreurs de réplication de l'ADN en phase S ou des défauts de ségrégation de chromosomes en mitose peuvent engendrer des dommages sur l'information génétique et mener à la mort cellulaire ou à des cancers. Pour prévenir ces phénomènes, la cellule doit passer une série de points de contrôle qui s'étalent sur chaque phase du cycle cellulaire.

1.1.1.3.1 Les points de contrôle de la phase G1

Le premier point de contrôle de la phase G1 est le point Restriction ou point R. Ce dernier régule la progression de la phase G1 en modulant l'expression d'acteurs clés du cycle cellulaire, les cyclines, qui interagissent et activent les CDK (Cyclin-dépendant kinases). En

phase G1, les deux cyclines majeures sont les cyclines D et E. La cycline D interagit avec CDK4 et CDK6, alors que la cycline E est partenaire de CDK2. La cycline D avec CDK4/6 peut phosphoryler la protéine Rb (*Retinoblastoma*). Dans sa forme hypophosphorylée, Rb s'associe avec des facteurs de transcription de la famille E2F. La phosphorylation de Rb par le complexe cycline D-CDK4/6 mène à la dissociation de E2F, permettant ainsi la transcription des gènes codant pour les cyclines D et E, ainsi que d'autres gènes nécessaires au déroulement de la phase S. Le point de Restriction est levé par des facteurs de croissance secrétés qui activent des voies de signalisation en aval et rendent la progression dans le cycle cellulaire indépendante des signaux extracellulaires. Par exemple, lorsque le facteur de croissance EGF (*Epidermal Growth Factor*) se lie à son récepteur l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), et active en cascade la voie des MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), cette dernière mène à l'augmentation de l'expression de la cycline D, et enclenche l'entrée irréversible dans le cycle cellulaire (Cowley et al. 1994) (Figure 3).

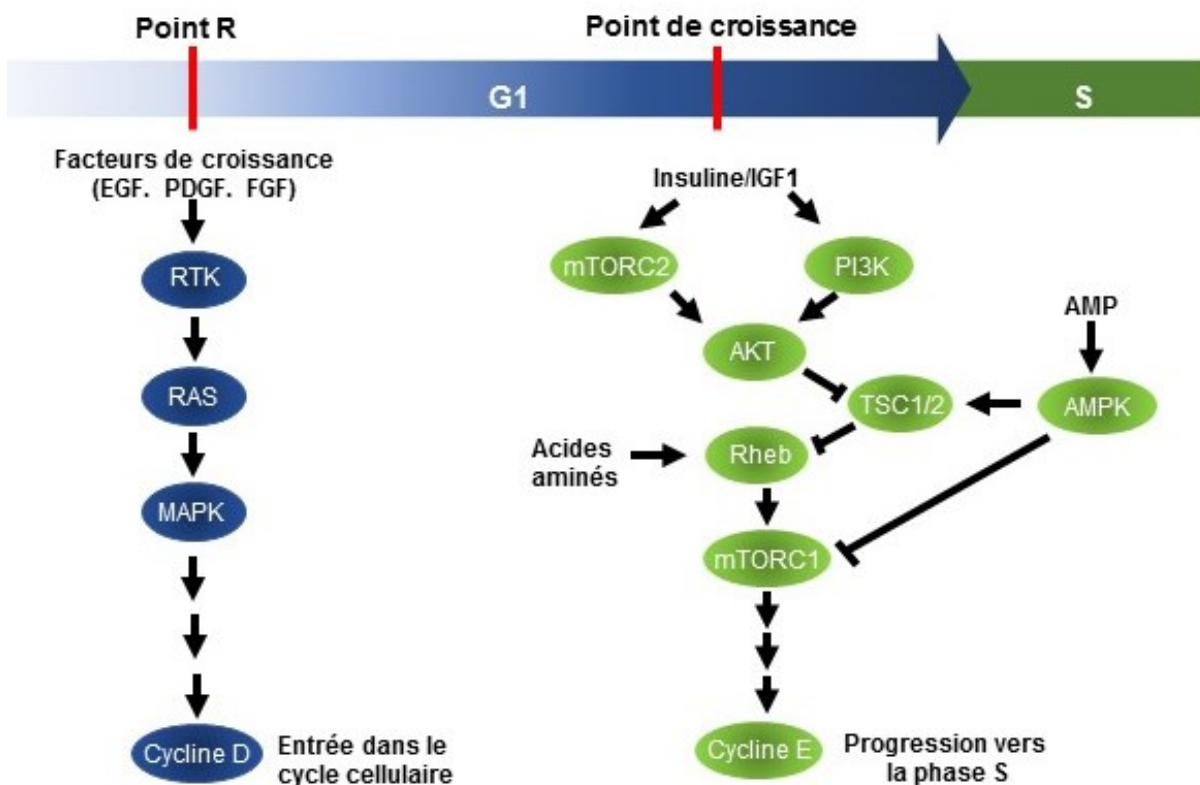


Figure 3. Voies de signalisation impliquées dans l'engagement de la phase G1 (Foster et al. 2010)

Le second point de contrôle de la phase G1, est le point de contrôle de croissance cellulaire. Alors sont vérifiés les besoins nutritionnels et énergétiques de la cellule avant l'engagement dans la suite du cycle cellulaire. Les niveaux d'acides aminés et d'ATP intracellulaires peuvent moduler l'activité du complexe protéique mTORC1 (*Mammalian Target of Rapamycin Complex 1*) (Figure 3) (Gwinn et al. 2008). Par exemple, un déficit en acides aminés essentiels arrête le cycle cellulaire en phase G1, de façon similaire à la rapamycine, un inhibiteur de la voie mTORC1 (Schmelzle and Hall 2000; Avruch et al. 2009). Cette voie de signalisation peut être modulée par différents facteurs en amont qui participent à l'homéostasie énergétique cellulaire, comme l'insuline, l'IGF-1 (*Insulin Growth Factor-1*), ou encore l'AMPK (*AMP-activated protein kinase*) en favorisant l'entrée de glucose et d'acide gras dans la cellule (Pollak 2008; Gwinn et al. 2008). La baisse d'activité de mTORC1 empêche l'inactivation de p27^{KIP} (Soucek, Yeung, and Hengstschlager 1998). L'inactivation de p27^{KIP} est nécessaire à la transition en phase S via le complexe cycline E-CDK2 (Sherr and McCormick 2002). De façon intéressante, l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 par déprivation, distingue le point R du point de contrôle de croissance cellulaire. En effet, le point R est activé par une déprivation en facteur de croissance provenant du milieu extracellulaire, alors que le point de contrôle de croissance cellulaire est enclenché par une déprivation métabolique intracellulaire. Avant l'entrée en phase S, toutes les lésions sur l'ADN peuvent provoquer un arrêt du cycle cellulaire en phase G1. La présence de dommages sur l'ADN active les kinases ATM et ATR qui phosphorylent plusieurs substrats impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN ainsi que le facteur de transcription p53, un facteur essentiel dans l'arrêt cellulaire (Wang, Simpson, and Brown 2015). Une fois activé, p53 induit la transcription de p21^{CIP}, un inhibiteur de cycline E-CDK2, et bloque ainsi la transition en phase S et une potentielle dérive du matériel génétique (LaBaer et al. 1997).

1.1.1.3.2 Point de contrôle de la phase S

Le point de contrôle de réplication est activé lorsque la progression des fourches de réplication devient bloquée en réponse à divers stress, tels qu'un déficit en désoxyribonucléotides, une inhibition chimique de l'ADN polymérase, ou une collision de fourche de réplication causé par de l'ADN endommagé et/ou avec des structures aberrantes. Cependant, le point de contrôle de réplication peut aussi être activé par une cassure d'ADN double brin indépendante des fourches de réplication, et on parle alors de point de contrôle intra-S. Ces deux points de contrôle sont composés des mêmes acteurs moléculaires (RPA, ATR, ATRIP, RAD17, RAD9, RAD1, HUS1) orchestrés par la kinase ATR (Figure 4) (Liao et al. 2018).

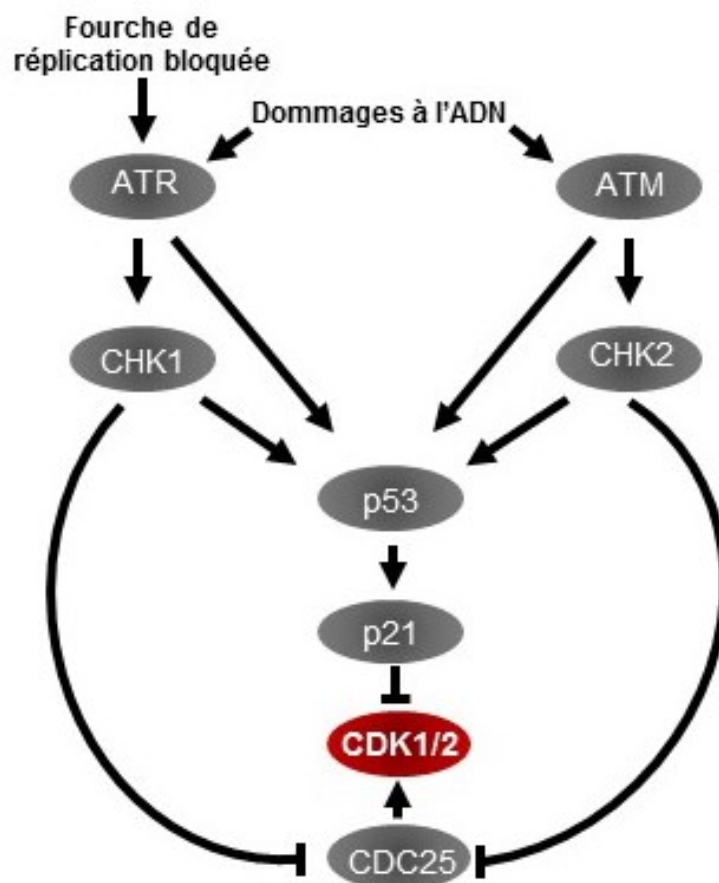


Figure 4. Voies de signalisation de la réponse aux dommages à l'ADN (Ronco et al. 2017)

Une fois activée, la réplication de l'ADN est inhibée par le complexe CDC7-DBF4 qui se lie aux origines de réplication (Jares, Donaldson, and Blow 2000). De plus, le point de contrôle assure l'intégrité des fourches de réplication et permet la reprise du cycle cellulaire après la réparation des dommages à l'ADN (Lopes et al. 2001). La prévention de l'entrée en phase G2 est maintenue par la kinase Chk1, qui est activée par ATR (Zhao and Piwnicka-Worms 2001). Chk1 phosphoryle et inhibe la phosphatase CDC25c, qui a pour substrat CDK1 (Ronco et al. 2017). Ainsi, Chk1 maintient indirectement l'inhibition de CDK1 et prévient toute division cellulaire avec un génome partiellement répliqué.

1.1.1.3.3 Point de contrôle de la phase G2

Durant la phase G2, l'intégrité du génome est analysée une dernière fois avant la division cellulaire. Les dommages à l'ADN, tel que les cassures simples ou double brin provoquent l'activation de Chk1/2 via ATM/ATR, de façon similaire au point de contrôle intra-S (Ronco et al. 2017). Outre ATM/ATR, p53 peut aussi être activé par des dommages à l'ADN en phase G2. En effet, il a été montré que la surexpression de p53 dans des cellules humaines en absence de stress bloque les cellules en phase G2 (Agarwal et al. 1995). Ainsi, p53 peut moduler l'activité de CDK1 en régulant l'expression de la cycline B1, ou de Gadd45, prévenant alors l'entrée en mitose (Taylor et al. 1999).

1.1.1.3.4 Les points de contrôle de la phase M

Le premier point de contrôle de la mitose, le SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*), prend place au cours de la prométaphase. Il est principalement composé de MAD2, CDC20, BuBR1, et BUB3 (Musacchio 2015). La fonction du SAC est de prévenir la perte de cohésion des chromatides sœurs et aussi d'empêcher la ségrégation des chromosomes lorsqu'ils présentent des défauts d'attachement aux microtubules kinétochoriens. Le SAC est activé dans la cellule par la présence de kinétochores non-attachés au fuseau mitotique, et peut être induit par des molécules interférant avec la polymérisation des microtubules, tels que le paclitaxel ou le nocodazole. Le SAC maintient le complexe APC/C^{cdc20} (Anaphase Promoting

Complex) inactif jusqu'à ce que l'attachement entre les chromosomes et les microtubules kinétochorien soit correct. La levée d'inhibition de l'APC/C^{cdc20} induit l'avancée de la métaphase à l'anaphase puis à la sortie de la mitose. En effet, APC/C^{cdc20} provoque la dégradation de la cycline B et de la sécurine, marquant la fin de la mitose. Ainsi, le SAC préserve les futures cellules filles d'altérations chromosomiques pouvant survenir au cours du processus mitotique.

Un dernier point de contrôle opère en télophase, à l'étape d'abscission. Il est activé lorsque des ponts chromatiniens se retrouvent au niveau de l'anneau contractile ou du corps intermédiaire. Il est principalement composé de ANCHR, CHMP4C, ULK3, et inhibe les protéines effectrices de l'abscission, tel que VPS4 et ESCRT-III (Nahse et al. 2017). La présence de pont chromatiniens à cette étape de la mitose peut provoquer un échec de l'abscission et générer une cellule tétraploïde (Steigemann et al. 2009), ou alors mener à la formation de micronoyaux dû à une cassure du brin d'ADN (Carlton et al. 2012). Dans les deux cas, ces phénomènes sont délétères pour la cellule et peuvent mener au développement du cancer.

1.1.2 Régulation post-traductionnelle

La progression à travers le cycle cellulaire occasionne des changements majeurs dans la cellule, tant dans sa morphologie, que dans la variété des processus engagés (condensation de la chromatines, réplication de l'ADN, duplication des organites, ségrégation des chromosomes). Chez les cellules eucaryotes, ces mécanismes sont étroitement régulés dans l'espace et dans le temps par une série de modifications post-traductionnelles, tel que la phosphorylation et l'ubiquitination. Ainsi, le cycle cellulaire peut être considéré comme une série d'événements biochimiques réversibles, ce qui crée un problème fondamental : comment s'assurer qu'une cellule passe de l'étape B à l'étape C sans revenir à l'étape A ? En d'autres termes, comment la directionnalité est-elle créée ? La solution vient de la dégradation des protéines nécessaires à une étape précédente, car la protéolyse rapide d'une protéine lentement synthétisée fournit un mécanisme irréversible qui bloque le retour, faisant ainsi

avancer le cycle. Dans la prochaine section, nous approfondirons le rôle essentiel de la phosphorylation lié au complexe cycline-CDK ainsi que l'ubiquitination et la dégradation protéolytique associée au cycle cellulaire.

1.1.2.1 Les complexes cycline-CDK

La régulation du cycle cellulaire par les complexes cycline-CDK a été bien établie grâce aux études sur les levures. Dans ces organismes, la progression du cycle cellulaire est contrôlée par une seule CDK (Cdc28 chez *Saccharomyces cerevisiae* et Cdc2 chez *Schizosaccharomyces pombe*) qui se lie à des cyclines spécifiques exprimées à différents stades du cycle (Malumbres and Barbacid 2009). Les protéines CDK sont des kinases de la famille CMCG et phosphoryle des résidus Sérine ou Thréonine précédents une Proline. Leur activité est contrôlée par la liaison de sous-unités régulatrices appelées cyclines. Les cyclines sont synthétisées et détruites à des moments spécifiques du cycle cellulaire, régulant ainsi l'activité kinase des CDK à travers le temps. Le génome humain contient respectivement 13 et 25 locus codant pour des CDK et des cyclines, mais seule une partie d'entre elles sont directement impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Malumbres and Barbacid 2005). Parmi celles-ci, on retrouve 3 CDK d'interphase (CDK2, CDK4, CDK6), 1 CDK mitotique (CDK1 ou cdc2), et 10 cyclines appartenant à 4 différentes classes (les cyclines A-, B-, D-, et E-) (Figure 5). Alors que les cyclines ont la capacité d'activer les CDK, les CKIs (*Cyclin-dependent kinase inhibitor*) les restreignent. Les CKI sont divisées en deux classes selon leurs structures et leurs spécificités envers les CDK : la famille Ink4 avec p16^{INK4b}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} et p19^{INK4d} inhibent CDK4 et CDK6 tandis que la famille Cip/Kip avec p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, et p57^{Kip2} inhibent l'activité des kinases dépendantes des cyclines D, E, et A (Sherr and Roberts 1999). En somme, les complexes cycline-CDK sont responsables de la conduite séquentielle et ordonnée des divers événements nécessaires à la progression du cycle cellulaire.

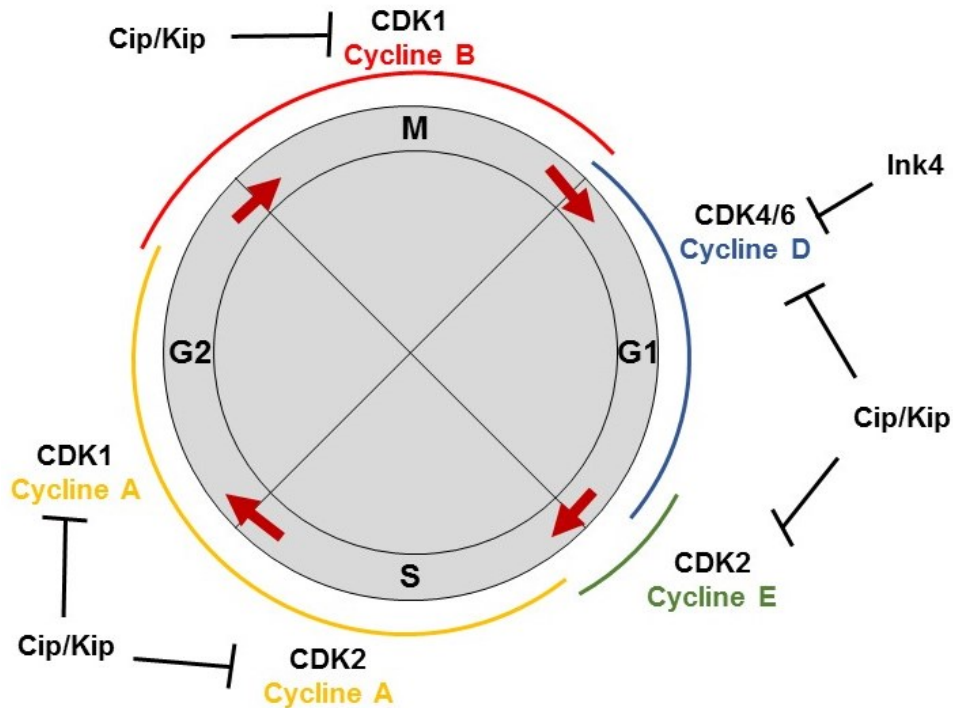


Figure 5. Activité des complexes cycline-CDK et CKI au cours des phases du cycle cellulaire.

Dans les cellules quiescentes ou en phase G0, l'expression des cyclines de type D (D1, D2, et D3) est faible. De plus, CDK4/6 et CDK2 sont respectivement inhibées par p16^{INK4b} et p21^{Kip1} (Goel et al. 2018). Lorsque la cellule reçoit un stimulus mitogénique, comme un facteur de croissance, les niveaux de cycline D augmentent pour lier les kinases CDK4/6, formant ainsi un complexe actif. L'activation de ces complexes conduit à une inactivation partielle des protéines Rb (RBL1 ou p107 et RBL2 ou p130), et promeut l'expression des cyclines de type E (E1 et E2) qui activent CDK2. Les complexes cycline E-CDK2 phosphorylent une nouvelle fois les protéines Rb, conduisant à leur inactivation complète et la transition définitive vers la phase S (Lundberg and Weinberg 1998) . La disponibilité de la cyclines E au cours du cycle cellulaire est étroitement contrôlée et limitée aux premiers stades de la synthèse de l'ADN. CDK2 est ensuite activée par la cycline A2 (cycline A1 dans les cellules germinales) au cours des derniers stades de la réplication de l'ADN, puis mène à la transition vers la phase G2. Enfin, CDK1 est activée par les cyclines de type A à la fin de l'interphase pour faciliter le

début de la mitose. Après la décomposition de l'enveloppe nucléaire, les cyclines A sont dégradées, facilitant la formation des complexes cycline B-CDK1 nécessaire à l'avancé du cycle cellulaire en mitose (Malumbres and Barbacid 2005).

Toutes les kinases appartenant à la famille des CDK sont caractérisées par un site catalytique conservé et constitué d'une poche de liaison à l'ATP, un domaine de liaison aux cyclines sous forme d'hélice (PSTAIRE) et d'une boucle d'activation (*T-loop*) (Malumbres and Barbacid 2005). La liaison d'une cycline à sa CDK via l'hélice PSTAIRE déplace la boucle d'activation et expose l'interface de liaison au substrat. La plupart des CDK possèdent également des sites de phosphorylation inhibiteurs (thréonine 14, T14 ; tyrosine 15, Y15 pour CDK1) et activateurs (thréonine 161, T161 pour CDK1). La phosphorylation des résidus T14 et Y15 dans le site de liaison à l'ATP est effectué par les kinases inhibitrices Wee1 et Myt1 et interfère avec le positionnement de l'ATP. La phosphorylation de la boucle d'activation sur le résidu T161 par les kinases activatrices de CDK (CAK) améliore la liaison au substrat ainsi que la stabilité du complexe, permettant l'activation complète de la CDK (Atherton-Fessler et al. 1993; Pavletich 1999). Contrairement à la famille CDK, les cyclines appartiennent à un groupe remarquablement diversifié de protéines classées uniquement sur l'existence d'un motif cycline (*cyclin box*) qui sert à la liaison aux CDK (Gopinathan, Ratnacaram, and Kaldis 2011). Les variations de séquence en dehors du motif cycline permettent une régulation différentielle et une diversité fonctionnelle. Ainsi les complexes cyclines-CDK du cycle cellulaire peuvent phosphoryler une myriade de substrats ayant des rôles directs dans la bonne poursuite du cycle cellulaire. Les complexes CDK de l'interphase (cycline D-CDK4/6, cycline E-CDK2) phosphorylent des substrats impliqués dans la réplication de l'ADN, la réparation de l'ADN, la maturation/ségrégation des centrosomes, et dans la régulation protéolytique. Le complexe cycline A- ou B-CDK1 phosphoryle un large spectre de substrats touchant la condensation et la dynamique des chromosomes, la fragmentation de l'appareil de Golgi, la dégradation de l'enveloppe nucléaire, la protéolyse, ainsi que la cytokinèse.

1.1.2.2 Le complexe SCF

L'ubiquitination remplit des fonctions essentielles dans la régulation de nombreux processus biologiques chez les cellules eucaryotes (e.g. progression du cycle cellulaire, inflammation, présentation d'antigène). L'ubiquitination consiste en la formation d'une chaîne polypeptidique de 76 résidus (ubiquitine) sur une lysine d'un substrat. Les substrats marqués par la lysine 48 sont sélectivement ciblés par le protéasome 26S. L'ubiquitination entraîne la formation d'une liaison entre l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine et le groupe ϵ -amino d'un résidu de lysine provenant du substrat (Hershko et al. 1983). Cette réaction nécessite les actions séquentielles de trois enzymes : une enzyme d'activation (E1) qui forme un ester thiol avec le groupe carboxyle, activant ainsi l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine pour l'attaque nucléophile ; une enzyme de conjugaison (E2) qui porte de manière transitoire la molécule d'ubiquitine activée sous forme d'ester de thiol ; et une ligase (E3) qui transfère l'ubiquitine activée de l'E2 au résidu lysine du substrat (Hershko et al. 1983). Ce mécanisme de régulation joue un rôle primordial dans la progression du cycle cellulaire, et est principalement effectué par les complexes SCF (*Skp, Cullin, F-box containing complex*) et APC/C (*Anapahse-Promoting Complex*) (Pickart 2001).

Le complexe SCF est constitué de trois composants invariables, soit RBX1, CUL1 et SKP1. RBX1 est l'ubiquitine ligase de type E3 du complexe, CUL1 est une protéine d'échafaudage et SKP1 est une protéine adaptatrice. En plus de ces trois composantes invariables, un coactivateur variable, connu sous le nom de protéine F-box, se lie via son motif F-box à SKP1 et est responsable de la reconnaissance du substrat. Environ 70 protéines putatives F-box ont été identifiées chez l'humain, et au moins 4 d'entre elles sont impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire : SKP2, FBXW7, β -TRCP et la cycline F. Le complexe SCF intervient dans la dégradation des protéines du cycle cellulaire au cours de la progression de la phase G1 tardive à la phase S jusqu'au début de la mitose (Figure 6) (Nakayama and Nakayama 2005). Les substrats importants comprennent la cycline D et la cycline E ; les régulateurs transcriptionnels MYC, E2F1 et p130 ; les inhibiteurs de CDK p27^{Kip1} et p21^{Cip1} ; et la kinase WEE1. WEE1 désactive les complexes cycline B-CDK1. Par conséquent, la

protéolyse induite par le complexe SCF promeut l'entrée des cellules en phase S et M, ainsi que l'achèvement de la phase S.

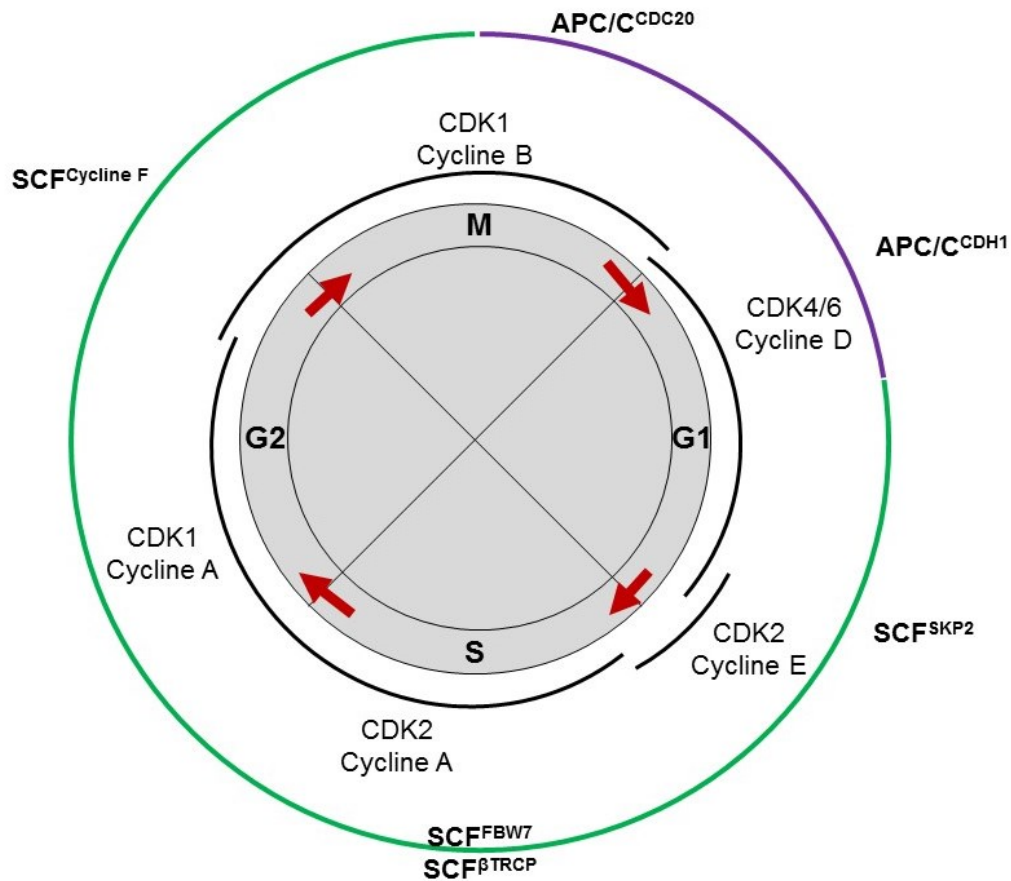


Figure 6. Activités des complexes ubiquitine ligase au cours des phases du cycle cellulaire

1.1.2.3 Le complexe APC/C

Le complexe APC/C est formé de plusieurs composants invariables, et sont structurellement similaires aux composants des complexes SCF. APC11 est l'ubiquitine ligase de type E3, et APC2 est la protéine d'échafaudage ressemblant à CUL1 (Yamano 2019). De façon semblable au complexe SCF, APC/C contient un coactivateur variable qui confère une spécificité au substrat. Deux de ces coactivateurs variables fonctionnent dans le cycle cellulaire : CDC20 et CDH1. APC/C^{CDC20} médie la dégradation des substrats pendant la mitose, tandis que APC/C^{CDH1} fonctionne principalement en phase G1 (Figure 6). Les substrats

clés d'APC/C^{CDC20} sont la cycline A et la cycline B. Avec l'apparition de l'anaphase, l'activation d'APC/C^{CDH1} conduit à la dégradation de CDC20, et des kinases PLK1 et Aurora.

Les complexes SCF et APC/C assure l'avancement du cycle cellulaire en ciblant la dégradation spécifique de substrats (cyclines, kinases/phosphatases) provoquant la transition à la phase suivante. La restriction de l'activité de ces complexes ubiquitine ligase à des phases spécifiques est essentiel à une progression unidirectionnelle du cycle cellulaire. Ainsi, SCF et APC/C se corégule afin d'éviter toute co-activation au cours de la même phase (Vodermaier 2004). A la transition G1/S, l'inhibition du complexe APC/C^{CDH1} s'effectue par le complexe SCF^{cycline F} qui induit la dégradation de CDH1. Au début de la mitose, l'activation de APC/C^{CDC20} est induite par la dégradation d'un de ses inhibiteurs FBXO5 (ou EMI1), qui est ciblé au protéasome via SCF ^{β -TRCP}. Enfin entre la mitose et la phase G1 APC/C^{CDH1} proscrit l'action du complexe APC/C^{CDC20}, en ciblant CDC20 au protéasome.

1.1.3 Régulation transcriptionnelle

L'entrée et la progression du cycle cellulaire nécessitent que des gènes spécifiques soient exprimés à certains moments. Les cellules en prolifération requièrent l'expression de gènes spécialisés pour la synthèse de l'ADN pendant la phase S et pour la division cellulaire en mitose. Ces gènes dépendants du cycle cellulaire ne sont généralement pas indispensables à la survie des cellules quiescentes. En effet, l'expression de plus de 1000 gènes dépendants du cycle cellulaire est presque absente pendant la quiescence. Il existe deux grandes vagues d'expression génique, une se produisant juste avant l'entrée en phase S et la seconde juste avant l'entrée en mitose.

Lorsque la prolifération cellulaire est déclenchée par les conditions de croissance et que les cellules quittent la quiescence, la signalisation des mitogènes conduit à l'activation du facteur de transcription Myc (Kress, Sabo, and Amati 2015). Myc a la capacité de stimuler la prolifération cellulaire en augmentant la transcription des gènes codant pour la cycline D et

CDK4/6. De plus, Myc augmente la production de protéines et d'ARN ribosomiques, entraînant une augmentation de la biogenèse et de la traduction des ribosomes permettant ainsi de conduire la croissance cellulaire. À la suite de l'entrée dans le cycle cellulaire, les complexes cycline D-CDK4/6 formés monophosphorylent la protéine Rb. À la fin de la phase G1, les complexes cycline E-CDK2 phosphorylent la forme Rb monophosphorylé, conduisant à la libération et à l'activation des facteurs de transcription de type E2F (E2F1-E2F3) (Figure 7) (Narasimha et al. 2014). La liaison de la protéine Rb aux facteurs de transcription E2F (E2F1-E2F3) bloque l'induction des gènes de la phase S médiée par E2F. E2F activé se dimérise avec DP1 ou DP2, et se lie aux régions promotrices des gènes nécessaires à la synthèse de l'ADN, favorisant ainsi leur expression au cours de la phase G1 et de la phase S. À la fin de la phase S, E2F7 et E2F8, qui sont eux-mêmes des cibles E2F, remplaceront E2F1-E2F3 et serviront à réprimer l'expression des gènes de la phase G1/S lorsque la synthèse de l'ADN sera terminée (Bertoli, Skotheim, and de Bruin 2013).

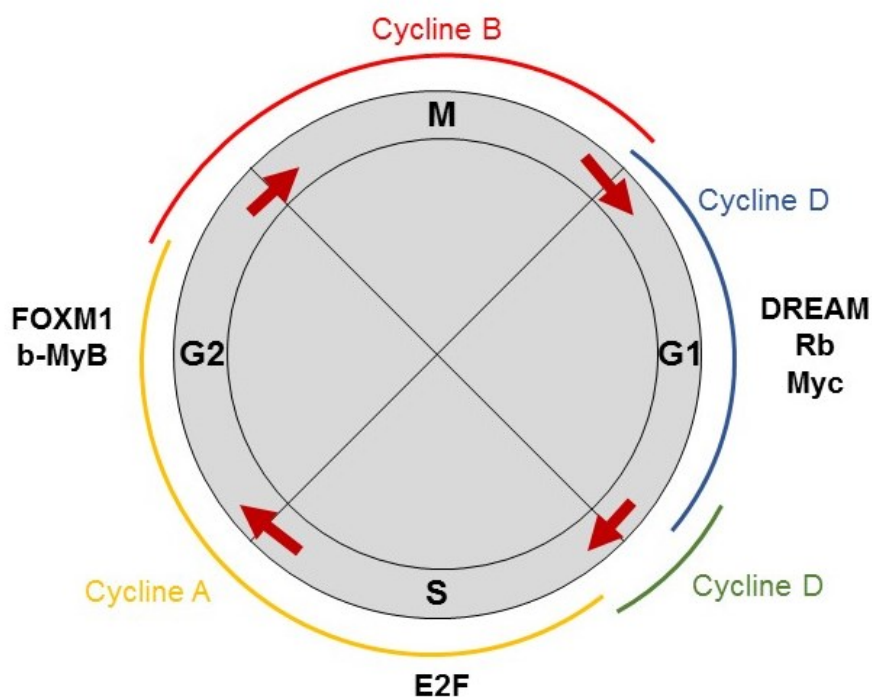


Figure 7. Activité des facteurs de transcription au cours des phases du cycle cellulaire

Un autre acteur clé dans le déclenchement du programme transcriptionnel nécessaire à la phase S, est le complexe DREAM (*Dimerization partner, RB-like, E2F And Multi-vulval*

class B). Chez l'humain, le complexe DREAM est constitué d'homologue de la protéine Rb RBL1 (p105), RBL2 (p130) qui interagissent avec les facteurs de transcriptions E2F4/5, DP1/2 ainsi qu'avec et le complexe MuvB (composé de LIN9/37/52/54, et RBBP4). Le complexe DREAM contribue à l'expression à la fois de gènes spécifiques aux phases S et M (Fischer et al. 2016). Ces gènes possèdent des éléments spécifiques dans leurs promoteurs qui vont être reconnu soit par les facteurs de transcriptions E2F ou MuvB. Dans les promoteurs de nombreux gènes de la phase S, on retrouve des séquences reconnues par E2F. De façon similaire, les gènes de phase M possèdent des éléments distinctifs dans leurs nommé région d'homologie des gènes du cycle cellulaire (CHR) et permet la liaison spécifique du complexe MuvB. En fin de phase S, le complexe DREAM est libéré des facteurs de transcription E2F et la sous-unité MuvB s'associe à b-MyB formant le complexe MMB. Ce dernier induit la transcription des gènes qui possèdent des éléments CHR dans leurs promoteurs. Ces gènes sont fortement exprimés en phase G2/M, et codent pour des protéines qui remplissent des fonctions essentielles en mitose. De plus, le complexe MMB recrute FOXM1, un troisième facteur de transcription, qui entraîne l'expression d'autres gènes importants pour les phases G2/M. L'inhibition de l'activité de ces facteurs de transcription b-MyB et FOXM1 est provoqué par leurs dégradation via le complexe APC/C. Dans les cellules quiescentes, le complexe DREAM réprime l'expression génique nécessaire à l'avancé du cycle cellulaire, et l'entrée en phase G1 entraîne l'activation du complexe DREAM avec les facteurs de transcription E2F.

Tout comme les régulations post-traductionnelles du cycle cellulaire, les contrôles transcriptionnels prennent une part importante dans la progression unidirectionnelle des phases du cycle cellulaire. En effet, l'activité séquentiel des facteurs de transcriptions Myc, E2F, b-MyB et FOXM1 conditionne l'avancement du cycle cellulaire en induisant l'expression des cyclines (Beier et al. 2000), ou encore des sous-unités des complexe SCF ou APC/C (Zhang and Wang 2006). La temporalité de ces évènements transcriptionnelles est principalement orchestrée par les complexes cyclines-CDK, APC/C et SCF dictant l'avancée sécuritaire du cycle cellulaire.

1.1.4 Régulation post-transcriptionnelle

Comme nous l'avons vu précédemment, la progression au cours cycle cellulaire requiert l'expression de gènes spécifiques à des moments précis. Outre les régulations au niveau post-traductionnel (phosphorylation, protéolyse dépendante de l'ubiquitination) et transcriptionnel, les cellules peuvent aussi moduler l'expression génique au niveau post-transcriptionnel. En effet, pour qu'un transcrit soit éventuellement traduit, il doit être épissé puis mûri avec un chapeau méthyl en 5'UTR, une queue polyA en 3'UTR, pour être ensuite exporté dans le cytoplasme. Ces processus impliquent de nombreuses protéines avec des fonctions biochimiques très diverses, et offre à la cellule un niveau de régulation supplémentaire et complémentaire aux régulations effectuées sur l'ADN ou sur les protéines.

1.1.4.1 La traduction et le complexe eIF4F

La traduction des ARNm en protéines est effectuée par les ribosomes et se produit en trois étapes, l'initiation, l'élongation et la terminaison. L'initiation est la phase la plus régulée et la plus limitante de la traduction (Gebauer and Hentze 2004). Elle consiste en l'assemblage d'un ribosome 80S sur le codon d'initiation de l'ARNm. L'activation du complexe de pré-initiation dépend de la présence d'une coiffe (ou *cap*) à l'extrémité 5' de l'ARNm. Cette coiffe, constituée d'une 7-méthylguanosine, est reconnue puis liée par le complexe eIF4F (composé de eIF4E, eIF4A et eIF4G), permettant l'export des ARNm du noyau vers le cytoplasme et l'initiation de la traduction. Bien que le complexe eIF4F régule la traduction à l'échelle globale, chaque sous-unité semble également moduler la traduction de sous-ensembles spécifiques de transcrits. Par exemple, eIF4E et eIF4A peuvent affecter la traduction des ARNm *Myc*, des *cycline D/E* (Culjkovic-Kraljacic and Borden 2018). Tandis que les niveaux d'expression de eIF4G régulent la traduction d'une sous-unité essentielle du complexe SCF, *skp2* (Ramirez-Valle et al. 2008). Ainsi le complexe eIF4F semble important dans la progression du cycle

cellulaire, et plus particulièrement au cours de la transition G1/S. En effet, il a été montré que la traduction dépendante de la coiffe, et donc du complexe eIF4F, est inhibée durant la mitose (Kronja and Orr-Weaver 2011). A défaut, les ribosomes sont recrutés par des séquences IRES (*internal ribosome entry site*) présentes sur les ARNm. Ce recrutement implique d'autres facteurs d'initiation que le complexe eIF4F, et présente une large variété de protéines pouvant lier les ARNm. De façon intéressante, au début de l'interphase, les voies de signalisation mTOR et RAS/MAPK stimulent la traduction dépendante de la coiffe (Roux and Topisirovic 2018), tandis que plus tard en phase G2/M, le complexe cycline B-CDK1 inhibe la traduction via la phosphorylation de eIF4G (Dobrikov et al. 2014). Ceci illustre bien l'interconnexion existante entre les différents niveaux de régulation régissant la progression du cycle cellulaire.

1.1.4.2 Régulation de la production des histones par SLBP

La progression à travers le cycle cellulaire mitotique implique la duplication du contenu en ADN et sa compaction par des histones produites *de novo* en phase S. Différentes protéines d'histones s'oligomérisent en octamère pour former un nucléosome permettant de condenser l'ADN en chromatine. Ceci est essentiel pour le maintien et la réplication des chromosomes et la régulation de l'expression des gènes. L'expression des histones est coordonnée avec la synthèse de l'ADN et est limitée à la phase S. En effet on retrouve environ 35 à 50 fois plus d'ARNm codant pour les histones pendant la phase S que pendant toute autre phase (Marzluff and Duronio 2002). La protéine SLBP est impliquée dans le contrôle de l'expression des histones (Wang et al. 1996 ; Martin et al. 1997). SLBP est une protéine dont l'expression est restreinte en phase S (Whitfield et al. 2000 ; Zheng et al. 2003). SLBP se lie à la structure en épingle à cheveux (*3'loop*) hautement conservée se situant dans la partie non codante de l'ARNm d'histone à l'extrémité 3'. Cette structure en épingle à cheveux est nécessaire à la traduction et à la stabilisation des ARNm d'histones (Muller and Schumperli 1997). Des études biochimiques ont montré que SLBP est requise pour la formation d'extrémité 3' des ARNm d'histone. Après la transcription des gènes d'histones en pre-ARNm, SLBP se lie aux structures en épingle à cheveux, parallèlement la protéine U7 snRNP

s'apparie à des séquences spécifiques en aval de l'ARNm, connues sous le nom d'histone *downstream element* (Mowry and Steitz 1987). Ces deux protéines associées à l'ARNm d'histone permettent le recrutement d'une endonucléase CPSF-73, qui s'occupe de terminer la maturation des ARNm d'histone en clivant le pre-ARNm (Dominski, Yang, and Marzluff 2005). SLBP est un facteur essentiel à l'expression des histones. En effet, il a été montré que la perte de fonction de SLBP mène à une restriction de l'expression des gènes d'histones durant la phase S (Zheng et al. 2003).

1.1.4.3 Les microARN

Les microARN (miARN) sont une classe d'ARN non codants exprimés de manière endogène et qui contrôlent la stabilité et la traduction des ARNm codant pour les protéines (Ambros 2004). Ces petits ARN sont incorporés dans des complexes miARN-protéine qui lient la région non traduite en 3' (3'UTR) des ARNm cibles (Fabian, Sonenberg, and Filipowicz 2010). Ce processus permet d'inhiber la traduction ou de déstabiliser les transcrits cibles, entraînant une régulation négative de la protéine codée par l'ARNm respectif. Les estimations bio-informatiques suggèrent que plus de 30 à 60% du génome humain peut être soumis à une régulation par les miARN (Friedman et al. 2009). En modulant l'expression du transcrit cible, les miARN peuvent donc affecter de nombreuses voies de signalisation et processus cellulaires, tels que la prolifération, la différenciation ou l'apoptose (Inui, Martello, and Piccolo 2010).

Le contrôle du cycle cellulaire par les miARN a été mise en évidence par leur potentiel antiprolifératif observé dans les cellules cancéreuses, particulièrement dans la régulation de la transition de phase G1/S. Plusieurs familles de miARN peuvent affecter positivement ou négativement la progression du cycle cellulaire. Par exemple, les familles de miARN miR-15, miR-17 ou encore let-7, ont la capacité d'arrêter le cycle cellulaire en phase G1 en ciblant des effecteurs essentiels, tels que CDK1/2/6, les cyclines D/E, les facteurs de transcription E2F,

Rb et Myc (Bueno and Malumbres 2011). Inversement, d'autres miARN (miR-31, miR-24, miR-106b, miR-222, miR-181, et miR-17-92) stimulent la prolifération en diminuant l'expression d'ARNm codant pour des inhibiteurs du cycle cellulaire, comme p16, p21, p27 et p57 et faciliter les transitions des phase G1/S et S/G2 (Figure 8). Jusqu'à présent, peu de miARN sont connu concernant l'entrée et la progression en mitose. En phase G2/M on retrouve tout de même les miARN let-7, miR-24, miR-125, miR-15, miR-100 qui affectent l'expression des cyclines A/B, des kinase, PLK1, Aurora B, de la phosphatase CDC25A et du complexe APC/C (Figure 8). Parmi ces miARN, seul miR-100 est spécifique à la mitose en régulant l'expression de PLK1, tandis que les autres régulent aussi l'expression des gènes impliqués dans les phases antérieures.

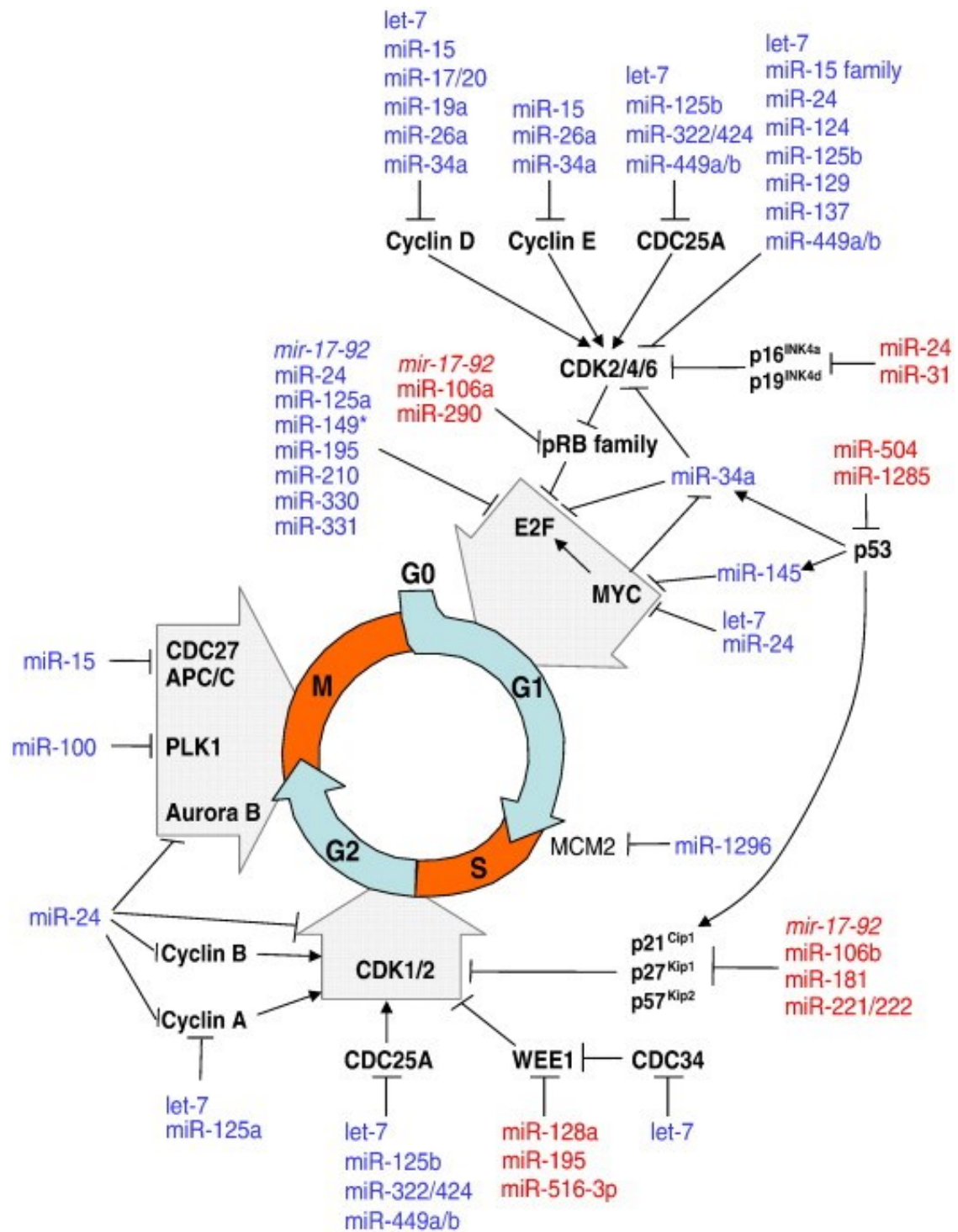


Figure 8. Contrôle du cycle cellulaire par les miARN (Bueno and Malumbres 2011)

1.1.5 Cancer et cycle cellulaire

Le cancer est une pathologie caractérisée par une croissance cellulaire anormale pouvant former des tumeurs dans divers organes et se répandre dans d'autres tissus à travers le corps. Hanahan et Weinberg ont récapitulé les fonctions biologiques déterminantes dans l'oncogenèse, et elles comprennent : une signalisation proliférative accrue, une évasion aux suppresseurs de croissance cellulaire, une résistance à la mort cellulaire, une immortalité répllicative, et une induction des processus métastatiques (Hanahan and Weinberg 2011). Un des traits fondamentaux des cellules cancéreuses est leur capacité à proliférer de façon continue et ceci implique une dérégulation des mécanismes de contrôle du cycle cellulaire.

1.1.5.1 Implications des CDK et des CKI

L'homéostasie dans les tissus adultes humains est caractérisée par un ensemble de cellules souches quiescentes produisant par intermittence des cellules progénitrices filles avec une capacité de prolifération élevée. La quiescence est nécessaire pour éviter l'épuisement prématuré de la capacité de repeuplement des cellules souches adultes au cours de la vie des individus. Des preuves récentes indiquent que des complexes cycline-CDK spécifiques, modulés par, des CKI, peuvent être responsables du maintien de l'état de repos dans différentes populations de cellules souches. Alors que la régulation négative des CDK peut entraîner une homéostasie défectueuse dans des tissus spécifiques, l'hyperactivation des CDK peut favoriser le développement de la tumeur en induisant une division cellulaire non programmée dans des cellules souches ou, éventuellement, des cellules progénitrices.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'activité CDK est régulée par deux familles d'inhibiteurs : les protéines de la famille INK4 (p15, p16, p18, et p19), et Cip/Kip (p21, p27 et p57). L'activité inhibitrice des CKI entraînent une suppression de la croissance cellulaire par l'activation de Rb qui séquestre le facteur de transcription E2F, arrêtant ainsi la progression du cycle cellulaire. Dans les tissus sains humains, ces mécanismes sont constamment activés afin de limiter la croissance des organes et conserver une homéostasie tissulaire. Par

exemple, les contacts intercellulaires médiés par les cadhérines ont la capacité d'induire l'expression de p21 et p27 bloquant les cellules en phase G1 (Levenberg et al. 1999). D'autre part, ces régulateurs sont aussi impliqués dans le contrôle de l'auto-renouvellement des progéniteurs neuronaux, intestinaux et hématopoïétiques (Kippin, Martens, and van der Kooy 2005). Ainsi, la perte de fonction d'une CKI peut mener à des hyperplasies. La mutation de p27 chez la souris mène au développement de tumeurs dans plusieurs types de tissus, ainsi qu'à l'augmentation du nombre de cellules souches et progénitrices (Besson et al. 2007). De façon similaire, les protéines de la famille INK4 font aussi partie des modulateurs l'auto-renouvellement des cellules souches et progénitrices hématopoïétiques, cérébrales, pulmonaires et pancréatiques (Yuan et al. 2004). Dans plus de 30% des cancers, on retrouve des altérations génétiques menant à une perte de fonction de Rb, par le biais de suppression des gènes codant pour les CKI ou par des amplification/mutation des gènes *CDK4/6* ou *Cycline D* (Knudsen et al. 2020). La mutation des gènes *CDK4/6* retrouvée dans les mélanomes et les neuroblastomes rend ces kinases insensibles à leur inhibiteur p16 (Wolfel et al. 1995). En revanche, les gènes *CDK1/2* et les *cyclines E/A/B* sont plus souvent amplifiés que mutés dans les cancers (Bai, Li, and Zhang 2017). En somme, dans les cancers, les voies de contrôle du cycle cellulaire que représentent les complexes cycline-CDK sont souvent altérés et participent de façon importante aux processus de croissance tumorale.

1.1.5.2 Instabilité génomique et dommages à l'ADN

Les cellules cancéreuses possèdent de nombreuses altérations génétiques comparés aux cellules normales, et une des sources, est l'instabilité génomique provoquée par des modifications génétiques sur les gènes codant pour des points de contrôle des dommages à l'ADN du cycle cellulaire. La progression à travers le cycle cellulaire avec de l'ADN endommagé provoque une instabilité génomique et à des réarrangements chromosomiques potentiels (Aguilera and Gomez-Gonzalez 2008). Ces altérations se traduisent non seulement par des avantages prolifératifs mais également par une susceptibilité accrue à l'accumulation d'altérations génétiques supplémentaires qui contribuent à la progression tumorale et à

l'acquisition d'un phénotype plus agressif. Comme vu précédemment, ATM/ATR et Chk1/2 sont les kinases impliquées dans la voie de signalisation moléculaire des dommages à l'ADN menant à l'activation de p53. Dans les cancers, le gène codant pour p53 (*TP53*) présente des mutations inactivatrices dans plus de 50 % des cas (Perri, Pisconti, and Della Vittoria Scarpati 2016). La progression du cycle cellulaire en présence d'ADN endommagé conduit à une augmentation de l'instabilité génomique et favorise la progression tumorale en augmentant la probabilité d'acquérir de nouvelles altérations génétiques avantageuses.

Un autre point de contrôle fréquemment altéré dans les cancers est le SAC. Dans les cancers où l'instabilité génomique est importante de nombreux régulateurs du SAC surexprimés (Kops, Weaver, and Cleveland 2005). D'autres, comme BUB1, BUBR1, MAD1 et MAD2 présentent plus souvent des mutations de perte de fonction (Perez de Castro, de Carcer, and Malumbres 2007). De plus, de nombreuses mutations des gènes codant pour les kinases mitotiques régulant le SAC (Aurora B, PLK, NEK, Lats, TLK) ont été identifiées dans plusieurs types de cancers (Greenman et al. 2007). Une variation positive ou négative de sensibilité du SAC impacte de façon importante la stabilité génomique des cellules proliférantes. Par exemple, chez la souris, la suppression d'une copie du gène *BUBR1* induit le développement rapide d'adénocarcinome pulmonaire et intestinal dû à une perte de sensibilité du SAC (Dai et al. 2004). De façon intéressante, la surexpression transgénique de *MAD2* chez la souris mène à des conséquences similaires d'une perte d'activité du SAC (Sotillo et al. 2007). Dans son ensemble, ces études démontrent que la fonction du SAC est primordiale pour le maintien de la stabilité génétique des cellules normales.

1.1.5.3 La signature du cycle cellulaire dans le cancer

L'essor des techniques de séquençage à haut-débit sur les dernières décennies, a mené à l'analyse en profondeur des altérations génétiques retrouvées dans les cancers humains, en grande partie grâce au projet *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). TCGA a caractérisé plus de 20 000 échantillons tumoraux issus de plus de 30 types de cancers.

L'étude de ces données a abouti à la découverte de nouvelles altérations génétiques non suspectées précédemment, et aussi renseigné sur la fréquence de ces dernières sur les oncogènes et suppresseurs de tumeurs déjà connus, aidant ainsi à la stratification des cancers. Très récemment, Sanchez-Vega et al. ont récapitulé ces observations en analysant la fréquence d'altérations génétiques dans 10 voies de signalisation canoniques impliquées dans les cancers (Sanchez-Vega et al. 2018). Sur l'ensemble des cancers, les voies les plus fréquemment modifiées, soit dans plus de 30 % des cas, sont les récepteurs tyrosine kinase avec RAS, le cycle cellulaire et la voie PI3 kinases (Figure 9). Dans cette étude, les gènes du cycle cellulaire correspondent aux *CKI*, *cyclines D/E*, *CDK2/4/6*, *Rb*, *E2F1/3* et sont altérés dans 45 % des cancers analysés. Récemment, Lundberg et al. ont affiné cette analyse sur les cancers en étendant le terme cycle cellulaire à 463 gènes et en examinant le statut clinique des patients (Lundberg et al. 2020). La stratification des cancers basée sur la signature cycle cellulaire montre une forte corrélation entre une expression élevée des gènes du cycle cellulaire et l'agressivité des cancers et se traduit par une espérance de vie plus faible. De façon intéressante, ce type de relation entre la surexpression de gènes du cycle cellulaire et le cancer a déjà été mis en évidence précédemment dans le cancer du sein. En 2009, Parker et al. ont établi une liste de 50 gènes (PAM50) qui a permis une meilleure classification des sous-types de cancer du sein (Parker et al. 2009). De façon intéressante, 28 de ces 50 gènes (*e.g. Cycline E/B*, *Myc*) sont directement impliqués dans le cycle cellulaire et corrélient fortement avec le sous-type le plus agressif (cancer du sein triple-négatif). En somme, l'expression des gènes du cycle cellulaire prend une part croissante dans la caractérisation moléculaire des cancers humains comme biomarqueurs à visée pronostique.

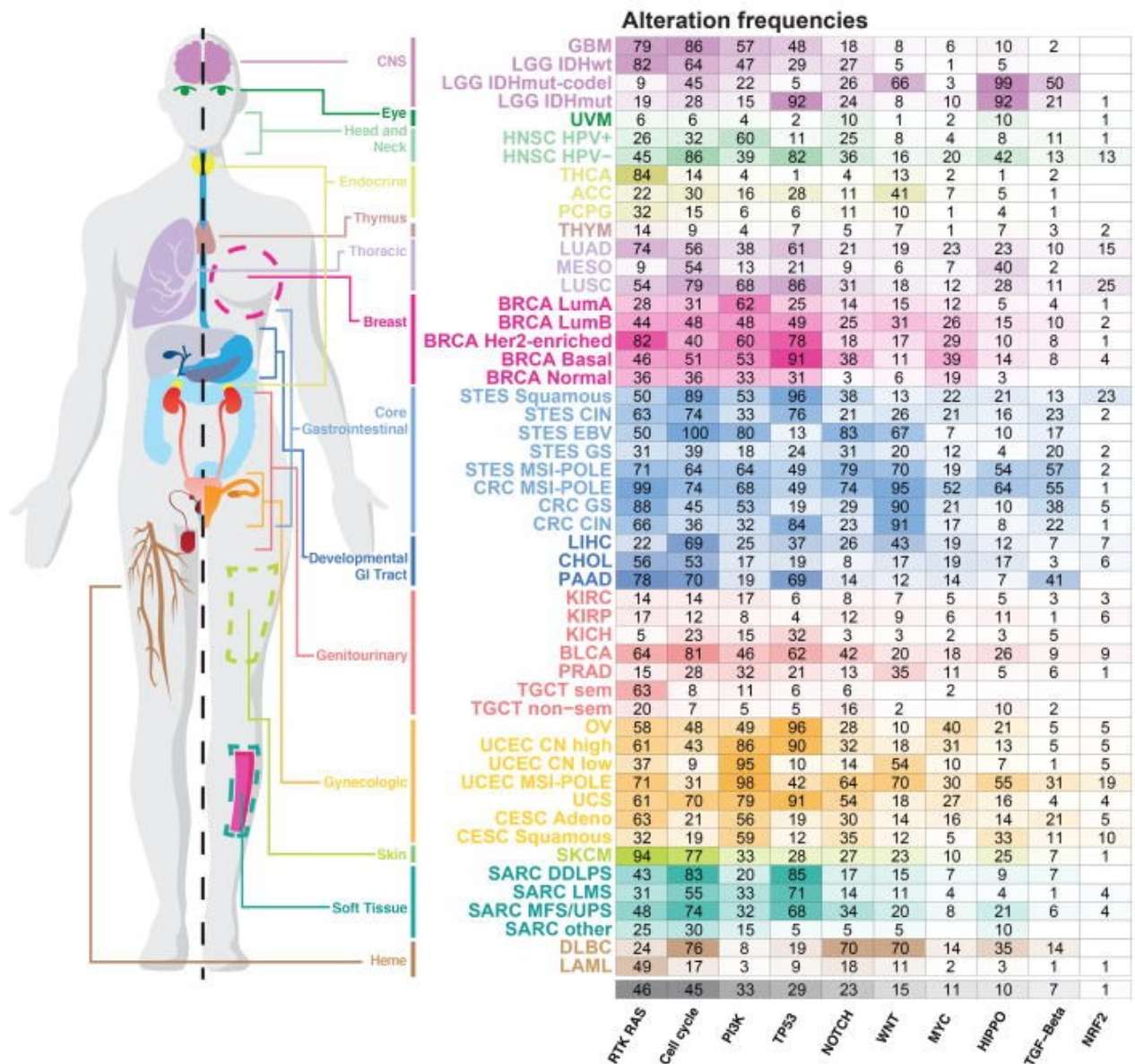


Figure 9. Altérations génétiques des voies de signalisation dans les cancers humains (Sanchez-Vega et al. 2018)

Comme nous l'avons vu précédemment, l'expression de ces gènes est en partie induite par des facteurs de transcription, tel que FOXM1, Myc, E2F et sont aussi altérés génétiquement dans les cancers. Il existe une forte corrélation entre ces altérations génétiques et la signature du cycle cellulaire, cependant, elles ne sont pas toujours mutuellement exclusives. Ceci, nous a amené à analyser le statut d'altérations génétiques des gènes codant pour les protéines liant l'ARN (RBP) dans des spécimens de cancer du sein (TCGA), et de les corrélés à la signature du cycle cellulaire. Cette méthode nous a permis d'identifier le complexe NF45-NF90 comme régulateur post-transcriptionnel de l'expression de gènes mitotiques.

Dans la prochaine section nous décrivons les fonctions moléculaires des RBP et plus particulièrement de l'hétérodimère NF45-NF90.

1.2 Les protéines liant l'ARN

Dans les cellules, l'ARN est rarement retrouvé de façon isolée, mais plus souvent sous forme de complexe ribonucléoprotéique (RNP). Les composantes protéiques des RNP participent au traitement des pré-ARNm et sont des déterminants importants pour l'épissage, l'exportation, la localisation, la traduction et la stabilité des ARNm. Les avancées récentes en criblage ont mené à l'identification de plus de 1500 protéines liant l'ARN (RBP) dans le génome humain. Ces RBP présentent des fonctions très diverses, et cette polyvalence est en grande partie conditionnée par la variété des domaines de reconnaissance à l'ARN présent sur ces protéines. La grande diversité structurelle des substrats (miARN, ARNsno, ARNt, ARNnc, ARNm) est plutôt accommodée par la présence de multiples copies de domaines de liaison à l'ARN agencées de manière variée élargissant ainsi le répertoire fonctionnel de ces protéines. Les domaines de liaison à l'ARN se combinent pour créer des surfaces de liaison macromoléculaires polyvalentes définissant la spécificité de ces protéines. Certaines RBP possèdent aussi des activités enzymatiques et les domaines de liaison à l'ARN permettent le ciblage aux substrats et la régulation de l'activité catalytique. Dans la prochaine section, nous aborderont de manière générale les différents modes de reconnaissance de l'ARN utilisés par les RBP, la biogenèse et la dégradation des ARNm. Ensuite, nous développerons l'état des connaissances sur les fonctions du complexe NF45-NF90 dans la biologie des ARN.

1.2.1 Les domaines de reconnaissance à l'ARN

De nombreux processus cellulaires, comme la signalisation intracellulaire ou la production de matrice extracellulaire (Pawson and Nash 2003; Doolittle 1995; Bork et al. 1996), reposent sur des RBP constitués de plusieurs répétitions de domaines liant l'ARN, et qui ont des caractéristiques modulaires. Les avantages de la construction d'une protéine avec une architecture modulaire découlent de la polyvalence qui en résulte. En existant en plusieurs

copies, ces modules confèrent à une protéine la capacité de se lier à l'ARN avec une spécificité et une affinité accrues comparé à la présence unique de domaine qui se lient souvent à de courts segments d'ARN avec une affinité relativement faible. Ainsi, en construisant une surface d'interaction à travers plusieurs modules, une affinité et une spécificité élevée pour une cible particulière peuvent être obtenues en combinant plusieurs interactions faibles. Ces faibles interactions permettent la formation et la dissolution de RNP en facilitant la dynamique de liaison.

1.2.1.1 Domaine RRM

Le domaine de reconnaissance à l'ARN, RRM (*RNA recognition motif*), est le plus courant et le mieux caractérisé des modules de liaison à l'ARN. Le RRM est composé de 80 à 90 acides aminés qui forment une feuille β antiparallèle à quatre brins avec deux hélices serrées entre elles, donnant au domaine la topologie $\alpha\beta$ ($\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$) (Figure 10) (Oubridge et al. 1994).

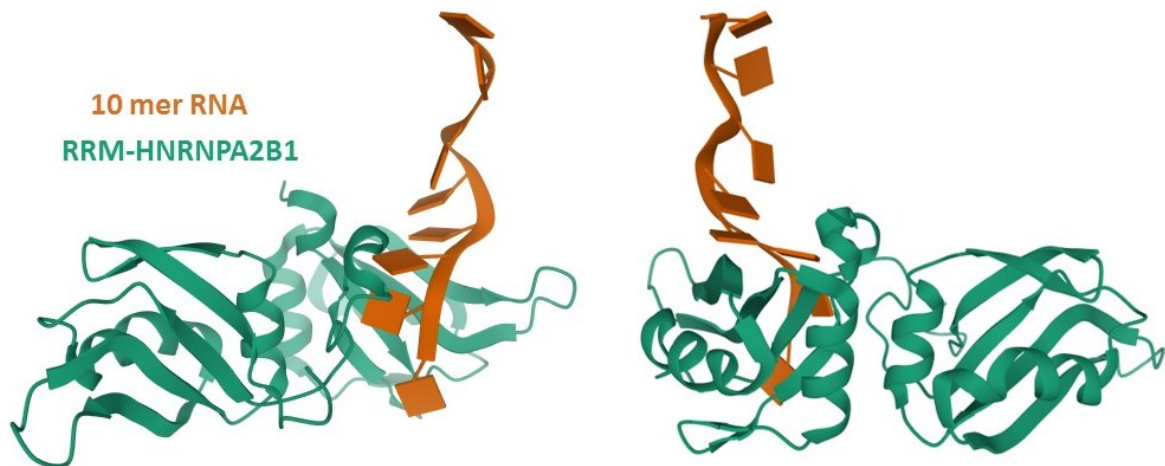


Figure 10. Structure du domaine RRM de HNRNPA1/B2 en interaction avec de l'ARN simple brin (Wu, Su, et al. 2018)

Plus de 9 000 domaines RRM ont été identifiés chez l'humain dans environ 0,5 à 1% des gènes, indiquant que plusieurs domaines RRM peuvent se retrouver dans la même protéine (Finn et al. 2006). Parmi les protéines contenant des motifs RRM, on retrouve la famille des protéines hnRNP (*Heterogeneous ribonucleoprotein particle*) ou SRSF (*Serine/arginine-rich splicing factor 1*) qui sont impliquées dans plusieurs étapes du métabolisme des ARN (Jeong 2017; Geuens, Bouhy, and Timmerman 2016). La liaison du motif RRM aux ARN est caractérisée par trois résidus conservés, une arginine ou une lysine qui forme un pont salin vers le squelette phosphodiester, et deux résidus aromatiques formant des interactions de type *stacking* avec les nucléobases (Oubridge et al. 1994). Ces acides aminés résident dans deux motifs hautement conservés, appelés motifs de ribonucléoprotéine 1 et 2, et sont situés dans les deux brins β centraux. Cette plate-forme conservée permet la reconnaissance de deux nucléotides au centre du feuillet β , et de deux nucléotides supplémentaires de chaque côté. De plus, un RRM peut reconnaître jusqu'à 8 nucléotides en utilisant des boucles exposées et des éléments de structure secondaires supplémentaires qui ne sont pas présents dans la structure canonique (Auweter, Oberstrass, and Allain 2006; Maris, Dominguez, and Allain 2005). Cependant, plusieurs domaines RRM sont nécessaires pour définir une séquence de liaison unique aux ARN (Auweter, Oberstrass, and Allain 2006)).

1.2.1.2 Domaine KH

Le domaine d'homologie à hnRNP K, ou domaine KH, est un domaine qui peut se lier à la fois à de l'ADN simple brin ou de l'ARN simple brin (Lewis et al. 2000) et est présent dans les cellules eucaryotes et procaryotes (Siomi et al. 1993). Le domaine fait environ 70 acides aminés et est composé d'une séquence conservée (I/L/V)-I-G-X-X-G-X-X-(I/L/V) ayant un rôle fonctionnel important. En effet, des mutations de cette région dans la protéine Fmr1 provoquent le syndrome de l'X fragile chez l'humain (De Boulle et al. 1993). Parmi les protéines ayant un domaine KH avec des fonctions importantes, on retrouve la protéine SF1, qui est essentielle dans l'étape précoce de l'épissage des ARNm (Wang et al. 1999). Tous les domaines KH

forment un feuillet β à trois brins serrés contre trois hélices α , selon leurs topologies, ils peuvent être séparé en deux sous-familles, type I : $\beta\alpha\beta\beta\alpha$ et type II : $\alpha\beta\beta\alpha\beta$ (Grishin 2001) (Figure 11).

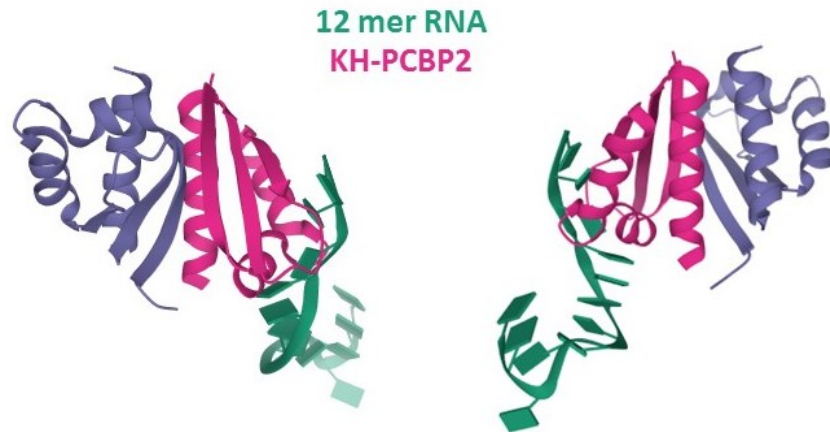


Figure 11. Structure du domaine KH de type II de PCBP2 en interaction avec de l'ARN simple brin (Du et al. 2007)

Indépendamment de leur topologie, les domaines KH reconnaissent 4 nucléotides via la séquence conservée GXXG. À la différence du domaine RRM, le domaine KH ne lie pas l'ARN via des acides aminés aromatiques mais plutôt par des liaisons hydrogènes, des interactions électrostatiques, ainsi que par des complémentarités structurelles.

1.2.1.3 Domaine dsRBD

Le domaine dsRBD (*double stranded RNA-Binding Domain*) est un petit domaine de 70 à 90 acides aminés composés d'hélices α et de feuillets β (topologie $\alpha\beta\beta\alpha$) capables de lier de l'ARN double brin (ARNdb), et est retrouvé chez les bactéries et les cellules eucaryotes (Figure 12). Ce domaine est peu fréquent. Chez l'humain, seulement 19 gènes codent pour ces domaines dsRBD. On peut subdiviser ces gènes en deux familles, celles qui possèdent des activités enzymatiques (la kinase PKR, la désaminase-ADAR, la ribonucléase Drosha) et celles qui n'en possèdent pas (ILF3, Staufen, TRBP). Le domaine dsRBD interagit avec l'ARNdb sans établir de contacts spécifiques avec les nucléobases. Contrairement aux

domaines RRM ou KH, la majorité des contacts intermoléculaires sont indépendants de la séquence et impliquent des interactions électrostatiques avec les riboses de l'ARN (Chang and Ramos 2005). Ainsi, le domaine dsRBD reconnaît généralement les ARN cibles par complémentarité structurelle plutôt que par des interactions spécifiques aux bases de l'ARN

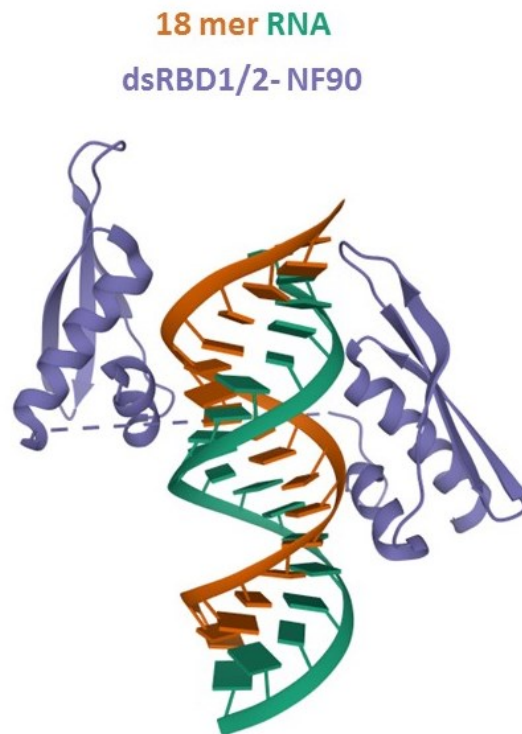


Figure 12. Structure des deux domaines dsRBD de NF90 en interaction avec de l'ARN double brin (Jayachandran, Grey, and Cook 2016)

1.2.1.4 Domaine Zinc Finger

Le domaine Zinc Finger ou doigt de Zinc, a la capacité de lier l'ADN et l'ARN (Clemens et al. 1993). Ils sont classés en fonction des résidus utilisés pour coordonner l'atome de Zinc tels que les domaines de type Cys2His2 (C2H2), CCCH ou CCHC. Ces derniers sont généralement présents en plusieurs répétitions au sein d'une protéine. La liaison aux différents types d'acides nucléiques (ADN ou ARN) est effectuée par des liaisons hydrogène au squelette de la protéine. Ainsi, la forme de la protéine est le principal déterminant de la

spécificité en fournissant un modèle de liaison hydrogène rigide. Par exemple, le facteur de transcription TFIIIA impliqué dans la transcription de gènes ribosomiques contient 9 doigts de zinc C2H2, les doigts 1 à 3, 5 et 7 à 9 interagissent avec l'ADN, tandis que les doigts 4 et 6 interagissent avec l'ARN ribosomal 5S (Searles, Lu, and Klug 2000) (Figure 13). Une deuxième famille de doigts de zinc se liant à l'ARN contient des motifs CCCH, comme la protéine TTP qui stabilise l'ARNm du TNF- α en reconnaissant des séquences riches en bases AU via ses domaines à doigts de Zinc CCCH (Lai et al. 2000). Ce mode de reconnaissance est similaire à un troisième type de doigts de zinc avec un motif de liaison CCHC retrouvé dans les protéines rétrovirales Gag et de nucléocapside du virus de l'immunodéficience humaine (De Guzman et al. 1998).

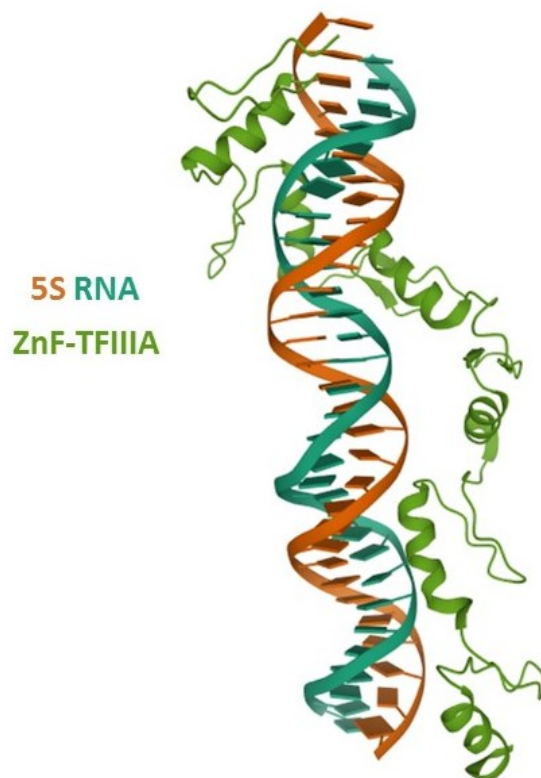


Figure 13. Structure des domaines Zn Finger de TFIIIA avec l'ARN ribosomal 5S
(Nolte et al. 1998)

1.2.1.5 Domaine S1

Les domaines S1 ont été identifiés pour la première fois dans la protéine ribosomique S1, mais ont depuis été trouvés dans d'autres protéines de liaison à l'ARN, comme EIF2S1 (sous-unité du complexe eIF-2) ou encore plusieurs exonucléases (Subramanian 1983). Le domaine est composé d'environ 70 acides aminés disposés en tonneau β (constitué de 5 feuillets β antiparallèle) et d'une courte hélice 3_{10} (Bycroft et al. 1997) (Figure 14).

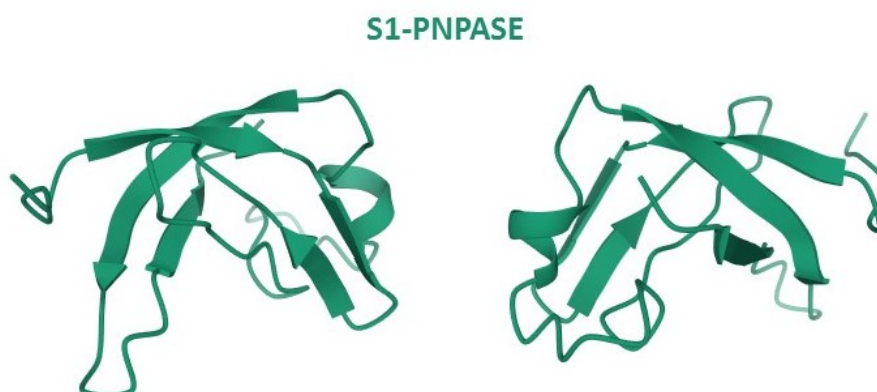


Figure 14. Structure du domaine S1 de la PNPASE (Bycroft et al. 1997)

La structure est similaire à celle de la famille du pli de liaison oligonucléotide/oligosaccharide (Murzin 1993). De façon similaire au RRM, le domaine S1 reconnaît les acides nucléiques à travers un noyau de feuillet β contenant des résidus aromatiques conservés permettant des interactions de *stacking* avec les nucléobases.

1.2.1.6 Domaine PAZ et PIWI

La biogénèse des microARN génère des espèces avec des caractéristiques structurales uniques qui doivent être reconnues spécifiquement, mais de façon indépendante de la séquence. Ces exigences sont remplies par les domaines PAZ et PIWI, et sont retrouvés dans des protéines impliqués dans le traitement des microARN, tel que AGO, DICER et PIWIL (Collins and Cheng 2005). Le domaine PAZ est composé d'environ 100 acides aminés et possède une structure en tonneau β (similaire au domaine S1) juxtaposée à un domaine $\alpha\beta$ formant une structure en pince où l'ARN se lie (Lingel et al. 2003) (Figure 15).

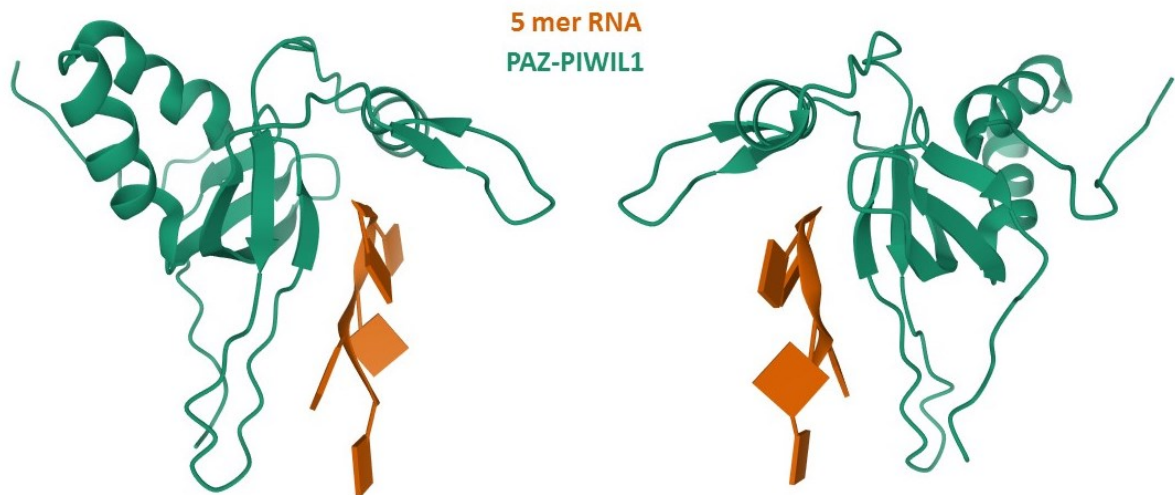


Figure 15. Structure du domaine PAZ interagissant avec un ARN simple brin (Zeng et al. 2011)

Dans le cas d'AGO, cette structure facilite le clivage de miARN par DICER en liant sélectivement 2 nucléotides permettant de positionner les miARN correctement (Ma, Ye, and Patel 2004). De plus, AGO contient un domaine PIWI qui ancre l'extrémité 5' du brin de guidage pour positionner le brin cible pour la dégradation de l'ARNm (Yuan et al. 2005).

1.2.2 Biogénèse et dégradation des ARNm

Les ARNm sont maturés dans le noyau avant leur exportation vers le cytoplasme. La maturation des transcrits consiste en l'ajout d'une coiffe méthyl en 5' (*cap*), leur épissage et l'ajout d'une queue polyA à l'extrémité 3'. Ces processus sont effectués par une myriade de RBP qui sont coordonnés dans le temps et dans l'espace et détermine le sort futur de l'ARNm.

1.2.2.1 La maturation des ARNm

La maturation des ARN débute dès l'initiation de la transcription d'un gène par l'ARN polymérase. Dès les 25 à 30 premiers nucléotides transcrits par l'ARN Pol II, l'ARN commence à être modifié à son extrémité 5'. La coiffe en 5' nécessite trois activités enzymatiques : ARN triphosphatase, guanylyltransférase et 7-méthyltransférase (Shuman 2001). Cette modification protège l'ARN de la dégradation par l'exonucléase Xrn1 (Hsu and Stevens 1993),

recrute des complexes impliqués dans l'exportation et l'initiation de la traduction, comme eIF4G et PABP1 (Wakiyama, Imataka, and Sonenberg 2000).

Les gènes des organismes eucaryotes sont divisibles en segments qu'on appelle intron et exon. Les exons sont les parties du gène que l'on retrouve dans l'ARNm, tandis que les introns sont éliminés durant l'étape d'épissage. L'épissage prend chronologiquement lieu après l'ajout de la coiffe en 5' du pre-ARNm et s'effectue de manière co-transcriptionnelle. Chez les levures et les mammifères, cette réaction est catalysée par le *spliceosome*, constitué des petits RNP nucléaires U1, U2, U4, U5 et U6 (snRNPs) en conjonction avec un grand nombre de protéines tels que les protéines hnRNP, SR et le complexe EJC (*Exon Junction complex*) (Stark and Luhrmann 2006). Au sein du spliceosome, une série d'interactions ARN-ARN, ARN-protéine et protéine-protéine est nécessaire pour identifier et éliminer les régions introniques et rejoindre les exons, produisant un transcrit mature (Collins and Guthrie 2000). L'identification des introns repose sur certaines séquences, tels que les 5'SS (*5' splice site*), les points de ramification, et les 3'SS (*3' splice site*) qui sont reconnus par les protéines U2AF1/2 (Guth and Valcarcel 2000).

A la fin de la transcription d'un gène se produit le clivage endonucléolytique 10 à 30 nucléotides en aval d'une séquence signal (séquence AAUAAA chez les mammifères). Le pre-ARNm subit l'addition d'une queue polyA à l'extrémité 3' du transcrit (Proudfoot 2004). Cette réaction d'ajout d'adénosine est effectuée par la PolyA polymérase via l'hydrolyse de l'ATP (Edmonds and Abrams 1960). La queue polyA est similaire à la coiffe 5' en ce qu'elle est importante pour la stabilité et l'efficacité traductionnelle de l'ARNm (Drummond, Armstrong, and Colman 1985).

1.2.2.2 L'export nucléaire

La traduction éventuelle d'un ARNm en protéine nécessite son export vers le cytoplasme. La membrane nucléaire est semi-perméable et les molécules ayant une masse inférieure à 60 kDa peuvent diffuser passivement. La masse estimée d'un ARNm nu est

d'environ 1000 kDa, et nécessite donc un transport actif pour son export vers le cytoplasme (Khong and Parker 2020). Ainsi, l'export des ARNm se fait grâce aux pores nucléaires, et plus particulièrement via le transporteur de type ABC, TAP (*Antigen Peptide Transporter*) (Iglesias and Stutz 2008). Chez les eucaryotes, l'export des ARNm est dépendant de l'épissage. Sur les transcrits épissés, l'EJC recrute le complexe protéique TREX (*TRanscription EXport*) sur l'ARNm (Masuda et al. 2005). Le complexe TREX sert d'adaptateur à TAP qui possèdent une faible affinité envers les ARN. Ainsi, ce mécanisme prévient l'export d'ARN non mature vers le cytoplasme.

1.2.2.3 Dégradation des ARNm

La quantité de protéine produite à partir d'un ARNm donné dépend non seulement du taux de traduction mais également du rythme de synthèse et de dégradation de l'ARNm. Le niveau d'expression d'un ARNm est influencé par plusieurs facteurs liés à son épissage, sa maturation et son interaction avec d'autres RBP. La dégradation des ARNm fait appel à différentes machineries moléculaires selon l'endroit où il est ciblé et peut se diviser en cinq types d'activités ribonucléolytiques : à l'extrémité 5' de l'ARNm le *decapping* (coiffe méthyl par DCP2/NUDT16), le clivage exonucléolytique 5'-en-3' (XRN1), à l'extrémité 3' le clivage exonucléolytique 3'-en-5' (EXOSC10), la déadénylation (queue polyA par PARN), et le clivage endonucléocytique (SMG6) (Li and Kiledjian 2010; Schoenberg 2011). Chacune de ces activités enzymatiques est déclenchée par des RBP ou des ARN non codants (e.g. miARN) liés à l'ARNm et sont amenés par des mécanismes très variés.

1.2.2.3.1 Dégradation des ARNm non-sens (NMD)

Le NMD est un mécanisme de dégradation des ARNm qui cible les transcrits *de novo* possédant un codon stop prématuré sur sa séquence. La présence de codon stop prématuré recrute le complexe SURF (SMG1–UPF1–eRF1–eRF3) qui induit la dégradation de l'ARNm premièrement par clivage endonucléolytique via SMG6, puis recrute toutes les autres activités enzymatiques nécessaires pour dégrader l'ARNm (*decapping*, déadénylation, clivage

exonucléolytiques) (Kim and Maquat 2019). Le NMD est un mécanisme de surveillance de la qualité des transcrits et il est étroitement lié à la maturation des ARNm. Par exemple, le facteur d'épissage EJC, qui est retrouvé sur tous les ARNm épissés et exporté, est nécessaire à l'activation complète du complexe SURF et donc de la voie du NMD.

1.2.2.3.2 Dégradation des ARNm Non-stop (NSD)

Le NSD est un mécanisme de dégradation des ARNm qui est activé lorsque l'ARNm ne présente pas de codon stop, provoquant un blocage des ribosomes au niveau de la queue polyA. Dans les cellules humaines, les acteurs moléculaires détectant ces défauts demeurent inconnus. Par contre, chez la bactérie, la dégradation dépendante du NSD est médiée par la RNase R (Venkataraman et al. 2014). Cette voie permet de libérer les ribosomes bloqués sur les ARNm et, tout comme le NMD, prévient la production de protéines aberrantes.

1.2.2.3.3 Dégradation des ARNm Staufen-dépendante (SMD)

Le SMD est retrouvé uniquement chez les mammifères et est médié par les protéines Stau1/2 (Staufen). Les domaines dsRBD de Stau1/2 permettent la reconnaissance de la structure d'ARNdb dans la région 3'UTR des ARNm (Park and Maquat 2013). Une fois lié sur ces sites, l'hélicase UPF1, est recruté puis induit la dégradation du transcrit. UPF1 est à la fois impliqué dans le SMD et le NMD, ainsi, ces deux voies compétitionnent l'une envers l'autre. Jusqu'à présent, le SMD est connu pour réguler des processus de différenciation cellulaire, comme que la myogenèse et l'adipogenèse.

1.2.3 Le complexe NF45-NF90

Les protéines NF45 et NF90 sont respectivement codé par les gènes *ILF2* et *ILF3* chez l'humain. Ces deux protéines ont été découvertes de façon concomitante par Kao et al. lors de la purification du facteur de transcription NF-AT qui promeut l'expression de l'IL-2 dans des

cellules T activées (Kao et al. 1994). L'épissage du gène *ILF3* mène à l'expression d'une dizaine d'isoformes, dont NF90 est une des formes majoritaires (Duchange et al. 2000). NF45 et NF90 forment un hétérodimère capable de lier différentes espèces d'ARN et régulant ainsi l'expression génique à de multiples niveaux. Les gènes *ILF2* et *ILF3* sont exprimés de façon ubiquitaire dans les tissus humains, et le *knock-out* de *ILF3* est létal chez la souris (Shi et al. 2005). Des études récentes ont montré que le *knock-out* de *ILF2* ou *ILF3* entraîne une mort cellulaire irréversible, classant ces deux gènes dans la liste des gènes essentiels de l'intégrité cellulaire (Hart et al. 2015; Bertomeu et al. 2018). Ainsi le complexe NF45-NF90 semble remplir des fonctions biologiques importantes et a déjà été caractérisé dans plusieurs processus biologiques, tels que l'immunité innée, la biogénèse d'ARN non codants, le cycle cellulaire, et les dommages à l'ADN. Dans la prochaine section, nous allons décrire l'état des connaissances sur la nature et les fonctions du complexe NF45-NF90, ainsi que de son implication dans la progression tumorale et la réplication virale.

1.2.3.1 Structure du complexe NF45-NF90

1.2.3.1.1 Le domaine d'interaction DZF

Les protéines NF45 et NF90 font respectivement 45 et 90 kDa et possèdent un domaine DZF (*domain associated with zinc fingers*) situé en N-terminal qui permet l'interaction entre les deux protéines (Wolkowicz and Cook 2012). Dans les tissus et cellules humaines, NF45 et NF90 sont retrouvés le plus souvent en complexe. En effet, de nombreuses études ont démontré leur association en utilisant des chromatographies d'affinité (conventionnel ou à ARN) ou des co-immunoprécipitations (Kao et al. 1994; Shin et al. 2002; Reichman, Muniz, and Mathews 2002). Des expériences de co-sédimentation à partir de lysats cellulaires ont montré que NF45 et NF90 se trouvent à des poids moléculaires élevés (600 kDa) correspondant à des RNP. La digestion des ARN de ces lysats cellulaires a révélé la stœchiométrie du complexe NF45-NF90 dans les cellules, et il apparaît que NF45 et NF90 co-

sédimentent à un poids correspondant à un hétérodimère 1:1, soit autour de 140 kDa. En 2012, Wolkowicz et Cook ont cristallisé pour la première fois les domaines DZF de NF45 et NF90 formant un dimère (Wolkowicz and Cook 2012). Les domaines DZF de NF45 et NF90 partagent seulement 30 % d'homologie de séquence, mais leurs structures tridimensionnelles se superposent parfaitement (Figure 16B). Le domaine de dimérisation DZF de NF45 et NF90 forme une structure oblongue avec une face plane d'un côté et une face courbe de l'autre (Figure 16A). Ces deux domaines sont caractérisés par une région N-terminale α - β mixte qui contient une feuille β antiparallèle centrale et une région C-terminale α -hélicoïdale. La feuille β centrale de chaque domaine forme une fente entre les moitiés N- et C-terminales tandis que la dimérisation de NF90 et NF45 est effectuée par les hélices α à l'extrémité C-terminale de chaque protéine. La dimérisation de NF90 et NF45 est médiée par une association antiparallèle étroite de l'hélice 9 et l'hélice 8 à l'extrémité C-terminale de chaque domaine DZF. L'interface d'interaction est caractérisée par trois résidus conservés sur NF90 (Glu312, Gln319, Arg323) et NF45 (Asp308, Gln315, Arg319) (Figure 16C). Les résidus glutamine établissent un contact polaire au centre de l'interaction tandis que l'Arg323 de NF90 forme un pont salin avec l'Asp308 de NF45, tout comme l'Arg319 de NF45 avec la Glu312 sur NF90. Outre NF45 et NF90, le domaine DZF est seulement présent dans 2 autres protéines humaine, SPNR (exprimé seulement dans les testicules) et ZFR (exprimé de façon ubiquitaire). Très récemment, toutes les protéines à domaine DZF (NF45, NF90, SPNR, et ZFR) ont été identifiées comme régulateur majeur d'ADAR, une adénosine désaminase, modifiant les adénosines en inosine des ARN (Freund et al. 2020). Les fonctions enzymatiques d'ADAR jouent des rôles importants dans l'immunité innée de la cellule face aux infections virales mais aussi dans les mécanismes d'évasion du système immunitaire des cellules cancéreuses (Herbert 2019).

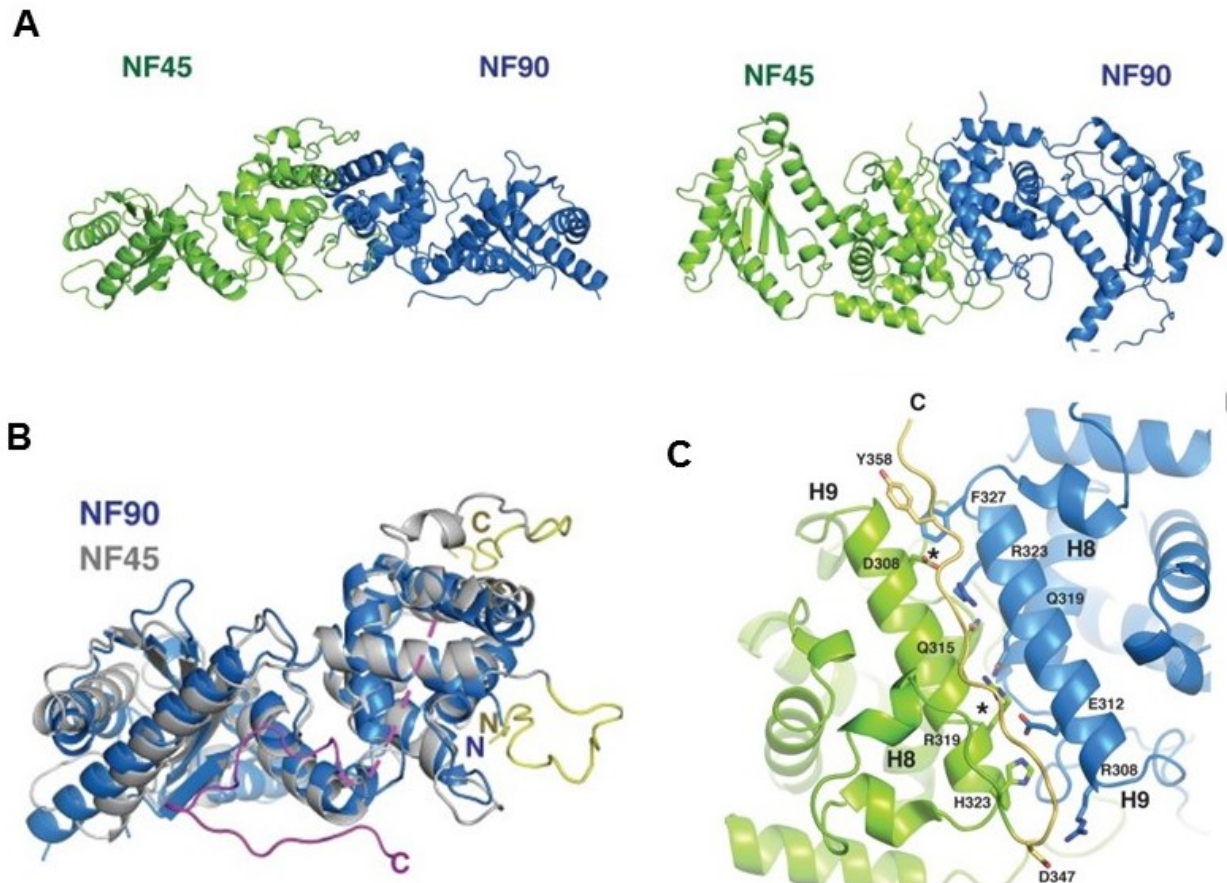


Figure 16. Structure du domaine DZF de NF45 et NF90 (Wolkowicz and Cook 2012)

L'implication des protéines à domaine DZF dans la modulation de l'activité d'ADAR viendrait de la compétition entre ADAR et NF90 pour lier les ARN, car tous deux contiennent des domaines dsRBD et la déplétion de NF90 diminue la présence d'inosine sur les ARN (Quinones-Valdez et al. 2019). Les protéines à domaine DZF, en particulier NF45, modulent positivement l'affinité de NF90 envers les ARN par son interaction via leurs domaines DZF. Ainsi l'interaction entre les protéines à domaine DZF modulerait de façon importante l'interactome d'ARN de NF90 et d'ADAR.

1.2.3.1.2 Les domaines de liaison à l'ARN de NF90

NF90 est la protéine qui lie les ARN au sein du complexe NF45-NF90. NF90 possède deux domaines dsRBD et un motif RGG à son extrémité C-terminale. Les dsRBD s'associent aux ARNdb, tandis que le motif RGG interagit avec les ARN simple brins. Les trois domaines

conditionnent l'affinité et les fonctions moléculaires du complexe NF45-NF90 (Schmidt et al. 2017). Récemment, le laboratoire du Dr. Cook a cristallisé les deux domaines dsRBD de NF90 en complexe avec des ARNdb (Jayachandran, Grey, and Cook 2016). Les deux dsRBD de NF90 lient le sillon mineur des ARNdb, sans spécificité de séquence (Figure 17). De façon intéressante, ils ont découvert que la structure des domaines dsRBD de ADAR2 et de NF90 lie de façon similaire les ARNdb (Figure 17), ce qui soutient le lien fonctionnel sous-jacent entre NF90 et ADAR décrit auparavant.

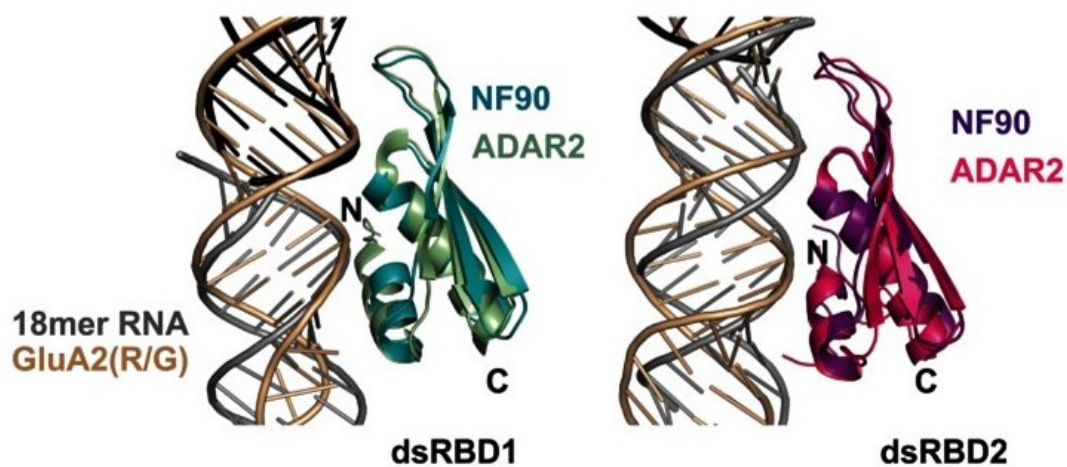


Figure 17. Interaction des dsRBD de NF90 et ADAR2 avec de l'ARN 18mer (Jayachandran, Grey, and Cook 2016)

Via ses domaines de liaison à l'ARN, NF90 peut lier toutes sortes d'espèces d'ARN contenant des structures d'ARNdb, tels que des ARNm, des ARN non codants (microARN, ARN circulaire), ainsi que des ARN viraux (Castella et al. 2015). Par sa liaison aux ARN cellulaires, le complexe NF45-NF90 régule l'expression génique à différentes étapes comme l'épissage, la biogénèse des ARN non codants, la stabilisation des ARNm, et la traduction. En dehors des ARN cellulaires, le complexe NF45-NF90 est aussi une protéine d'hôte pour de nombreuses espèces de virus à ARN (Patino, Haenni, and Urcuqui-Inchima 2015).

1.2.3.2 Les mécanismes de contrôle de l'expression génique par le complexe NF45-NF90

1.2.3.2.1 Régulation transcriptionnelle

NF45 et NF90 ont été découverts à la suite de la purification des partenaires du facteur de transcription NF-AT lié au promoteur de l'*IL-2* contenant une séquence ARRE-2 (GAGGAAAACTGTT) (Corthesy and Kao 1994). Le complexe NF45-NF90 peut moduler la transcription de gènes impliqués dans l'immunité en se liant à des promoteurs contenant des séquences ARRE-2, CCAAT (Orford et al. 1998), et MHC-1 (Sakamoto et al. 1999). Par exemple, dans les cellules T, la déplétion de NF45 ou NF90 affecte négativement l'expression de l'*IL-2*, et la surexpression de NF90 augmente l'activité d'un rapporteur transcriptionnel contenant la séquence ARRE-2 (Shi, Qiu, et al. 2007). De façon similaire, l'hétérodimère NF45-NF90 est aussi impliqué dans la régulation transcriptionnelle du gène SP-10 au cours de la spermatogénèse chez la souris. Cette régulation serait médiée par la présence d'une séquence boîte purine dans le promoteur du gène SP-10, et aussi dans celui de l'*IL-2* (Ranpura, Deshmukh, and Reddi 2008). Au-delà du contexte immunitaire, le complexe NF45-NF90 affecte la transcription du gène codant pour l'uPA qui joue un rôle important dans la formation des métastases et la progression tumorale. Dans le cancer du sein, NF90 ainsi que son partenaire NF45, lient une séquence CTGTT situé dans le promoteur du gène uPA affectant ainsi son expression (Hu et al. 2013). D'autre part, NF45 et NF90 ont été identifiés comme coactivateurs de la transcription du proto-oncogène c-Fos (Nakadai et al. 2015). Dans cette étude, les auteurs démontrent que la régulation de la transcription de *FOS* par NF45-NF90 ne serait pas liée à sa capacité de lier directement la séquence promotrice de *FOS*, mais plutôt par un recrutement indirect. En effet, NF90 peut interagir avec des protéines étroitement liées à la chromatine, tel que PRMT-1, ou encore RHA (Halaby et al. 2015). NF90 peut moduler l'activité méthyltransférase de PRMT-1, diminuant ainsi le recrutement du facteur de transcription YY1 (Tang, Kao, and Herschman 2000; Ohno et al. 2011). En somme, le complexe NF45-NF90 régule la transcription de nombreux gènes par liaison à des régions

promotrices de façon directe et indirecte. Cependant, NF90 est dénué de domaine de liaison à l'ADN, et semble avoir un tropisme plus important pour les ARN. L'équipe du Dr. Kao a proposé que la liaison du complexe NF45-NF90 à des régions génomiques se ferait grâce à la présence d'hybride ARN-ADN qui recruterait le complexe sur des régions spécifiques, tels que des *enhancer* ou promotrice (Wu, Shi, et al. 2018). En effet, ce type de mécanisme de ciblage de région génomique par des ARN est de plus en plus décrit dans la littérature, par exemple le système CRISPR/Cas9 où la complémentarité à l'ADN génomique est effectuée par un ARN non codant (Jinek et al. 2012), ou encore les *enhancer* à ARN (Li, Notani, and Rosenfeld 2016). Récemment, une expérience de *ChIP-seq* a été effectuée sur NF90 dans les cellules K562, et a montré la présence de NF90 sur plus de 9 000 sites, dont 25 % sont des régions promotrices (Wu, Shi, et al. 2018). Dans les mêmes cellules, un autre groupe a séquencé tous les ARN liés à NF90 par eCLIP (*enhanced Cross-Link ImmunoPrecipitation*) et a montré des interactions avec plus de 10 000 transcrits, soulignant son rôle prépondérant dans la régulation post-transcriptionnelle (Van Nostrand et al. 2016). En effet, Le complexe NF45-NF90 est plus largement décrit dans son interaction avec les ARN et sa régulation post-transcriptionnelle. Toutefois, son rôle dans la transcription est indéniable. Le complexe a une capacité multimodale de réguler l'expression d'un gène, par exemple l'*IL-2* où NF45-NF90 participe positivement à la transcription mais aussi à la stabilisation du transcrit via sa liaison à l'ARNm (Shi, Godfrey, et al. 2007).

1.2.3.2.2 Régulation post-transcriptionnelle

Dans la cellule, les ARN ne sont jamais sous forme de séquences linéaires, mais sont modélés en structures tridimensionnelles complexes, dans une certaine mesure de façon similaire aux stades structuraux des protéines. À la différence des protéines, les ARN nécessitent la liaison de RBP pour maintenir et moduler ces structures. En effet, on retrouve des protéines associées aux ARN dès leurs synthèses par l'ARN polymérase, formant des

complexes RNP qui conditionnent l'épissage, la localisation, et la dégradation des ARNm (Khong and Parker 2020). En outre, ces processus post-transcriptionnels sont aussi régulés par différentes espèces d'ARN non codants (snARN, miARN, ARN circulaire) qui agissent parallèlement aux RBP. De nombreuses études ont démontré l'implication du complexe NF45-NF90 dans quasiment chacune des étapes post-transcriptionnelles, de l'épissage à la biogénèse des ARN non codants.

1.2.3.2.2.1 Stabilisation des ARNm

L'ARNm contient des séquences non traduites appelées UTR (*untranslated region*), qui sont retrouvées aux extrémités 5' et 3'. Les séquences en 3'UTR sont déterminantes dans la régulation de la stabilité des ARNm (Grzybowska, Wilczynska, and Siedlecki 2001). Via ses domaines dsRBD, il a été démontré que NF90 stabilise de nombreux ARNm par sa liaison au 3'UTR en réponse à divers stimuli (Figure 18).

ARNm cible	Sites de liaison	Conditions	Références
<i>IL-2</i>	3'UTR	Activation des cellules T	(Shi, Godfrey, et al. 2007)
<i>MKP-1</i>	3'UTR	H ₂ O ₂	(Kuwano et al. 2008)
<i>LIF</i>	3'UTR	H ₂ O ₂	(Agca et al. 2015)
<i>VEGF</i>	3'UTR	Hypoxie	(Vumbaca et al. 2008)
<i>MyoD/p21</i>	3'UTR	Myogenèse	(Shi et al. 2005)
<i>IL-8, CXCL1</i>	-	Stimuli pro angiogéniques	(Vrakas et al. 2019)
<i>Nanog</i>	3'UTR	Cellules souches embryonnaires	(Guo et al. 2016)
<i>Tau</i>	3'UTR	-	(Larcher et al. 2004)
<i>PARP1</i>	3'UTR	-	(Song et al. 2017)
<i>CCNE1</i>	3'UTR	-	(Jiang et al. 2015)
<i>CCND1/D3/G1</i>	3'UTR	-	(Deforz et al. 2016)

Figure 18. ARNm stabilisés par NF90

L'activation des cellules T entraîne une stabilisation de l'ARNm de l'*IL-2* via l'association de NF90 à des séquences riches en AU situées dans la région 3'UTR (Pei et al. 2008). L'ARNm codant pour la phosphatase *MKP-1*, régulant négativement la voie des MAPK, est elle aussi stabilisée par NF90 via des séquences AU après induction d'un stress à l' H_2O_2 (Kuwano et al. 2008). Au-delà des séquences AU, NF90 peut aussi stabiliser des ARNm en liant des structures *stem-loop* en 3'UTR. Tel est le cas de l'ARNm du *VEGF*, qui est stabilisé par NF90 en condition d'hypoxie, et promeut l'angiogenèse (Vumbaca et al. 2008). Dans des modèles d'hépatocarcinome, NF90 stabilise les ARNm de la *cycline E* (Jiang et al. 2015) et de *PARP1* en condition basale (Song et al. 2017), impliquant ainsi NF90 dans la régulation du cycle cellulaire. En effet, la cycline E permet la transition en phase S tandis que PARP1 est impliqué dans la signalisation du point de contrôle des dommages à l'ADN (Masutani et al. 1995).

1.2.3.2.2 Epissage des pre-ARNm

Au-delà des ARNm, le complexe NF45-NF90 peut aussi lier d'autres espèces d'ARN, tels que les pre-ARNm. Des expériences d'immunoprécipitation d'ARN ciblant NF90 (*eCLIP*) ont montré que NF90 est présent sur plus de 10 000 régions dans la partie génique du génome, et plus de 90 % de signaux détectés sont situés dans des introns, suggérant une proximité avec les événements d'épissage (Fasolo et al. 2019). Marchesini et al. ont démontré que la déplétion de NF45 dans des cellules de myélome multiple altère l'épissage de plus de 1000 gènes dont plus de 50 % sont des sauts d'exon (Marchesini et al. 2017). Dans cette étude, l'interactome protéique de NF45 révèle de nombreux interacteurs impliqués dans l'épissage, tels que les protéines hnRNP et YB-1. Par ailleurs, d'autres études ont identifié l'interaction entre NF45-NF90 et l'EJC (Woodward et al. 2017), ou encore les protéines Rbfox (Damianov et al. 2016). Rbfox et l'EJC sont des composantes essentielles au bon déroulement de l'épissage, et assure l'inclusion d'exon de gènes alternativement épissés. De façon similaire

à la déplétion de NF45, la perte de fonction de l'EJC et de Rbfox conduit à de nombreux sauts d'exon sur la globalité du génome (Han et al. 2011; Leung and Johnson 2018). En outre, des expériences de *pull-down* sur des oligonucléotides antisens développés pour induire des sauts d'exon de manière sélective ont identifié que NF45 et NF90 étaient recrutés sur les complexes oligonucléotide-pre-ARNm, suggérant encore une fois l'implication de NF45-NF90 dans l'épissage et particulièrement les sauts d'exon (Rigo et al. 2012). Dans l'ensemble, peu de publications ont étudié le rôle direct de NF45-NF90 dans l'épissage, cependant l'hétérodimère est retrouvé dans plusieurs études comme interagissant avec les pre-ARNm et comme partie intégrante de grand complexe multiprotéique impliqué dans l'épissage.

1.2.3.2.3 Biogénèse des ARN non codants

Généralement, les miARN sont transcrits à partir de leurs gènes sous forme de transcrits pri-miARN (miARN primaire) par l'ARN polymérase II/III (Lee et al. 2004). Ensuite, le complexe microprocesseur composé des protéines liant l'ARN Drosha et DGCR8 traite ces pri-miARN en pre-miARN (miARN précurseur) (Figure 19). Les pré-miARN sont exportés vers le cytoplasme puis clivés en duplex de miARN par Dicer. Le miARN mature correspond à un brin de ce duplex, ce dernier est ensuite chargé dans le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*) composé de la protéine AGO et GW182, conduisant à une interaction avec les ARNm cibles qui induit leur dégradation ou répression traductionnelle. Les protéines de la maturation (Drosha, DGCR8, Dicer, TRBP) des pre-miRNA possèdent des domaines dsRBD, tout comme NF90. Le complexe NF45-NF90 a été trouvé dans plusieurs études comme interagissant avec les membres du complexe Microprocesseur Drosha (Gregory et al. 2004). Au niveau fonctionnel, des expériences de maturation de miARN *in vitro* ont montré que la surexpression du complexe NF45-NF90 bloque la maturation à l'étape de pri-miARN (Sakamoto et al. 2009).

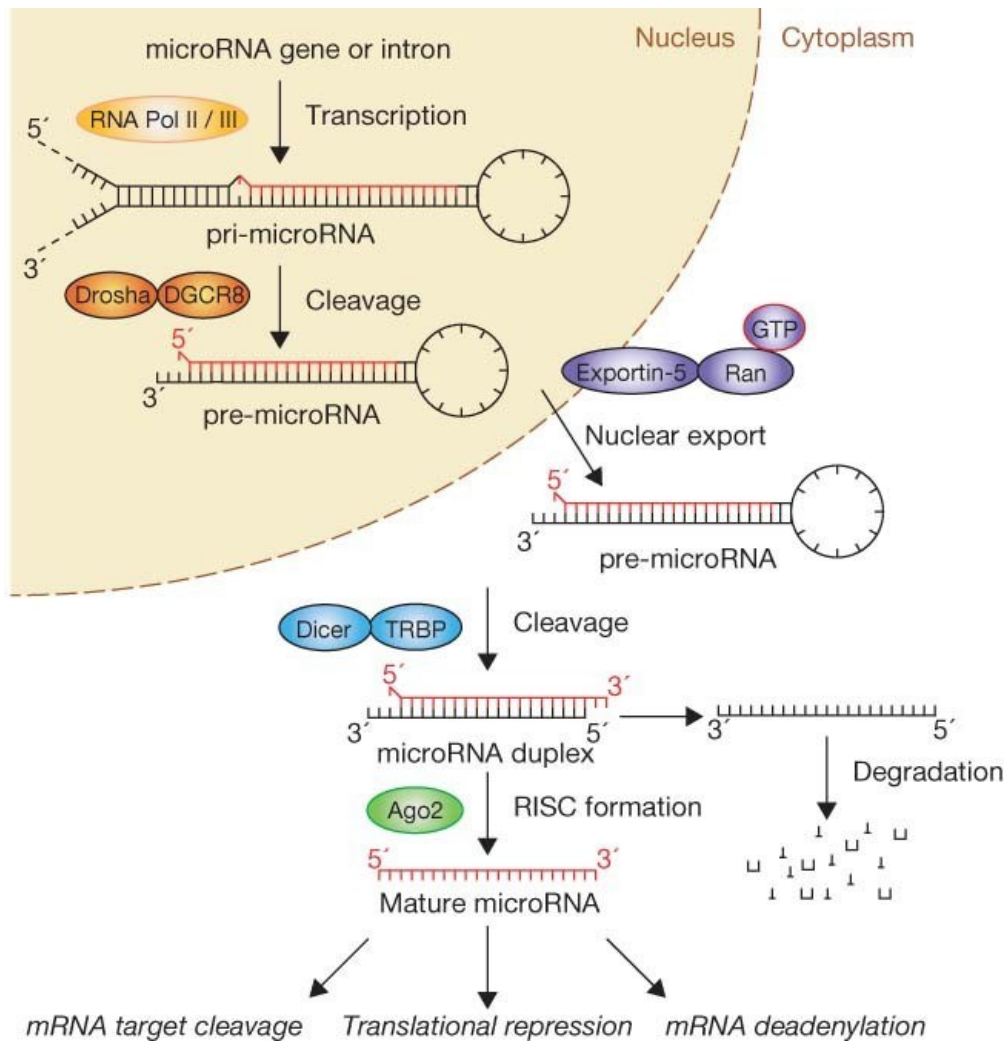


Figure 19 Biogénèse des miARN (Winter et al. 2009)

Ainsi, l'hétérodimère NF45-NF90 régule négativement la maturation des miARN et inhibe la production de let-7a, miR-21, miR-185, miR-23b, miR-34a, miR-193a, miR-193b, miR-181a, et miR-144 (Volk and Shomron 2011; Nussbacher and Yeo 2018). Le mécanisme par lequel le complexe inhiberait la maturation des miARN n'est pas encore totalement élucidé. L'hypothèse principale proposée par les auteurs de ces études est que NF90 compétitionnerait avec Drosha-DGCR8 pour lier les pri-miARN via leurs domaines dsRBM.

Récemment, NF90 a été identifié comme acteur majeur de la biogénèse des ARN circulaire (ARNcirc). En effet, la déplétion de NF90 par ARN interférant (ARNi) module les niveaux d'expression de plus de 50 % des ARNcirc détectés (Li et al. 2017). Les ARNcirc sont une espèce d'ARN non codants ayant comme propriétés de s'hybrider avec des miARN, ainsi ils peuvent inhiber la fonction des miARN en jouant un rôle « d'éponge » (Panda 2018). Par

conséquent, NF90 peut influencer indirectement les niveaux de miARN matures via son rôle prépondérant dans la biogénèse des ARNcirc. Ce mécanisme pourrait être impliqué dans la baisse d'expression des miARN dépendante de NF90 observée dans les études antérieures.

1.2.3.2.3 Régulation traductionnelle

Outre la fonction de régulateur transcriptionnel et post-transcriptionnel, le complexe NF45-NF90 agit aussi sur la traduction de certains gènes dans des contextes cellulaires particuliers. Par exemple, dans des fibroblastes sénescents, le phénotype de sécrétion associé à la sénescence (SASP) est corrélé à une baisse d'expression de NF90 (Tominaga-Yamanaka et al. 2012). Dans ce modèle, NF90 lie les ARNm de nombreuses chimiokines, tels que MCP-1, GRO α , IL-6, IL-8, et la déplétion de NF90 entraîne une baisse d'expression protéique sans affecter les niveaux de ces ARNm. Ainsi, les auteurs proposent un modèle dans lequel NF90 réprime la traduction des ARNm codant pour le SASP dans des fibroblastes proliférants, et l'induction de la sénescence entraînerait la levée d'inhibition traductionnelle via NF90. D'autre part, NF90 a été identifié comme un régulateur de la traduction des gènes de réponse à l'interféron de type I (Watson, Bellora, and Macias 2020). La déplétion de NF90 par ARNi inhibe la traduction de plusieurs chimiokines pro-inflammatoires, comme l'IFN- β , CCL5, le TNF- α , CXCL10 ainsi que d'autres gènes de réponse aux interférons de type I, tel que IFIT2, IFIT3, et IFIH1 à la suite d'une stimulation des cellules par des ARNdb. La transfection d'ARNdb dans les cellules active de façon similaire aux virus des voies de signalisations impliquées dans l'immunité innée. Les ARN exogènes sont détectés par la kinase PKR, via ses domaines dsRBD, menant à la formation de granules de stress, et à un arrêt global de la traduction dans la cellule, constituant ainsi un mécanisme de défense rapide face à une infection virale. Quand PKR est activé, la kinase phosphoryle des dizaines de substrats nécessaires à la formation des granules de stress, tels que eIF2 α ou encore NF90 (Parker, Fierro-Monti, and Mathews 2001). NF90 est une composante structurelle des granules de stress. En effet la déplétion de NF90 prévient leurs formations à la suite d'une stimulation aux

ARNdb (Wen et al. 2014). PKR phosphoryle NF90 dans son domaine DZF (Thr188 et Thr315) empêchant l'interaction avec son partenaire NF45 et favorisant sa localisation dans les granules de stress (Harashima, Guettouche, and Barber 2010). Le mutant non phosphorylable de NF90 sur ces sites, sensibilise les cellules à l'infection au virus de la stomatite vésiculaire. Au-delà de la phosphorylation de PKR sur NF90, l'interaction directe entre NF90 et PKR, conditionne le seuil d'activation de PKR envers les ARN exogènes (Wen et al. 2014). Ainsi, dans son ensemble, NF90 joue un rôle important dans la régulation de la traduction dans un contexte infectieux. D'une part, NF90 est nécessaire à l'arrêt de la traduction induite par les ARNdb en participant à la formation des granules de stress, et d'autre part, NF90 permet à la cellule de traduire les ARNm pro-inflammatoires requis dans le mécanisme de défense face à l'infection virale.

1.2.3.3 Implications pathologiques du complexe NF45-NF90

1.2.3.3.1 Les cancers

L'altération de l'expression génique est une des caractéristiques majeures des cancers. La plupart des sous-types de cancers ont des activités transcriptionnelles modulées qui participent à la tumorigénèse (Bradner, Hnisz, and Young 2017). Outre les facteurs de transcription, l'activité et les niveaux d'expression des RBP coordonnent l'expression génique en régulant les processus d'épissage, de transport, de stabilité et de traduction des ARN. En effet, les RBP sont dérégulées de façon omniprésente dans les cancers. Wang et al. ont récemment analysé le statut génétique de la majorité des RBP connus (1542 RBP) sur plus de 7000 spécimens de cancer humains, et ont observé des dérégulation des RBP dans tous les sous-types de cancers étudiés comparativement aux tissus sains (15 sous-types de cancers TCGA vs GTEx) (Wang et al. 2018). Globalement, la grande majorité des altérations géniques des RBP sont des baisses d'expression, excepté pour une cinquantaine d'entre elles, qui sont à l'inverse surexprimées. Les RBP surexprimés dans les cancers possèdent

généralement des propriétés oncogéniques, par exemple la télomérase - l'enzyme conférant l'immortalité répliquative des cellules cancéreuses - est très souvent surexprimé dans les cancers et confère un avantage répliquatif (Zhang et al. 1999). Parmi les RBP fréquemment surexprimés, on retrouve aussi NF45 et NF90, dont l'identification comme proto-oncogène a émergé à la fin des 2000 avec la caractérisation de l'interaction entre NF90 et l'ARNm du *VEGF* dans un modèle de cancer du sein (Vumbaca et al. 2008). Le VEGF est un facteur de croissance fondamental impliqué dans les processus d'angiogenèse, d'invasion et de migration des cellules cancéreuses (Krock, Skuli, and Simon 2011). En condition hypoxique, NF90 stabilise l'ARNm du *VEGF* en se liant à la région 3'UTR. Chez la souris, des greffes orthotopiques de lignées cancéreuses du sein déplétées de NF90 montrent une réduction de l'expression du VEGF, du volume tumoral et du nombre de vaisseaux sanguins dans les tumeurs. Plus récemment, Zhang et al. ont observé un phénotype similaire dans les cancers du col de l'utérus associés à la régulation du VEGF et ont montré que les protéines NF45 et NF90 étaient surexprimées dans des tumeurs de patients comparé aux tissus sains adjacents (Zhang et al. 2018). Plusieurs études ont observé la surexpression protéique de NF90 et plus particulièrement de NF45 dans les tumeurs de patients et dans plusieurs types de cancers (Figure 20). De façon intéressante, l'expression de NF45 ou NF90 est corrélée à des stades avancés de cancer et donc associée à de mauvais pronostics. Au-delà de la régulation de l'angiogenèse via le VEGF, NF45 et NF90 semblent étroitement liés au statut prolifératif des cellules cancéreuses. En effet, l'expression protéique de NF45 ou NF90 corrèle fortement avec le marqueur de prolifération Ki-67 (Huang et al. 2014). Par exemple dans les hépatocarcinomes, NF45 et NF90 sont aussi surexprimés, et régulent la stabilité de l'ARNm codant pour la cycline E affectant ainsi le cycle cellulaire et la prolifération (Jiang et al. 2015). D'autres mécanismes ont été mis en évidence dans ce modèle, comme la régulation de la biogénèse du miARN miR-7 par NF45-NF90 qui impactent indirectement l'expression de l'EGFR (Higuchi et al. 2016). Cette relation entre NF90 les miARN a été mise en évidence dans plusieurs sous-types de cancers, tels que ceux de l'œsophage (Lin et al. 2019; Chen et al. 2018), de l'ovaire (Barbier et al. 2018), de la vessie (Zhuang et al. 2017), et du colon (Zhou et

al. 2016). Ainsi au cours des dernières années, la surexpression de NF45 et NF90 dans les cancers a été constaté de manière redondante et semble promouvoir la progression tumorale en participant à l'altération de l'expression génique principalement à l'échelle post-transcriptionnelle.

Types de Cancer	Surexpression protéique dans les cancers de patient	Effet sur la croissance tumorale in vivo	Protéines étudiées	Références
Hépatocarcinome	Oui N=27	Oui	NF90	(Jiang et al. 2015)
Hépatocarcinome	Oui N=10	Oui	NF45	(Cheng et al. 2016)
Carcinome pulmonaire	Oui N=143	N/D	NF90	(Xu et al. 2020)
Carcinome pulmonaire à petite cellules	Oui N=15	Oui	NF45	(Zhao et al. 2019)
Carcinome non à petite cellules	Oui N=104	N/D	NF45	(Ni, Mao, et al. 2015)
Cancer col de l'utérus	Oui N=20	Oui	NF45 et NF90	(Zhang et al. 2018)
Carcinome épidermoïde de l'œsophage	Oui deux études N=77 et N=105	Oui	NF45	(Wen-Jian et al. 2019; Ni, Zhu, et al. 2015)
Cancer colorectal	N/D	Oui	NF90	(Zhou et al. 2016)
Cancer de la vessie	Oui N=40	N/D	NF90	(Zhuang et al. 2017)
Carcinome pancréatique	Oui N=122	N/D	NF45	(Wan et al. 2015)
Cancer de l'estomac	Oui N=58	N/D	NF90	(Yin et al. 2017)
Cancer de l'ovaire	N/D, ARNm seulement N=83	N/D	NF90	(Zhu and Yu 2010)
Gliome	Oui N=121	N/D	NF45	(Huang et al. 2014)

Figure 20. Tableau récapitulatif des différents types de cancer impliquant une surexpression de NF45 ou NF90

1.2.3.3.2 Les Virus

Le succès des virus en tant que pathogènes dépend de leur capacité à se répliquer dans les cellules hôtes. Ils y parviennent en reprogrammant activement le métabolisme des cellules hôtes pour soutenir le processus d'infection et permettre aux virus de s'échapper ou de supprimer les mécanismes de défense de l'hôte. Les virus sont classifiés selon le type d'acide nucléique qui compose leurs génomes (ADN, ARN simple brin, double brin). En raison de la nature du génome des virus à ARN, ces derniers doivent utiliser de nombreuses RBP d'origine virale et de l'hôte, pour leur réplication (Nagy and Pogany 2011). La réplication de l'ARN génomique viral ayant lieu dans le cytosol des cellules infectées, les virus doivent être capables de reconnaître et d'amplifier uniquement leurs propres génomes tout en discriminant les nombreux ARN cellulaires présents dans les cellules. Dans l'ensemble, l'efficacité et la spécificité de l'amplification du génome de l'ARN viral sont tout à fait remarquables car l'hôte lui-même manque de mécanismes de réplication d'ARN préexistants. Les virus à ARN cooptent des RBP des cellules hôtes pour faciliter leur réplication ou échapper aux voies de dégradation de l'ARN de l'hôte, tel est le cas pour NF45 et NF90. En effet, l'hétérodimère a été identifié à de multiples reprises comme facteurs d'hôtes dans plusieurs espèces de virus à ARN (Figure 21). Dans le cas du virus de l'hépatite C, le complexe NF45-NF90 interagit avec les extrémités 5' et 3' du génome. L'hétérodimère joue un rôle de chaperonne en circularisant le génome viral contribuant ainsi à la coordination de la réplication (Schmidt et al. 2017). D'autre part, le recrutement de NF45-NF90 par le virus participe à l'affaiblissement des mécanismes de défense de la cellule hôte. Comme nous l'avons vu précédemment, NF90 coopère avec PKR dans la détection des ARNdb exogènes et l'arrêt de la traduction dans les cellules infectées par des virus. L'infection du virus de la grippe (influenza A) mène à l'activation de PKR et à une réponse de la cellule hôte. La déplétion de NF90 prévient l'activation de PKR de façon similaire à un variant du virus de la grippe qui inhibe directement PKR via sa protéine mutante NS1 (Wen et al. 2014). Dans son ensemble, le complexe NF45-NF90 semble avoir un rôle double dans le contexte de l'infection virale. D'une part il peut être

recruté comme un facteur d'hôte aidant à la réplication virale, et d'autre part il participe aux mécanismes de défense de la cellule.

Espèce de virus	Classe	Mécanisme via NF45-NF90	Références
Hépatite C	ARNsb (+)	Interaction avec les extrémités 5'-3' du génome virale	(Lee et al. 2011; Isken et al. 2007 Schmidt et al. 2017)
Dengue	ARNsb (+)	Interaction avec l'extrémité 3' (<i>SL loop</i>) du génome virale	(Gomila, Martin, and Gehrke 2011)
Rhinovirus Humain de type 2	ARNsb (+)	Interaction avec la séquence IRES en 5'UTR du génome virale	(Merrill and Gromeier 2006)
Zaire Ebola	ARNsb (-)	Interaction avec la polymérase virale VP35	(Shabman et al. 2011)
Influenza	ARNsb (-)	Interaction avec la protéine virale NP et affecte la fonction de la polymérase virale	(Wang et al. 2009; Bortz et al. 2011)
Immunodéficience Humaine (VIH)	ADN	Module l'expression des ARN viraux cycline T1 et Tat/TAR	(Agbottah et al. 2007; Li and Belshan 2016)
Hépatite B	ADN	Interagit avec la séquence d'ARN pré-génomique d'encapsidation	(Shin et al. 2002)
Adénovirus	ADN	Interagit avec les ARN non codants viraux VA	(Liao, Kobayashi, and Mathews 1998)

Figure 21. Tableau récapitulatif des différentes espèces de virus où NF45-NF90 sont des facteurs d'hôtes

1.3 Hypothèse de recherche

L'ensemble des études réalisées sur NF45 et NF90 mettent en lumière le rôle important et multimodale du complexe dans la régulation de l'expression génique à différents niveaux. En effet, l'hétérodimère NF45-NF90, via sa capacité à lier les ARN structurés, peut influencer l'expression génique de la transcription à la traduction. Au cours de la dernière décennie, NF45 et NF90 ont été identifiés comme des facteurs pro-oncogéniques qui sont surexprimés dans différents types de cancers. L'expression de ces protéines est étroitement liée au statut prolifératif des cancers en question. Quelques études ont déjà mis en lumière un rôle sous-jacent de NF90 dans la régulation de la cycline E (Jiang et al. 2015) dans les hépatocarcinomes ou encore de p21 lors de la myogenèse (Shi et al. 2005). Ainsi nous avons formulé l'hypothèse que le complexe NF45-NF90 régule l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, et plus particulièrement de la progression dans le cycle cellulaire (Chapitre 2). Étant donné l'interconnexion qui existe entre les différents niveaux de régulation du cycle cellulaire, dans un second temps nous avons étudié les régulations de NF45-NF90 au cours du cycle cellulaire (Chapitre 3). Enfin, la capacité de reconnaissance des ARN par NF90 est très étroitement liée à sa liaison à NF45. Les implications de NF45-NF90 dans le développement tumoral ainsi que dans la réplication virale, nous a mené à chercher des petites molécules ciblant l'interaction du complexe et pouvant avoir un intérêt thérapeutique potentiel (Chapitre 4).

2 Chapitre 2: NF45 and NF90 Regulate Mitotic Gene Expression by Competing with Staufen-Mediated mRNA Decay

Sami Nourreddine¹, Geneviève Lavoie¹, Justine Paradis², Khaled Ben El Kadhi³, Antoine Méant¹, Léo Aubert¹, Benoit Grondin¹, Patrick Gendron¹, Benoit Chabot⁴, Michel Bouvier^{1,5}, Sébastien Carreno^{1,6}, Philippe P. Roux^{1,6,7}

¹Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada.

²Moore's Cancer Center, University of California, San Diego, La Jolla, CA, 92037, USA.

³Department of Biology, New York University, New York, NY, 10003, USA.

⁴Department of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, J1H 5N4, Canada.

⁵Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada.

⁶Department of Pathology and Cell Biology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada.

⁷Lead Contact

Nourreddine et al., 2020, Cell Reports 31, 107660 May 19, 2020

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107660>

2.1 Mise en contexte

Il y'a quelques années, notre laboratoire a réalisé plusieurs analyses protéomiques afin d'identifier de nouveaux régulateurs de la traduction mTOR-dépendante. Ainsi, Tcherkezian et al. ont découvert LARP1 comme un nouveau régulateur important de la traduction des ARNm 5'TOP-dépendante de mTOR (Tcherkezian et al. 2014). Ces travaux ont aussi mené à l'identification de NF45 et NF90, dont l'enrichissement dans les cellules cancéreuses suggérait leur implication dans le contrôle de la prolifération cellulaire.

Nous avons d'abord étudié le phénotype de cellules déplétées en NF45 ou NF90 par vidéo microscopie, et ces travaux ont démontré des défauts multiples en mitose, notamment lors de la cytokinèse ainsi que dans la ségrégation des chromosomes. L'analyse transcriptomique des cellules déplétées pour NF45 a révélé une baisse d'expression d'un ensemble d'ARNm codant pour des protéines essentielles à la mitose. Afin d'identifier le mécanisme par lequel le complexe NF45-NF90 régule l'expression des gènes mitotiques, nous avons déterminé l'interactome de NF45 et NF90 par BioID et découvert une interaction avec le complexe de dégradation des ARNm via Staufen1-UPF1 (SMD). Ainsi, nos travaux ont démontré que la régulation de l'expression de certains gènes mitotiques s'opère via une compétition entre Staufen et NF90 pour lier ces ARNm.

Cette étude a permis de mettre en lumière plusieurs gènes du cycle cellulaire contrôlés de manière post-transcriptionnelle par le complexe NF45-NF90. De plus, nous avons établi l'interactome de l'hétérodimère NF45-NF90 et ainsi identifié plusieurs nouvelles pistes sur les différents mécanismes dans lesquels ce complexe pourrait être impliqué.

2.2 Abstract

In human cells, the expression of ~1000 genes is modulated throughout the cell cycle. While some of these genes are controlled by specific transcriptional programs, very little is known about their post-transcriptional regulation. Here, we analyzed the expression signature associated with all 687 RNA-binding proteins (RBPs), and identify 39 that significantly correlated with cell cycle mRNAs. We find that NF45 and NF90 play essential roles in mitosis, and transcriptome analysis revealed that they are necessary for the expression of a subset of mitotic mRNAs. Using proteomics, we identify protein clusters associated with the NF45-NF90 complex, including components of Staufen-mediated mRNA decay (SMD). We show that depletion of SMD components increases the binding of mitotic mRNAs to the NF45-NF90 complex, and rescues cells from mitotic defects. Together, our results indicate that the NF45-NF90 complex plays essential roles in mitosis by competing with the SMD machinery for a common set of mRNAs.

2.3 Introduction

Progression through the cell cycle requires the periodic expression of ~1000 genes, which are coordinated by phase-specific transcriptional programs (Whitfield et al., 2002). Some of the best examples are members of the E2F family (Dyson, 1998), which mediate the expression of genes necessary for S-phase entry and DNA synthesis (Trimarchi and Lees, 2002). Although the transcriptional control of G1/S transition is well documented, corresponding events mediating G2/M transition are less understood (Lim and Kaldis, 2013). FoxM1 is a member of the Forkhead box (Fox) superfamily of transcription factors (Hannenhalli and Kaestner, 2009; Myatt and Lam, 2007), and its target genes include essential regulators of mitosis and components of the spindle assembly checkpoint (SAC) (Sadasivam et al., 2012; Wonsey and Follettie, 2005). During the G2 phase, FoxM1 recruits a transcriptional co-activator, the histone deacetylase p300/CREB binding protein, which promotes the expression of genes responsible for driving mitotic entry (Laoukili et al., 2008). Despite the fact that the expression of almost half of cell cycle genes peaks in G2 and/or M phases (Whitfield et al., 2002), few transcription factors were shown to participate in G2/M transition, suggesting additional mechanisms of regulation.

RNA-binding proteins (RBPs) have emerged as essential regulators of gene expression (Hentze et al., 2018). Nuclear Factor (NF) 45 and 90 are respectively encoded by the ILF2 and ILF3 genes, and interact via their DZF (domain associated with zinc fingers) (Wolkowicz and Cook, 2012). NF90 also contains two double-stranded RNA-binding motifs (dsRBMs) and arginine–glycine-rich (RGG/RG) regions, which mediate nucleic acid binding (Masliyah et al., 2013; Thandapani et al., 2013). NF90 regulates the stability of various transcripts, including those encoding IL-2, Tau, VEGF and MyoD (Larcher et al., 2004; Shi et al., 2005; Vumbaca et al., 2008; Zhu et al., 2010). NF45 and NF90 are ubiquitously expressed in human tissues (Buaas et al., 1999), and are upregulated in several malignancies (Guo et al., 2012; Huang et al., 2014; Ni et al., 2015; Song et al., 2017; Wan et al., 2015). Genome-wide CRISPR/Cas9 screens revealed that ILF2 and ILF3 are essential fitness genes (Hart et al., 2015; Wang et

al., 2015). Accordingly, depletion of NF45 or NF90 was shown to perturb the proliferation of various cell lines (Guan et al., 2008), but their exact mechanism of action remain elusive.

Here we show that the NF45-NF90 complex plays an important role in mitotic progression and genomic stability. Depletion of NF45 or NF90 induces pleiotropic cell-cycle defects, including chromosome mis-segregation and frequent failure of cytokinesis. Cells depleted in NF45 or NF90 fail to synchronize in mitosis in response to spindle poisons, suggesting specific SAC defects. Transcriptome analysis revealed that NF45 and NF90 are necessary for the expression of a cluster of mitotic mRNAs, which also associate with the NF45-NF90 complex. Using a proteomic approach to characterize the NF45-NF90 interactome, we identified several proteins involved in RNA metabolism, including Staufen-mediated mRNA decay (SMD). We found that the NF45-NF90 complex competes with SMD components to maintain the expression of mitotic mRNAs and promote mitotic progression.

2.4 Results

NF45 and NF90 form an RNA-binding complex that correlates with cell cycle mRNAs

To identify RBPs that may be involved in the expression of cell cycle genes, we analyzed the mRNA signature associated with each of the 687 genes encoding proteins capable of binding RNA (KW-0694 from UniProt). We analyzed the most correlated genes ($r > 0.5$) for potential enrichment in cell cycle mRNAs (go.BP:0007049), which resulted in 39 RBPs (~5%) with significant values ($p > 0.05$) (Figure 1A; Table S1). Amongst those, we identified HuR/ELAVL1 ($p = 4.61 \times 10^{-16}$), YBX1 ($p = 3.65 \times 10^{-5}$) and DDX3X ($p = 3.71 \times 10^{-2}$) as positive hits, which encode RBPs known to regulate the expression of several cell cycle genes (Kotake et al., 2017; Lai et al., 2010; Wang et al., 2000). We also identified ILF2 ($p = 1.63 \times 10^{-31}$) and ILF3 ($p = 2.42 \times 10^{-2}$), whose expression significantly correlates with cell cycle mRNAs (Figure 1B). These genes encode NF45 and NF90 (Figure 1C), respectively, which interact in cell via their

DZF domains (Figure 1D and 1E). Mutations within the DZF domain of NF45 (D308R/R319E) prevent its association with NF90, as found by co-immunoprecipitation (Figure 1F) and using a bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assay (Figure 1G). To address the reciprocal regulation of NF45 and NF90, both proteins were depleted using lentiviral vectors expressing short hairpin RNA (shRNA). Upon depletion of NF45 using two different shRNAs, we found a concomitant decrease in NF90 protein levels, despite mRNA levels being mostly unaffected by NF45 knockdown (Figure 1H). Similarly, we found that NF90 depletion reduced NF45 protein levels without negatively affecting its mRNA, suggesting that NF45 and NF90 mutually regulate their abundance in cells. To determine if NF45 binding to NF90 was required for this co-regulation, we depleted cells with a shRNA construct targeting the 3' untranslated region (3'UTR) of the NF90 mRNA and expressed either wild-type (WT) NF90 or NF90 mutated in its DZF domain (E312R/R323D). Whereas WT NF90 was able to rescue NF45 levels upon endogenous NF90 depletion, we found that mutant NF90 could not (Figure 1I). NF45 binding to NF90 was previously shown to enhance dsRNA binding to NF90 by ~ 10-fold (Schmidt et al., 2017b), suggesting that NF45 might simultaneously regulate NF90 levels and function in cells. Together, these results demonstrate that NF45 and NF90 form a heterodimeric RNA-binding complex that may regulate the expression of cell cycle genes.

The NF45-NF90 complex is required for mitotic progression and cytokinesis

Consistent with previous findings (Guan et al., 2008), we found that depletion of NF45 or NF90 inhibits the proliferation of HeLa cells (Figure 2A). While we did not detect major differences in the proportion of cells at each phase of the cell cycle, we observed an increase in polyploid cells (>4n) upon NF45 or NF90 depletion (Figure 2B and 2C). To understand the role of the NF45-NF90 complex in mitosis, we analyzed cells stably expressing Tubulin-GFP using time-lapse microscopy. During cytokinesis, cells depleted for NF45 or NF90 show high cortical instability characterized by blebbing (Figure 2D; Video S1 and S2). Mitotic cortical blebbing has been shown to be associated with cytokinesis failure (Birkenfeld et al., 2007; Charras et

al., 2006). Consistent with this, we found that a large proportion of cells (~50%) depleted for NF45 or NF90 undergo cytokinesis failure characterized by cleavage furrow regression (Figure 2D and 2E; Video S2). In addition, we found a large proportion of mitotic cells undergoing cell death (~40-50%) (Figure 2F). These mitotic catastrophes occurred at different phases of mitosis, including metaphase (Video S3), or after cytokinesis (Video S4), which corresponds to different programs of mitotic catastrophe (Vitale et al., 2011).

To identify potential causes of cytokinesis defects, we analyzed chromosome segregation in cells depleted for NF45 or NF90. We found that chromosome alignment was severely impaired in NF45- or NF90-depleted cells, with ~45-60% of metaphase cells showing one or more chromosomes outside of the metaphase plate (Figure 2G and 2H). These defects were almost always accompanied with asymmetric mitotic spindles of increased longitudinal lengths (Figure 2I and 2J), suggestive of defective kinetochore-microtubule attachments (Bharadwaj et al., 2004; Goshima et al., 1999). When such defects occur, cells are halted by the SAC to prevent unequal separation of the genome in anaphase (Musacchio, 2015). Despite the presence of unaligned chromosomes in metaphase cells depleted for NF45 or NF90, the length of time in mitosis was not significantly affected under these conditions (Figure 2K), suggesting potential SAC defects. To test SAC functionality in the context of NF45 or NF90 depletion, we synchronized cells in mitosis using nocodazole and measured mitotic index by quantifying histone H3 phosphorylation at Ser10 by flow cytometry (Figure 2L). While more than 50% of control cells were blocked in mitosis upon nocodazole treatment, only ~12% of cells depleted for NF45 or NF90 were positive for histone H3 phosphorylation. Consistent with potential SAC defects, we observed that a large proportion of NF45- or NF90-depleted cells (~50%) progressed to anaphase with visible chromatin bridges (Figure 2M and 2N). Altogether, these results show that depletion of the NF45-NF90 complex leads to pleiotropic mitotic defects, such as chromosome mis-segregation, aberrant spindle morphology, and cytokinesis failure, which likely contribute to polyploidy and/or mitotic catastrophe.

The NF45-NF90 complex regulates the expression of a cluster of mitotic genes

NF45 and NF90 have been implicated in different aspects of RNA metabolism, including transcription, mRNA stability and translation (Barber, 2009; Castella et al., 2015). To identify mRNAs that may be regulated by the NF45-NF90 complex, we analyzed the impact of NF45 depletion on polyadenylated RNAs using transcriptome data from the ENCODE consortium (Diehl and Boyle, 2016). Interestingly, we found that NF45 depletion was associated with a >2-fold reduction in the levels of 86 mRNAs, including ILF2 (Figure 3A; Table S2). As expected, ILF3 levels were unaffected by NF45 depletion (Figure 3A). Using g:Profiler (Reimand et al., 2016), we analyzed NF45-sensitive transcripts for potential enrichments in biological functions. Strikingly, we found significant enrichments in several Reactome pathways (<https://reactome.org/>) related to mitosis (Figure 3B), including “mitotic cell cycle” ($p = 4.7 \times 10^{-6}$) and “sister chromatid cohesion” ($p = 1.3 \times 10^{-4}$). We represented significantly downregulated genes involved in the mitotic cell cycle using STRING (Figure 3C). Among this heavily connected cluster, we found genes coding for mitotic kinases (CDK12, NEK2, PLK1), kinetochore proteins (CENPE, CENPA, NUF2), members of the SAC (BUB1), and the chromosomal passenger complex (BIRC5). We selected four genes that play essential roles in mitotic progression and SAC activation (NUF2, CDK1, CCNA2 and BIRC5), and confirmed their sensitivity to NF45 and NF90 depletion at the mRNA level (Figure 3D). We also observed a decrease in proteins encoded by these genes in HeLa, MDA-MB-231 and BT-20 cells depleted for NF45 or NF90 (Figure 3E and 3F; Figure S1A). Consistent with this, we found that depletion of NF45 or NF90 in MDA-MB-231 and BT-20 cells resulted in pleiotropic mitotic defects (Figure S1B-F).

To determine if the NF45-NF90 complex associates with mitotic mRNAs, we performed RNA-immunoprecipitation (RIP) assays on endogenous proteins (Figure 3G). We found that NUF2, CDK1, CCNA2 and BIRC5 mRNAs were significantly enriched in endogenous NF45 or NF90 immunoprecipitates compared to control mRNAs, suggesting that the NF45-NF90 complex specifically associates with these mitotic mRNAs. To assess if this association was dependent

on the RNA-binding domains of NF90, we performed RIP assays on cells that ectopically express WT NF90, or NF90 lacking one (Δ RBM2) or both dsRBMs (Δ RBM1/2). We found that deletion of one, but preferentially two dsRBMs, significantly impaired mitotic mRNA enrichment compared to WT NF90 (Figure 3H). To determine if the RNA-binding properties of NF90 are necessary for mitotic progression, we generated cells stably expressing WT NF90, NF90 Δ RBM2 or Δ RBM1/2, and assessed the effect of endogenous NF90 depletion on the frequency of binucleated cells (Figure 3I). While we found that expression of WT NF90 rescues endogenous NF90 depletion, our results show that NF90 Δ RBM2 and Δ RBM1/2 do not reduce polyploidy (Figure 3J and 3K). These results indicate that the dsRBMs of NF90 are essential for its role in mitotic progression.

The NF45-NF90 proximity interactome reveals a functional interplay with SMD components

The NF45-NF90 complex was previously shown to regulate different steps of gene expression (Castella et al., 2015), but the underlying molecular mechanisms remain elusive. To identify potential interactors of the NF45-NF90 complex, we conducted a proximity-dependent biotin identification (BioID) screen in HEK293 cells (Roux et al., 2018). For this, NF45 (WT and DZF-mutant) and NF90 (WT and DZF-mutant) were fused in-frame with a promiscuous form (R118G) of the biotin ligase BirA (BirA*) (Figure 4A). Each bait was stably integrated in the tetracycline-inducible Flp-In T-Rex HEK293 cell system, and additional control cell lines (No BirA*, BirA*-GFP) were generated to enable data analysis. BioID coupled with mass spectrometry (MS) was performed in biological triplicates on these baits grown under standard conditions (Figure 4A). SAINTexpress (Teo et al., 2014) was used to define high-confidence proximity interactions and only high-confidence interactions (SAINT \geq 0.80) were considered further. Using this approach, we identified 63 and 83 prey proteins (FDR < 0.05; SAINT > 0.8) for WT NF45-BirA* and WT NF90-BirA*, respectively (Venn diagram in Figure 4A; Table 3). From these, 44 were found to be common to both baits, including known interactors of the

NF45-NF90 complex, such as ZFR and PKR (EIF2AK2) (Saunders et al., 2001; Wolkowicz and Cook, 2012). Using the DZF-mutant (D308R/R319E) of NF45 as bait, we observed a large decrease in identified preys, whereas this was not the case with the DZF-mutant of NF90 (E312R/R323D) (dot plot in Figure 4A). These results suggest that the NF45 proximal interactome depends on NF90 binding, but that NF90 does not require NF45 for interacting with most of its partners. Interestingly, most preys common to NF45 and NF90 are RNA-binding proteins that can be represented in four functional clusters, including RNA splicing ($p = 9.44 \times 10^{-15}$), ribosome biogenesis ($p = 8.56 \times 10^{-3}$), host immune response ($p = 1.6 \times 10^{-2}$) and mRNA stability ($p = 2.93 \times 10^{-4}$) (Figure 4A). These results suggest that the NF45-NF90 complex regulates several aspects of RNA metabolism, including RNA splicing and stability.

To investigate if the NF45-NF90 complex regulates mitotic RNA splicing, we performed alternative splicing PCR (ASPCR) and quantified the relative abundance of spliced isoforms in response to NF45 or NF90 depletion. For this, we have analyzed all mitotic genes found to be downregulated in the transcriptome of NF45-depleted cells (Figure 3C; Table S2), but did not find significant splicing alterations (Figure S2A). NF45 and NF90 are also known to regulate gene expression at the transcriptional level (Nakadai et al., 2015; Wu et al., 2018). To determine if the NF45-NF90 complex regulates mitotic gene transcription, we performed luciferase assays using FoxM1 (6xDNA-binding motif) or CDK1 (full promoter) reporters, which were validated using Okadaic acid (Figure S3A and S3B) (Alvarez-Fernandez et al., 2011; Liu and Bird, 1998). Using these reporter assays, we found that overexpression or knockdown of NF45 or NF90 did not modulate CDK1 promoter or FoxM1-dependent activities (Figure S3C-S3F), indicating that the NF45-NF90 complex does not regulate mitotic genes at the transcriptional level. The NF45-NF90 complex is known to regulate translation of XIAP and cIAP1 (Faye et al., 2013). To test whether the NF45-NF90 complex affects translation of mitotic genes, we performed ribosome profiling in cells depleted for NF45 or NF90. These experiments did not reveal any translational regulation of mitotic genes by the NF45-NF90 complex (Figure S4).

In addition to RNA splicing components, we identified Stau1, Stau2 and UPF1 as proximity interactors of NF45 and NF90, which are components of the Staufen-mediated mRNA decay (SMD) machinery (Figure 4A). Stau1 and Stau2 are known to bind mRNAs via their 3'UTR and to recruit the UPF1 helicase, leading to mRNA decay in the context of myogenesis, adipogenesis, and apoptosis (Park and Maquat, 2013; Sakurai et al., 2017). We analyzed enhanced crosslinked immunoprecipitation (eCLIP) data for NF90 and UPF1 obtained from the ENCODE consortium (Figure S5), and found common coordinates in the 3'UTR of several mitotic genes, such as BIRC5, CDK1 and PLK1 (Figure S5C). While ~30% of UPF1 peaks were found to intersect with NF90 peaks (Figure S5A), these results do not necessarily suggest the presence of common mRNA regions or sequence motifs. To confirm BioID results related to SMD components, we performed a streptavidin pull-down of biotinylated proteins from BirA*, BirA*-GFP, NF45-BirA* and NF90-BirA* cells. We confirmed that UPF1 is biotinylated in NF45-BirA* and NF90-BirA* cells, but not in control cells (Figure 4B). To further confirm these results, we immunoprecipitated endogenous UPF1 and determined the presence of endogenous NF45 and NF90, as well as HA-tagged Stau1 (Figure 4C). We found that the NF45-NF90 complex co-immunoprecipitates with SMD components, and that this interaction is sensitive to RNase A treatment, suggesting an RNA component to this interaction (Figure 4C). Consistent with previous findings (Kim et al., 2005), RNase A treatment did not disrupt the direct interaction between Stau1 and UPF1 (Figure 4C).

Interestingly, Stau1, Stau2 and NF90 possess dsRBMs, suggesting that they bind similar structures within target mRNAs. Stau1 overexpression was shown to negatively affect mitosis (Boulay et al., 2014), and Stau2 is important for spindle integrity in mouse oocytes (Cao et al., 2016). To assess if Stau1 and/or Stau2 affect expression of mitotic mRNAs regulated by NF90, we performed qPCR in cells depleted for NF90 alone, or in combination with Stau1 or Stau2 depletion (Figure 4D). We found that depletion of Stau1 and most importantly Stau2, rescued mitotic mRNA levels depleted by NF90 knockdown (Figure 4D), suggesting that Stau1/2 counteract NF90 in the regulation of mitotic mRNAs. To assess if NF90 and Stau1/2 compete

for binding to the same mRNAs, we performed RIP assays on endogenous NF90 from cells that were subjected to Stau1 or Stau2 depletion. Compared to control cells (shNT), we found that Stau2 depletion increased NF90-binding to BIRC5, CCNA2, NUF2 and CDK1 mRNAs, while Stau1 depletion only increased CDK1 binding (Figure 4E). These results suggest that the NF45-NF90 complex competes with SMD components for the expression of mitotic mRNAs. To determine the biological significance of these findings, we tested if Stau1 or Stau2 knockdown using 4 different shRNAs could reverse the mitotic phenotype induced by NF90 depletion. We first quantified mRNA levels of ILF3, STAU1 and STAU2 by qPCR (Figure S2B) and found that all shRNAs lead to knockdown of the targeted transcripts. Quantification of binucleated cells showed that shRNAs targeting Stau2 rescued the mitotic defects observed in NF90-depleted cells (Figure 4F). Together, these results suggest that the NF45-NF90 complex likely competes with the SMD machinery for the regulation of important mitotic mRNAs (Figure 4G).

2.5 Discussion

In this study, we identified NF45 and NF90 as RBPs that regulate the expression of cell cycle mRNAs (Figure 1). We show that deregulation of the NF45-NF90 complex leads to pleiotropic mitotic defects (Figure 2), and that the NF45-NF90 complex alters expression of genes that are essential for mitotic progression (Figure 3). We find that the NF45-NF90 complex associates with mitotic mRNAs, and that both dsRBMs of NF90 are required for mitotic fitness (Figure 3). Using BioID, we identify SMD components as proximity interactors of the NF45-NF90 complex, and find that depletion of Stau2, and to a lesser extent Stau1, enhances the association of mitotic mRNAs to NF90, and rescues mitotic defects observed upon NF90

depletion (Figure 4). Together, our results indicate that the NF45-NF90 complex competes with SMD components for mitotic mRNAs and thereby promotes mitotic progression (Figure 4G).

Our results indicate that the expression of 39 RBPs significantly correlates with cell cycle mRNAs (Figure 1). Amongst identified proteins, we found both NF45 and NF90, which form an obligate heterodimer in cells. Both proteins have previously been shown to correlate with cell proliferation in various cellular contexts, including many tumor tissues (Guo et al., 2012; Hu et al., 2013; Huang et al., 2014; Jin et al., 2018; Ni et al., 2015; Wan et al., 2015; Yin et al., 2017). NF90 was shown to positively regulate CCND1 and CCNE1 mRNA stability, and thereby promote G1/S transition (Jiang et al., 2015). Furthermore, genome-wide CRISPR screens have identified ILF2 and ILF3 as essential fitness genes in both immortalized and cancer cell lines (Hart et al., 2015; Wang et al., 2014). These findings indicate that the NF45-NF90 complex is important for cell proliferation, suggesting that they may be important therapeutic targets in cancer.

Our results show that the NF45-NF90 complex associates with several mitotic mRNAs in a dsRBM-dependent manner (Figure 3). dsRBMs are 65-70 amino acid long domains that recognize dsRNA via electrostatic interactions and structure complementarity, rather than sequence-specific interaction (Masliah et al., 2013). NF90 tandem dsRBMs have been crystalized with synthetic dsRNA, which revealed that the interaction occurs on two RNA minor grooves having G-C/C-G and A-U/U-A base pairs separated by 10 base pairs (Masliah et al., 2013). Interestingly, NF45 binding to NF90 enhances dsRNA binding by up to 10-fold (Schmidt et al., 2017a), suggesting that NF90 dsRNA targets might be indirectly modulated by NF45. Using RIP-arrays, two groups have determined the identity of mRNAs that interact with NF90 (Kuwano et al., 2008; Neplioueva et al., 2010); however, both studies found divergent results that may be explained by the different reagents used for immunoprecipitations. Interestingly, a recent study characterized the mRNA targets of the NF45-NF90 complex in mouse embryonic stem cells, including many mRNAs encoding mitotic proteins (Ye et al., 2017). Moreover, NF90

has been shown to be phosphorylated in mitotic cells (Matsumoto-Taniura et al., 1996; Smith and Miskimins, 2011), suggesting that specific mitotic kinases might regulate NF90 function. Altogether, these results indicate that the NF45-NF90 complex plays a ubiquitous role in mitosis, but more experimentation will be required to characterize the spectrum of mRNAs controlled by the NF45-NF90 complex and its posttranslational regulation throughout the cell cycle.

SMD is a mammalian degradation process mediated by Stau1- or Stau2-binding to 3'UTR dsRNA structures on mRNAs (Park and Maquat, 2013). Stau1 and Stau2 have been shown to be regulated during the G2/M phase of the cell cycle (Beaujois et al., 2017; Boulay et al., 2014), and ectopic Stau1 expression was shown to impair mitotic progression (Boulay et al., 2014), while Stau2 has been implicated in spindle integrity of mouse oocytes during meiosis (Cao et al., 2016). Here, we show that depletion of SMD components rescues the mitotic phenotype of NF90-depleted cells, suggesting a competition between both complexes. Besides their roles in mitosis, a broader relationship between SMD and the NF45-NF90 complex might exist. SMD is well known to play a role in myogenesis by negatively regulating the MyoD mRNA (de Morree et al., 2017; Yamaguchi et al., 2008). Interestingly, NF90 knockout mice display impairments in skeletal muscle differentiation due to reduced MyoD expression (Shi et al., 2005), suggesting an antagonistic role between Stau1/2-UPF1 and the NF45-NF90 complex in myoblast differentiation. It would thus be interesting to determine whether this functional relationship exist in other functions regulated by SMD, including adipogenesis (Cho et al., 2012), apoptosis (Sakurai et al., 2017), and myogenesis (de Morree et al., 2017; Yamaguchi et al., 2008).

2.6 Acknowledgments

We are thankful to Dr. Luc Desgroseillers for providing Stau1 plasmid and antibodies, and to Dr. Michael Mathews for providing NF45 and NF90 plasmids. We acknowledge the ENCODE

consortium for transcriptomics and eCLIP data. This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research (MOP-142374 and PJT-152995 to P.P.R., MOP-133683 to S.C., and B.C.), and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (P.P.R., S.C.). P.P.R. is a scholar of the Fonds de la recherche du Québec - Santé (FRQS). B.C. is the Pierre C. Fournier Chair in Functional Genomics. K.B.E.K. held a Ph.D. training award from the FRQS, a Ph.D. Fellowship Award from the Fondation Desjardins, and a Ph.D. Fellowship award from the Fondation du Grand Défi Pierre Lavoie.

2.7 Author contributions

S.N. designed and performed all experiments related to the phenotype induced by NF45 or NF90 depletion, the bioinformatic analysis revealing potential RBPs involved in cell cycle regulation, and in writing the manuscript. G.L. performed all immunoprecipitations including RIP assays, as well as all DNA sub-cloning. J.P. designed and performed BRET experiments. L.A. participated to the experimental design and discussions related to the overall goals of the project. A.M. and B.G. performed all BioID experiments and data analysis. K.B.E.K. helped in the design and analysis of live-cell imaging experiments. P.G. performed the bioinformatic analysis of transcriptome data. S.C., M.B., and P.P.R. participated in study design and data analysis. P.P.R. and S.N. drafted and finalized the manuscript.

2.8 Materials and Methods

Experimental Model and Subject. HeLa, MDA-MB-231 and HEK293 cells were maintained at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco) with 4.5 g/liter glucose

supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. BT-20 cells were maintained at 37°C in Alpha modified Eagle's Medium (Wisent) with 10% FBS and antibiotics.

DNA Constructs. The original plasmids encoding human NF45, NF90 (pCDNA3-NF45 and pCDNA3-NF90) and Stau1 (pKH3-HA-Stau1) were respectively obtained from Dr. Mathews (New Jersey Medical School, NJ, USA) and Dr. Degroseillers (Université de Montréal, QC, Canada). These DNA constructs were used as template for generating 6Myc-tagged NF45 WT, NF45 mut (D308R/R319D), NF90 WT, NF90 mut (E312R/R323D), NF90 Δ RMB2, NF90 Δ RBM1/2, Flag-tagged BirA*-NF45 WT, BirA*-NF45 mut (D308R/R319D), BirA*-NF90 WT, BirA*-NF90 mut (E312R/R323D) in the pcDNA3, pCDNA5-FRT and pLenti backbones. We obtained the 6xDB luciferase reporter (pcDNA3) from Dr. Medema (Netherland Cancer Institute, Amsterdam, Netherlands). We purchased the dual CDK1 promoter reporter (GLuc-SEAP-pEZXP-G04) from Genecopoeia (Rockville, MD, USA).

Immunoprecipitations and Immunoblotting. Cell lysates were prepared as previously described (Roux et al., 2004). Briefly, cells were washed three times with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in BLB (10 mM K₃PO₄, 1 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM MgCl₂, 50 mM β -glycerophosphate, 0.5% Nonidet P-40, 0.1% Brij 35, 0.1% deoxycholic acid, 1 mM sodium orthovanadate [Na₃VO₄], 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and a cOmplete protease inhibitor cocktail tablet (Roche). For immunoprecipitations, cell lysates were incubated with the indicated antibodies for 2 h, followed by 1 h of incubation with protein A-Sepharose CL-4B beads (GE Healthcare). Immunoprecipitates were washed three times in lysis buffer, and beads were eluted and boiled in 2 \times reducing sample buffer (5 \times buffer is 60 mM Tris-HCl [pH 6.8], 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, and 0.1% bromophenol blue). Eluates and total cell lysates were subjected to 10 to 12% SDS-PAGE,

and resolved proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes for immunoblotting. The data presented are representative of results from at least three independent experiments.

Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) Assays. BRET assays were performed as described previously (Mercier et al., 2002). For BRET400-GFP10, proteins were fused to RLucII (donor) and GFP10 (acceptor). Coelenterazine-400a (coel-400a) (Biotium) was used as the luciferase substrate to generate light with a maximal emission peak at 400 nm, allowing GFP10 excitation (maximum at 400 nm). BRET was measured using a Mithras LB940 Multimode Microplate Reader (Berthold Technologies) equipped with either a BRET480-YFP filter set (donor 480 ± 20 nm and acceptor 530 ± 20 nm filters) or a BRET400-GFP10 filter set (donor 400 ± 70 nm and acceptor 515 ± 20 nm filters). Briefly, cells were seeded the day after transfection in a poly-L-ornithine (Sigma-Aldrich)–pretreated 96-well microplate (CulturePlate; PerkinElmer Inc.). BRET values were collected after the addition of the luciferase substrate at a final concentration of 2.5 μ M. BRET signals were determined as the ratio of the light emitted by acceptor (YFP or GFP10) over donor (RLuc or RLucII).

RNA-Immunoprecipitation (RIP). Cells were washed with ice-cold PBS and lysed in RIP buffer (50 mM Tris-HCl at pH 7.4, 300 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.05% NP-40, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 200 U/mL RNase Out, 100 μ g/mL yeast tRNA (Sigma), cComplete protease inhibitors. For immunoprecipitations, cell lysates were precleared with protein A-Sepharose beads for 30 min and then incubated with the indicated antibody for 2 h, followed by 1 h of incubation with protein A-Sepharose beads. Immunoprecipitates were washed six times with RIP buffer and divided for immunoblotting and RNA extraction. RNA was eluted twice with elution buffer (PK; 50 mM Tris-HCl at pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% SDS, 5 mM DTT, 400 U/mL RNase Out, 0.25 μ g/mL yeast) during 15 min at 65°C and digested with 4 mg/mL proteinase K (Roche) for 40 min at 37°C. RNA was then extracted with phenol-chloroform.

Reagents and Antibodies. Anti-NF45 (Bethyl), Anti-N90 (Bethyl), Anti-NUF2 (Abcam), Anti-CDK1 (Santa Cruz), Anti-Cyclin A2 (Santa Cruz), Anti-Survivin (Novus Biologicals), Anti-Tubulin (Sigma-Aldrich), Anti-Actin (Sigma-Aldrich), Anti-Myc (Sigma-Aldrich), Anti-UPF1 (MBL), phosphor-H3 Ser10 (Cell Signaling), Nocodazole (Sigma-Aldrich), Puromycin (Sigma-Aldrich), DAPI vectashield (Vectorlabs), TexasRed-Phalloidin (Invitrogen). All secondary horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibodies used for immunoblotting were purchased from Chemicon.

RNAi and Viral Infections. For shRNA-mediated knockdown of NF45 or NF90, lentiviruses were produced using vectors from the Mission TRC shRNA library (Sigma-Aldrich) targeting NF45 (TRCN0000014553, TRCN0000329725), NF90 (TRCN0000014578, TRCN0000014582), Stau1 (TRCN0000164920, TRCN0000166217, TRCN0000158514, TRCN0000159567), and Stau2 (TRCN0000157149, TRCN0000153783, TRCN0000152870, TRCN0000178809). Cells were infected in the presence of 4 µg/mL polybrene (Sigma-Aldrich), and, 3 d after viral infection, HeLa, MDA-MB-231 and BT-20 cells were treated and respectively selected with 2, 1.5 and 2 µg/mL puromycin.

Immunofluorescence Microscopy. For immunofluorescence analyses, 6 x 10⁴ HeLa cells were seeded in 24-well plates containing coverslips. Twenty-four hours later, cells were fixed in 3.7% formaldehyde for 10 min. Cells were washed twice in PBS, permeabilized for 5 min in PBS containing 0.3% Triton X-100 and blocked with PBS containing 1% bovine serum albumin for 1h. Cells were incubated for 30min with anti-tubulin Alexa488 (Invitrogen), Phalloidin-Texas Red (Invitrogen) antibodies. Cells were stained with DAPI Vectashield (VectorLabs). Images were acquired on a DeltaVision microscope (Olympus U Plan S-Apo ×60 aperture) using softWoRx software equipped with a camera (CoolSNAP HQ2).

Transfections. HEK293 cells were transfected by calcium phosphate precipitation as previously described (Roux et al., 2004).

Live-cell Imaging. Five x 10⁴ cells were seeded in 8-well Open μ -Slide (Ibidi, GmbH) and allowed to adhere overnight. Cells were filmed at 37°C with a DeltaVision microscope (Olympus U Plan S-Apo \times 20/0.75 numerical aperture) using softWoRx software equipped with a camera (CoolSNAP HQ2). Images were acquired every 10 min for 18 h. Image analysis was done with softWoRx and image J softwares.

Proliferation Assays. For proliferation assays, HeLa cells were grown in medium supplemented with 5% FBS. The relative number of viable cells was measured every 24 h during four consecutive days using the 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (WST-1), cell proliferation assay from Roche, as shown elsewhere (Julien et al., 2010). The absorbance was measured at 490 nm using a Tecan GENios Plus microplate reader, and the results displayed represent the mean of triplicates \pm standard error (SE).

Synchronization and Flow Cytometric Analysis of Cell Cycle Distribution. HeLa cells were synchronized in mitosis with a double thymidine block followed by nocodazole (Sigma-Aldrich) treatment for 18 h. Twenty-four hours after being seeded, cells were exposed to 2 mM thymidine (Sigma Aldrich) for 16 h. Cells were then released for 6 h followed by a second thymidine block for a further 16 h, then HeLa cell were incubated overnight with nocodazole at 1.5 μ M. The DNA and RNA intercalating fluorescent dye propidium iodide (Sigma-Aldrich) was used to quantify cellular DNA content and cell cycle distribution. After treatment, HeLa cells were harvested and fixed in 95% ethanol at -20°C . Before analysis, cells were incubated with RNase A (100 $\mu\text{g/ml}$; Sigma-Aldrich) and stained with propidium iodide (40 $\mu\text{g/ml}$) for 30 min. Samples were immediately analyzed by flow cytometry with a BD FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences) at low flow rate. A total of 2 x 10⁴ events was recorded per sample, and the

cell fraction G0/G1, S and G2/M phases were quantified with BD FACSDiva software (BD Biosciences) and plots were done with FlowJo.

RNA-sequencing (RNAseq). Transcriptome datasets were obtained from the Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) consortium (ILF2 shRNA knockdown in HepG2 cells followed by RNAseq: ENCSR366FFV; Control shRNA against no target in HepG2 cells followed by RNAseq: ENCSR305XWT). Gene expression were quantified using HTseq count from the alignment files created by STAR. DESeq2 version 1.10.1 was then used to identify differentially expressed genes using a Wald test.

Analysis of TCGA Datasets. Using Nextprot (<https://www.nextprot.org/>), we downloaded a list of annotated RNA-binding proteins (KW-0694), consisting of 687 entries. Using cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>), we analyzed the TCGA breast invasive carcinoma dataset (1084 tumors) and extracted the mRNAs most correlated to each mRNA encoding RNA-binding proteins ($r \geq 0.5$). Using gProfiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/>), we assessed the statistical significance of GO term enrichments (Cell cycle; GO:0007049) within the lists of co-expressed mRNAs.

RNA Extraction and Quantitative Real-Time PCR. Total RNA from cells was extracted by using the RNeasy minikit (Qiagen). Total RNA was reverse transcribed by using a cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Gene expression levels of the endogenous controls glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and beta-actin (ACTB) were determined by using pre-validated TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems). Expression levels of queried and control genes were determined by using assays designed with the Universal Probe Library (UPL) from Roche. PCRs were performed on an ABI Real Time 7900HT cycler and analyzed

with SDS 2.2 software. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed with TaqMan gene expression master mix (Applied Biosystems), and all samples were tested in duplicate. mRNA levels of queried genes were normalized to the averaged levels of both GAPDH and ACTB.

Alternative Splice Isoform PCR (ASPCR). RT-PCR were performed by the RNomics Platform of the Université de Sherbrooke. Primers are listed below. Reverse transcription was done using 10 U of Transcriptor reverse transcriptase, 20 U of RNaseOUT (Invitrogen), 3.2 µg of random hexamers, 1 µM of dNTPs mix, 1 X Transcriptor RT reaction buffer and 0.2 – 2 µg of total RNA. PCR was done using 0.2 U of Platinum Taq, 0.6 µM of primers, 1.5 mM of MgCl₂, 10 ng of cDNA template, 1X of PCR buffer and 200 µM of dNTPs mix. PCR reactions were performed on thermocyclers GeneAmp PCR System 9700 (Thermo Scientific-Invitrogen). A first cycle of 15 min at 95 °C was followed by 35 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C, and 1 min at 72 °C. The reaction was ended with the extension step of 10 min at 72 °C. Visualization and analysis of amplified products were done using automated chip-based microcapillary electrophoresis on Labchip GX Touch HT instruments (Perkin Elmer).

Polysomal mRNA Profiling. Sucrose gradient velocity sedimentation was used to isolate the monosomal and polysomal fractions. For experiments using NF45 or NF90-depleted cells, following selection with puromycin, cells were passaged once in 15-cm dishes and then maintained in DMEM containing 5% serum and puromycin. HeLa NF45 or NF90-depleted cells were seeded in 15-cm dishes; 24 h later, fresh medium without puromycin was added, and cells were grown for another 24 h prior to harvesting. Ten minutes before harvesting, 100 µg/mL cycloheximide was added to the culture medium. Cells were washed in ice-cold PBS supplemented with 100 µg/mL cycloheximide and collected in polysome lysis buffer (PLB; 15 mM Tris at pH 7.4, 250 mM NaCl, 15 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 100 µg/mL cycloheximide,

1 mM DTT, 400 U/mL RNase Out [Invitrogen, Life Technologies], protease inhibitors.) Samples were centrifuged at $10,000 \times g$ for 10 min at 4°C . Protein concentration in the resulting supernatants was measured using the Bradford method, and equal amounts of protein were layered on a 20%-50% linear sucrose gradient and centrifuged in a Beckman SW41Ti rotor at $92,000 \times g$ for 3 h at 4°C . Following centrifugation, the absorbance at 254nm was continuously monitored and recorded using a Gradient Station IP (Biocomp) attached to a UV-MII (GE Healthcare) spectrophotometer. Polysomal fractions were collected, and RNA was extracted using RNeasy minikit (Qiagen).

Luciferase Assay. HEK293 cells were transfected using calcium-phosphate precipitation with the CDK1 promoter reporter or the 6xDB reporter (FoxM1 DNA-binding motif). For NF45 or NF90-overexpressing cells, HEK293 were co-transfected with the CDK1 promoter reporter or 6xDB reporter and NF45 or NF90. For NF45 or NF90-depleted cells, HEK293 cells were transduced with shNF45 or shNF90. Then, 24h post-selection, cells were transfected with luciferase reporters. 48h post-transfection luciferase activity was measured according to Secrete-Pair Gaussia Luciferase Assay Kit (Genecopoeia) and using the plate-reader Infinite 200 PRO (Tecan).

Generation of Stable Inducible Cell Pools and BioID Labeling. Parental HEK293 Flp-In T-Rex cells and cells expressing GFP-BirA R118G fused to flag tag were provided by Dr. Anne-Claude Gingras (University of Toronto, Toronto, Canada). Stable cell lines were generated in parental HEK293 Flp-In T-Rex cells expressing bait proteins of interest as described (Kean et al., 2012). Stable cell lines were selectively grown in the presence of $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ hygromycin up to 80% confluence before expression was induced using $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ tetracycline for 24 hours. For the BioID experiments, $50 \mu\text{M}$ biotin was added at the time of induction. Two 150-mm

plates were induced with tetracycline and treated with biotin for 24 hours before harvesting. Cells were pelleted at low speed, washed with ice-cold PBS and frozen at -80°C until purification. Cell pellets were thawed in 1.5 mL ice cold RIPA buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 8), 137 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS and 0.5% sodium deoxycholate. 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM dithiothreitol and a complete protease inhibitor cocktail tablet (Roche) were added immediately before use, supplemented with 250U of benzonase. The lysates were sonicated using three 10s bursts with 10s rest in between on ice at 20% amplitude. Lysates were centrifuged for 20 min and cleared supernatants were transferred to 2-ml microcentrifuge tubes, and a 60 μl bed volume of prewashed streptavidin-agarose beads (GE Healthcare) was added to each sample. Affinity purification was performed at 4°C on a nutator for 3 hours, and the beads were washed twice in RIPA buffer, and three times in 50 mM ammonium bicarbonate (ABC; pH 8.0). After affinity purification and removal of all washing buffer, beads were resuspended in 100 μl of 50 mM ABC (pH 8) with 1 μg of trypsin (Sigma-Aldrich) added and incubated at 37°C overnight with agitation. The next day, an additional 1 μg of trypsin was added to each sample, and the samples were incubated for 4 hours at 37°C . Beads were pelleted and the supernatant was transferred to a fresh 1.5-ml tube. The beads were then rinsed two times with 100 μl of MS-grade H_2O , and these rinses were combined with the original supernatant. The pooled fractions were centrifuged, and the supernatant was transferred to a new 1.5-ml tube and dried in a vacuum centrifuge. Tryptic peptides were resuspended in 10 μl of 5% formic acid.

Mass Spectrometry Acquisition and Data Analysis. Samples were reconstituted in formic acid 0.2% and loaded and separated on a homemade reversed-phase column (150 μm i.d. x 150 mm) with a 56-min gradient from 0–40% acetonitrile (0.2% FA) and a 600 nl/min flow rate on an Easy-nLC II (Thermo Fisher Scientific), connected to an Orbitrap Fusion Tribrid mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Each full MS spectrum acquired with a 60,000 resolution was followed by 20 MS/MS spectra, where the 12 most abundant multiply charged

ions were selected for MS/MS sequencing. Samples analyzed were converted to mzXML using ProteoWizard 3.0.4468 (Kessner et al., 2008) and analyzed using the iProphet pipeline (Shteynberg et al., 2011) implemented within ProHits (Liu et al., 2010). The database consisted of the human and adenovirus sequences in the RefSeq protein database (version 57) supplemented with “common contaminants” from the Max Planck Institute (<http://maxquant.org/downloads.htm>) and the Global Proteome Machine (GPM; <http://www.thegpm.org/crap/index.html>). The sequence database consisted of forward and reversed sequences. The search engines were Mascot (2.3.02; Matrix Science) and Comet (2012.01 rev.3 (Keller et al., 2002)), with trypsin specificity and two missed cleavage sites allowed. Methionine oxidation and asparagine/glutamine deamidation were set as variable modifications. The fragment mass tolerance was 0.01 Da and the mass window for the precursor was ± 10 ppm. The resulting Comet and Mascot results were individually processed by PeptideProphet and combined into a final iProphet output using the Trans-Proteomic Pipeline (TPP; Linux version, v0.0 Development trunk rev 0, Build 201303061711). TPP options were as follows. General options were -p0.05 -x20 -PPM -d"DECOY", iProphet options were pPRIME and PeptideProphet options were pP. All proteins with a minimal iProphet protein probability of 0.05 were parsed to the relational module of ProHits. Note that for analysis with SAINTexpress, only proteins with at least two peptides identify and with iProphet protein probability ≥ 0.95 are considered. This corresponds to an estimated protein level FDR of $\sim 0.5\%$.

Quantification and Statistical Analysis. Student's t-test was used for comparisons between two groups with at least $n=3$. A p-value < 0.05 was considered significant for all parameters tested. Error bars indicate standard deviation (s.d.). For Figure 2I-L, one-way ANOVA was performed. All experiments were performed a minimum of three times. Statistical details for each experiment are located in the results, figures, and figure legends.

2.9 References

- Alvarez-Fernandez, M., Halim, V.A., Aprelia, M., Laoukili, J., Mohammed, S., and Medema, R.H. (2011). Protein phosphatase 2A (B55alpha) prevents premature activation of forkhead transcription factor FoxM1 by antagonizing cyclin A/cyclin-dependent kinase-mediated phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 286, 33029-33036.
- Barber, G.N. (2009). The NFAR's (nuclear factors associated with dsRNA): evolutionarily conserved members of the dsRNA binding protein family. *RNA biology* 6, 35-39.
- Beaujois, R., Ottoni, E., Zhang, X., Gagnon, C., Hassine, S., Mollet, S., Viranaicken, W., and DesGroseillers, L. (2017). The M-phase specific hyperphosphorylation of Stauf2 involved the cyclin-dependent kinase CDK1. *BMC Cell Biol* 18, 25.
- Bharadwaj, R., Qi, W., and Yu, H. (2004). Identification of two novel components of the human NDC80 kinetochore complex. *The Journal of biological chemistry* 279, 13076-13085.
- Birkenfeld, J., Nalbant, P., Bohl, B.P., Pertz, O., Hahn, K.M., and Bokoch, G.M. (2007). GEF-H1 modulates localized RhoA activation during cytokinesis under the control of mitotic kinases. *Developmental cell* 12, 699-712.
- Boulay, K., Ghram, M., Viranaicken, W., Trepanier, V., Mollet, S., Frechina, C., and DesGroseillers, L. (2014). Cell cycle-dependent regulation of the RNA-binding protein Stauf1. *Nucleic acids research* 42, 7867-7883.
- Buaas, F.W., Lee, K., Edelhoff, S., Distche, C., and Braun, R.E. (1999). Cloning and characterization of the mouse interleukin enhancer binding factor 3 (Ilf3) homolog in a screen for RNA binding proteins. *Mamm Genome* 10, 451-456.
- Cao, Y., Du, J., Chen, D., Wang, Q., Zhang, N., Liu, X., Liu, X., Weng, J., Liang, Y., and Ma, W. (2016). RNA-binding protein Stau2 is important for spindle integrity and meiosis progression in mouse oocytes. *Cell cycle* 15, 2608-2618.

- Castella, S., Bernard, R., Corno, M., Fradin, A., and Larcher, J.C. (2015). Iif3 and NF90 functions in RNA biology. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* 6, 243-256.
- Charras, G.T., Hu, C.K., Coughlin, M., and Mitchison, T.J. (2006). Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs. *The Journal of cell biology* 175, 477-490.
- Cho, H., Kim, K.M., Han, S., Choe, J., Park, S.G., Choi, S.S., and Kim, Y.K. (2012). Staufen1-mediated mRNA decay functions in adipogenesis. *Molecular cell* 46, 495-506.
- de Morree, A., van Velthoven, C.T.J., Gan, Q., Salvi, J.S., Klein, J.D.D., Akimenko, I., Quarta, M., Biressi, S., and Rando, T.A. (2017). Staufen1 inhibits MyoD translation to actively maintain muscle stem cell quiescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, E8996-E9005.
- Diehl, A.G., and Boyle, A.P. (2016). Deciphering ENCODE. *Trends Genet* 32, 238-249.
- Dyson, N. (1998). The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes & development* 12, 2245-2262.
- Faye, M.D., Graber, T.E., Liu, P., Thakor, N., Baird, S.D., Durie, D., and Holcik, M. (2013). Nucleotide composition of cellular internal ribosome entry sites defines dependence on NF45 and predicts a posttranscriptional mitotic regulon. *Molecular and cellular biology* 33, 307-318.
- Goshima, G., Saitoh, S., and Yanagida, M. (1999). Proper metaphase spindle length is determined by centromere proteins Mis12 and Mis6 required for faithful chromosome segregation. *Genes & development* 13, 1664-1677.
- Guan, D., Altan-Bonnet, N., Parrott, A.M., Arrigo, C.J., Li, Q., Khaleduzzaman, M., Li, H., Lee, C.G., Pe'ery, T., and Mathews, M.B. (2008). Nuclear factor 45 (NF45) is a regulatory subunit of complexes with NF90/110 involved in mitotic control. *Molecular and cellular biology* 28, 4629-4641.

- Guo, Y., Fu, P., Zhu, H., Reed, E., Remick, S.C., Petros, W., Mueller, M.D., and Yu, J.J. (2012). Correlations among ERCC1, XPB, UBE2I, EGF, TAL2 and ILF3 revealed by gene signatures of histological subtypes of patients with epithelial ovarian cancer. *Oncology reports* 27, 286-292.
- Hannenhalli, S., and Kaestner, K.H. (2009). The evolution of Fox genes and their role in development and disease. *Nature reviews Genetics* 10, 233-240.
- Hart, T., Chandrashekhar, M., Aregger, M., Steinhart, Z., Brown, K.R., MacLeod, G., Mis, M., Zimmermann, M., Fradet-Turcotte, A., Sun, S., et al. (2015). High-Resolution CRISPR Screens Reveal Fitness Genes and Genotype-Specific Cancer Liabilities. *Cell* 163, 1515-1526.
- Hentze, M.W., Castello, A., Schwarzl, T., and Preiss, T. (2018). A brave new world of RNA-binding proteins. *Nature reviews Molecular cell biology* 19, 327-341.
- Hu, Q., Lu, Y.Y., Noh, H., Hong, S., Dong, Z., Ding, H.F., Su, S.B., and Huang, S. (2013). Interleukin enhancer-binding factor 3 promotes breast tumor progression by regulating sustained urokinase-type plasminogen activator expression. *Oncogene* 32, 3933-3943.
- Huang, Q., He, X., Qiu, X., Liu, X., Sun, G., Guo, J., Ding, Z., Yang, L., Ban, N., Tao, T., et al. (2014). Expression of NF45 correlates with malignant grade in gliomas and plays a pivotal role in tumor growth. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35, 10149-10157.
- Jiang, W., Huang, H., Ding, L., Zhu, P., Saiyin, H., Ji, G., Zuo, J., Han, D., Pan, Y., Ding, D., et al. (2015). Regulation of cell cycle of hepatocellular carcinoma by NF90 through modulation of cyclin E1 mRNA stability. *Oncogene* 34, 4460-4470.
- Jin, Z., Xu, L., Zhang, L., Zhao, M., Li, D., Ye, L., Ma, Y., Ren, S., Yu, H., Wang, D., et al. (2018). Interleukin enhancer binding factor 2 is a prognostic biomarker for breast

- cancer that also predicts neoadjuvant chemotherapy responses. *Am J Transl Res* 10, 1677-1689.
- Julien, L.A., Carriere, A., Moreau, J., and Roux, P.P. (2010). mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Molecular and cellular biology* 30, 908-921.
- Kean, M.J., Couzens, A.L., and Gingras, A.C. (2012). Mass spectrometry approaches to study mammalian kinase and phosphatase associated proteins. *Methods* 57, 400-408.
- Keller, A., Nesvizhskii, A.I., Kolker, E., and Aebersold, R. (2002). Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal Chem* 74, 5383-5392.
- Kessner, D., Chambers, M., Burke, R., Agus, D., and Mallick, P. (2008). ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development. *Bioinformatics* 24, 2534-2536.
- Kim, Y.K., Furic, L., Desgroseillers, L., and Maquat, L.E. (2005). Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* 120, 195-208.
- Kotake, Y., Arikawa, N., Tahara, K., Maru, H., and Naemura, M. (2017). Y-box Binding Protein 1 Is Involved in Regulating the G2/M Phase of the Cell Cycle. *Anticancer research* 37, 1603-1608.
- Kuwano, Y., Kim, H.H., Abdelmohsen, K., Pullmann, R., Jr., Martindale, J.L., Yang, X., and Gorospe, M. (2008). MKP-1 mRNA stabilization and translational control by RNA-binding proteins HuR and NF90. *Molecular and cellular biology* 28, 4562-4575.
- Lai, M.C., Chang, W.C., Shieh, S.Y., and Tarn, W.Y. (2010). DDX3 regulates cell growth through translational control of cyclin E1. *Molecular and cellular biology* 30, 5444-5453.
- Laoukili, J., Alvarez, M., Meijer, L.A., Stahl, M., Mohammed, S., Kleij, L., Heck, A.J., and Medema, R.H. (2008). Activation of FoxM1 during G2 requires cyclin A/Cdk-dependent

- relief of autorepression by the FoxM1 N-terminal domain. *Molecular and cellular biology* 28, 3076-3087.
- Larcher, J.C., Gasmi, L., Viranaicken, W., Edde, B., Bernard, R., Ginzburg, I., and Denoulet, P. (2004). IIf3 and NF90 associate with the axonal targeting element of Tau mRNA. *FASEB J* 18, 1761-1763.
- Lim, S., and Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* 140, 3079-3093.
- Liu, G., Zhang, J., Larsen, B., Stark, C., Breitkreutz, A., Lin, Z.Y., Breitkreutz, B.J., Ding, Y., Colwill, K., Pasculescu, A., et al. (2010). ProHits: integrated software for mass spectrometry-based interaction proteomics. *Nature biotechnology* 28, 1015-1017.
- Liu, H., and Bird, R.C. (1998). Characterization of the enhancer-like okadaic acid response element region of the cyclin-dependent kinase 1 (p34cdc2) promoter. *Biochemical and biophysical research communications* 246, 696-702.
- Masliah, G., Barraud, P., and Allain, F.H. (2013). RNA recognition by double-stranded RNA binding domains: a matter of shape and sequence. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70, 1875-1895.
- Matsumoto-Taniura, N., Pirollet, F., Monroe, R., Gerace, L., and Westendorf, J.M. (1996). Identification of novel M phase phosphoproteins by expression cloning. *Molecular biology of the cell* 7, 1455-1469.
- Mercier, J.F., Salahpour, A., Angers, S., Breit, A., and Bouvier, M. (2002). Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. *The Journal of biological chemistry* 277, 44925-44931.
- Musacchio, A. (2015). The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. *Current biology : CB* 25, R1002-1018.

- Myatt, S.S., and Lam, E.W. (2007). The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nature reviews Cancer* 7, 847-859.
- Nakadai, T., Fukuda, A., Shimada, M., Nishimura, K., and Hisatake, K. (2015). The RNA binding complexes NF45-NF90 and NF45-NF110 associate dynamically with the c-fos gene and function as transcriptional coactivators. *The Journal of biological chemistry* 290, 26832-26845.
- Neplioueva, V., Dobrikova, E.Y., Mukherjee, N., Keene, J.D., and Gromeier, M. (2010). Tissue type-specific expression of the dsRNA-binding protein 76 and genome-wide elucidation of its target mRNAs. *PloS one* 5, e11710.
- Ni, S., Zhu, J., Zhang, J., Zhang, S., Li, M., Ni, R., Liu, J., Qiu, H., Chen, W., Wang, H., et al. (2015). Expression and clinical role of NF45 as a novel cell cycle protein in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 36, 747-756.
- Park, E., and Maquat, L.E. (2013). Staufen-mediated mRNA decay. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* 4, 423-435.
- Reimand, J., Arak, T., Adler, P., Kolberg, L., Reisberg, S., Peterson, H., and Vilo, J. (2016). g:Profiler-a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). *Nucleic acids research* 44, W83-89.
- Roux, K.J., Kim, D.I., Burke, B., and May, D.G. (2018). BioID: A Screen for Protein-Protein Interactions. *Curr Protoc Protein Sci* 91, 19.23.11-19.23.15.
- Roux, P.P., Ballif, B.A., Anjum, R., Gygi, S.P., and Blenis, J. (2004). Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 13489-13494.

- Sadasivam, S., Duan, S., and DeCaprio, J.A. (2012). The MuvB complex sequentially recruits B-Myb and FoxM1 to promote mitotic gene expression. *Genes & development* 26, 474-489.
- Sakurai, M., Shiromoto, Y., Ota, H., Song, C., Kossenkov, A.V., Wickramasinghe, J., Showe, L.C., Skordalakes, E., Tang, H.Y., Speicher, D.W., et al. (2017). ADAR1 controls apoptosis of stressed cells by inhibiting Staufen1-mediated mRNA decay. *Nature structural & molecular biology* 24, 534-543.
- Saunders, L.R., Perkins, D.J., Balachandran, S., Michaels, R., Ford, R., Mayeda, A., and Barber, G.N. (2001). Characterization of two evolutionarily conserved, alternatively spliced nuclear phosphoproteins, NFAR-1 and -2, that function in mRNA processing and interact with the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *The Journal of biological chemistry* 276, 32300-32312.
- Schmidt, T., Friedrich, S., Golbik, R.P., and Behrens, S.E. (2017a). NF90-NF45 is a selective RNA chaperone that rearranges viral and cellular riboswitches: biochemical analysis of a virus host factor activity. *Nucleic acids research*.
- Schmidt, T., Knick, P., Lilie, H., Friedrich, S., Golbik, R.P., and Behrens, S.E. (2017b). The properties of the RNA-binding protein NF90 are considerably modulated by complex formation with NF45. *The Biochemical journal* 474, 259-280.
- Shi, L., Zhao, G., Qiu, D., Godfrey, W.R., Vogel, H., Rando, T.A., Hu, H., and Kao, P.N. (2005). NF90 regulates cell cycle exit and terminal myogenic differentiation by direct binding to the 3'-untranslated region of MyoD and p21WAF1/CIP1 mRNAs. *The Journal of biological chemistry* 280, 18981-18989.
- Shteynberg, D., Deutsch, E.W., Lam, H., Eng, J.K., Sun, Z., Tasman, N., Mendoza, L., Moritz, R.L., Aebersold, R., and Nesvizhskii, A.I. (2011). iProphet: multi-level integrative analysis of shotgun proteomic data improves peptide and protein identification rates and error estimates. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 10, M111 007690.

- Smith, N.L., and Miskimins, W.K. (2011). Phosphorylation at serine 482 affects stability of NF90 and its functional role in mitosis. *Cell Prolif* 44, 147-155.
- Song, D., Huang, H., Wang, J., Zhao, Y., Hu, X., He, F., Yu, L., and Wu, J. (2017). NF90 regulates PARP1 mRNA stability in hepatocellular carcinoma. *Biochemical and biophysical research communications* 488, 211-217.
- Teo, G., Liu, G., Zhang, J., Nesvizhskii, A.I., Gingras, A.C., and Choi, H. (2014). SAINTexpress: improvements and additional features in Significance Analysis of INTERactome software. *J Proteomics* 100, 37-43.
- Thandapani, P., O'Connor, T.R., Bailey, T.L., and Richard, S. (2013). Defining the RGG/RG motif. *Molecular cell* 50, 613-623.
- Trimarchi, J.M., and Lees, J.A. (2002). Sibling rivalry in the E2F family. *Nature reviews Molecular cell biology* 3, 11-20.
- Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M., and Kroemer, G. (2011). Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nature reviews Molecular cell biology* 12, 385-392.
- Vumbaca, F., Phoenix, K.N., Rodriguez-Pinto, D., Han, D.K., and Claffey, K.P. (2008). Double-stranded RNA-binding protein regulates vascular endothelial growth factor mRNA stability, translation, and breast cancer angiogenesis. *Molecular and cellular biology* 28, 772-783.
- Wan, C., Gong, C., Ji, L., Liu, X., Wang, Y., Wang, L., Shao, M., Yang, L., Fan, S., Xiao, Y., et al. (2015). NF45 overexpression is associated with poor prognosis and enhanced cell proliferation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Molecular and cellular biochemistry* 410, 25-35.
- Wang, T., Birsoy, K., Hughes, N.W., Krupczak, K.M., Post, Y., Wei, J.J., Lander, E.S., and Sabatini, D.M. (2015). Identification and characterization of essential genes in the human genome. *Science* 350, 1096-1101.

- Wang, T., Wei, J.J., Sabatini, D.M., and Lander, E.S. (2014). Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* 343, 80-84.
- Wang, W., Caldwell, M.C., Lin, S., Furneaux, H., and Gorospe, M. (2000). HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation. *The EMBO journal* 19, 2340-2350.
- Whitfield, M.L., Sherlock, G., Saldanha, A.J., Murray, J.I., Ball, C.A., Alexander, K.E., Matese, J.C., Perou, C.M., Hurt, M.M., Brown, P.O., et al. (2002). Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. *Molecular biology of the cell* 13, 1977-2000.
- Wolkowicz, U.M., and Cook, A.G. (2012). NF45 dimerizes with NF90, Zfr and SPNR via a conserved domain that has a nucleotidyltransferase fold. *Nucleic acids research* 40, 9356-9368.
- Wonsey, D.R., and Follettie, M.T. (2005). Loss of the forkhead transcription factor FoxM1 causes centrosome amplification and mitotic catastrophe. *Cancer research* 65, 5181-5189.
- Wu, T.H., Shi, L., Adrian, J., Shi, M., Nair, R.V., Snyder, M.P., and Kao, P.N. (2018). NF90/ILF3 is a transcription factor that promotes proliferation over differentiation by hierarchical regulation in K562 erythroleukemia cells. *PloS one* 13, e0193126.
- Yamaguchi, Y., Oohinata, R., Naiki, T., and Irie, K. (2008). Stau1 negatively regulates myogenic differentiation in C2C12 cells. *Genes Cells* 13, 583-592.
- Ye, J., Jin, H., Pankov, A., Song, J.S., and Blelloch, R. (2017). NF45 and NF90/NF110 coordinately regulate ESC pluripotency and differentiation. *Rna* 23, 1270-1284.
- Yin, Z.H., Jiang, X.W., Shi, W.B., Gui, Q.L., and Yu, D.F. (2017). Expression and Clinical Significance of ILF2 in Gastric Cancer. *Dis Markers* 2017, 4387081.

Zhu, P., Jiang, W., Cao, L., Yu, W., Pei, Y., Yang, X., Wan, B., Liu, J.O., Yi, Q., and Yu, L. (2010). IL-2 mRNA stabilization upon PMA stimulation is dependent on NF90-Ser647 phosphorylation by protein kinase Cbeta1. *J Immunol* 185, 5140-5149.

2.10 Figures

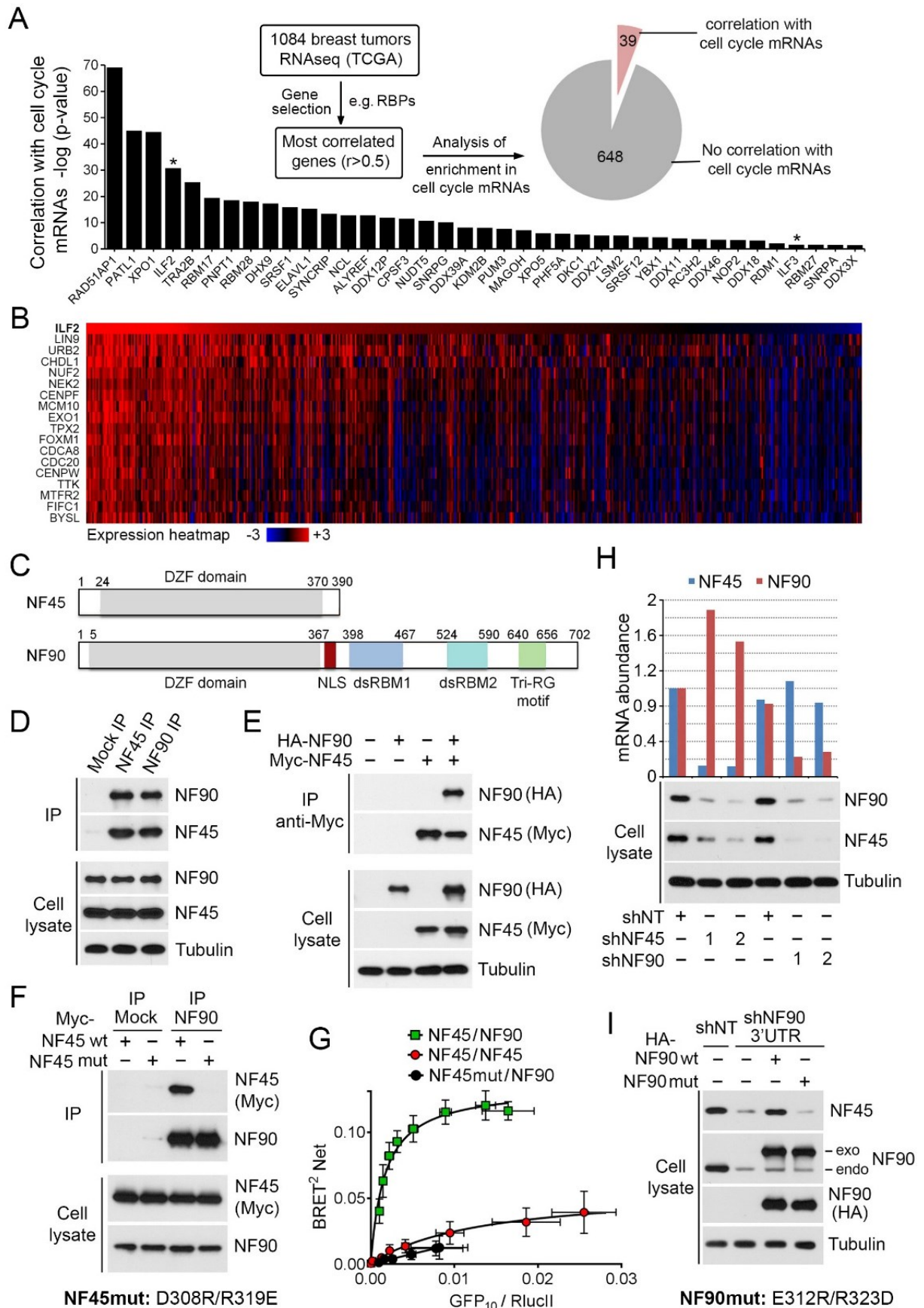


Figure 22. NF45 and NF90 form an RNA-binding complex that correlates with cell cycle mRNAs

(A) Expression analysis between genes coding for RNA-binding proteins (Nextprot ID KW-0694) and cell cycle genes (GO:0007049) from 1084 breast tumor transcriptomes (TCGA breast adenocarcinoma). RBPs are classified according to the adjusted p-value of the enrichment of cell cycle genes among correlated genes ($r > 0.5$). **(B)** Expression heatmap showing the correlation between ILF2 expression and a subset of cell cycle mRNAs. **(C)** Schematic representation of NF45 and NF90 proteins, showing NF45 and NF90 DZF domain (domain associated with zinc fingers), NLS (nuclear localization signal), dsRBM (double-stranded RNA binding motif), Tri-RG motif (arginine–glycine-rich). **(D)** Endogenous and exogenous (E) immunoprecipitation (IP) of NF90 and NF45 in HEK293 cells. **(F)** HEK293 cells were transfected with Myc-tagged NF45 (WT, or D308R/R319E) and endogenous NF90 was immunoprecipitated using an anti-NF90 antibody. **(G)** BRET titration curves were performed in HEK293T cells transfected with a constant amount of NF90-RlucII or NF45-RlucII and increasing amounts of NF45 (WT, D308R/R319D)-GFP10. BRET400-GFP10 between NF90-RlucII or NF45-RlucII and NF45 (WT, D308R/R319D)-GFP10 was measured after the addition of coelenterazine-400a. **(H)** HEK293 cells were depleted for NF45 or NF90 using two different shRNAs, and NF45/NF90 abundance was analyzed by immunoblotting (protein) and qPCR (mRNA). **(I)** HEK293 cells were depleted for endogenous NF90 using a shRNA targeting its 3'UTR, and cells were transfected with HA-tagged NF90 (WT or E312R/R323D). Abundance of NF45 and NF90 was evaluated by immunoblotting.

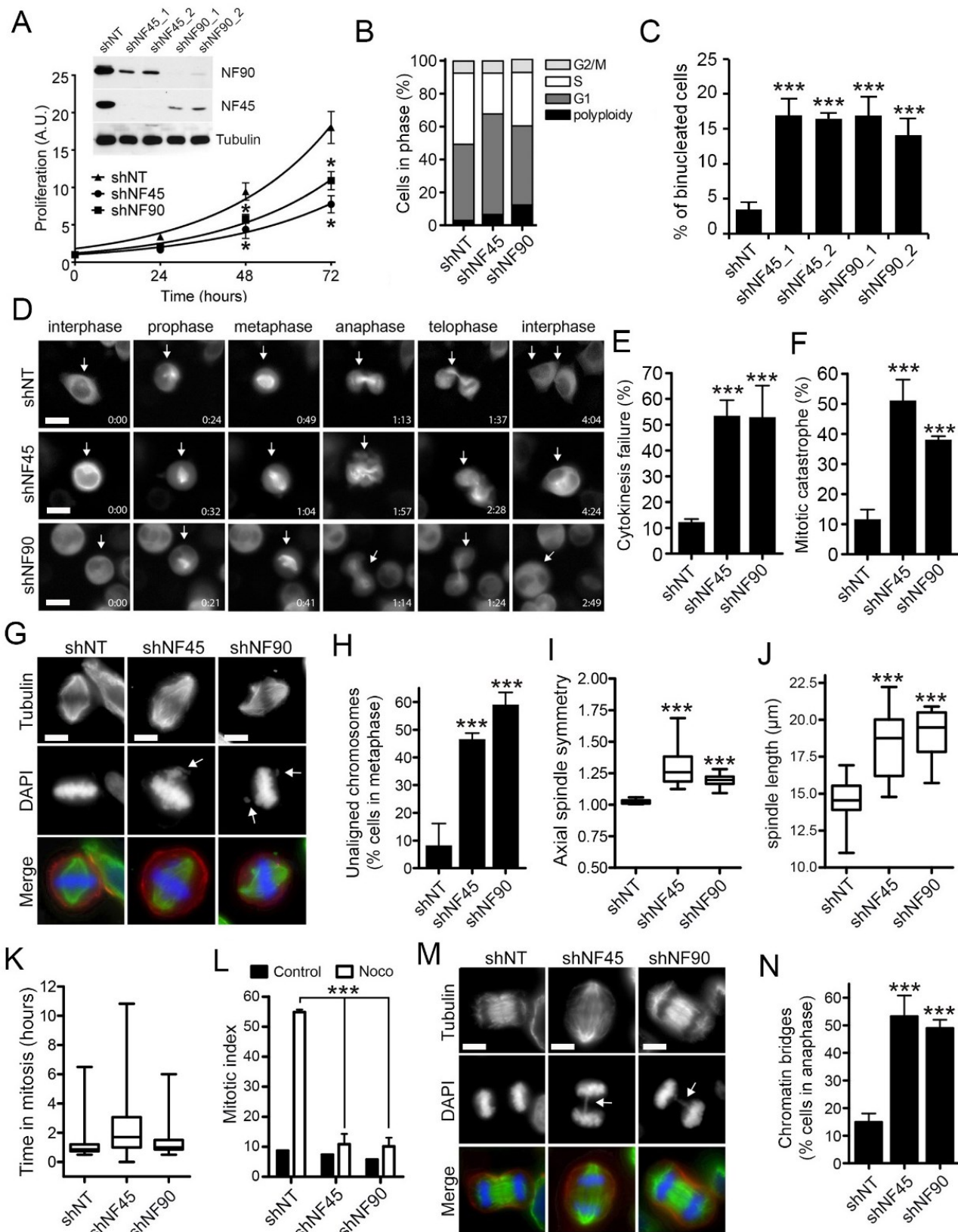


Figure 23. The NF45-NF90 complex is required for mitotic progression and cytokinesis.

(A) Proliferation assay using WST-1 of HeLa cells with stable depletion of NF45 or NF90 over a 72h time course. Data is expressed as the mean fold-change in optical density compared to the 0h time point (A.U., arbitrary units). **(B)** FACS analysis of DNA content of HeLa cells stably expressing shNT, shNF45 or shNF90. Data analysis and quantification of cells at different phase of the cell cycle was done using Flowjo. **(C)** Quantification of binucleated cells by immunofluorescence in response to NF45 or NF90 depletion. A minimum of 1500 cells per condition was quantified. *** $p < 0.001$ (two-tailed t-test). **(D)** HeLa cells stably expressing Tubulin-GFP (grey) and shNT, shNF45 or shNF90 were grown on glass-bottom culture dishes, followed by time-lapse imaging during 16 h. Arrows indicate cells undergoing mitosis. Scale bars 25 μm . **(E)** Quantification of cytokinesis failure in HeLa Tubulin-GFP using by time-lapse imaging. At least 100 cells per condition were analyzed. *** $p < 0.001$ (two-tailed t-test). **(F)** HeLa cells stably expressing shNT, shNF45 or shNF90 tubulin-GFP were followed by time-lapse imaging during 16 h, and cells undergoing mitotic catastrophe were quantified. At least 50 cells per conditions were quantified. *** $p < 0.001$ (two-tailed t-test). **(G)** HeLa cells subjected to NF45 or NF90 depletion were stained for Tubulin (green), F-Actin (red) and DNA (blue) and imaged at 60x magnification. Arrows indicate unaligned chromosomes at metaphase. Scale bar 10 μm . **(H)** Quantification of cells having unaligned chromosomes in metaphase. At least 50 cells per condition were analyzed. *** $p < 0.001$ (two-tailed t-test). **(I)** Quantification of metaphase spindle axial symmetry towards the metaphase plate. At least 25 cells per condition were analyzed. *** $P < 0.0001$ (one-way ANOVA). **(J)** Quantification of metaphase spindle length. At least 25 cells per condition were analyzed. *** $p < 0.0001$ (one-way ANOVA). **(K)** HeLa tubulin-GFP cells were depleted for NF45 or NF90. Time in mitosis was determined using live-cell imaging by tracking cells in mitosis. At least 50 mitotic cells per condition were analyzed. **(L)** HeLa cells depleted for NF45 or NF90 were treated with nocodazole for 16 h, then cells were stained for pH3-Ser10 and DNA (propidium iodide) and analyzed by FACS. The quantification shows the fraction of mitotic cells for each condition. *** $p < 0.001$ (two-tailed t-test). **(M)** HeLa cells were stained for Tubulin (green), F-Actin (Red) and DNA (blue), and cells in anaphase were imaged at 60x magnification. Arrows indicate chromatin bridges. Scale bar 10 μm . **(N)**

Quantification of chromatin bridges at anaphase. A minimum of 25 cells per condition were analyzed.

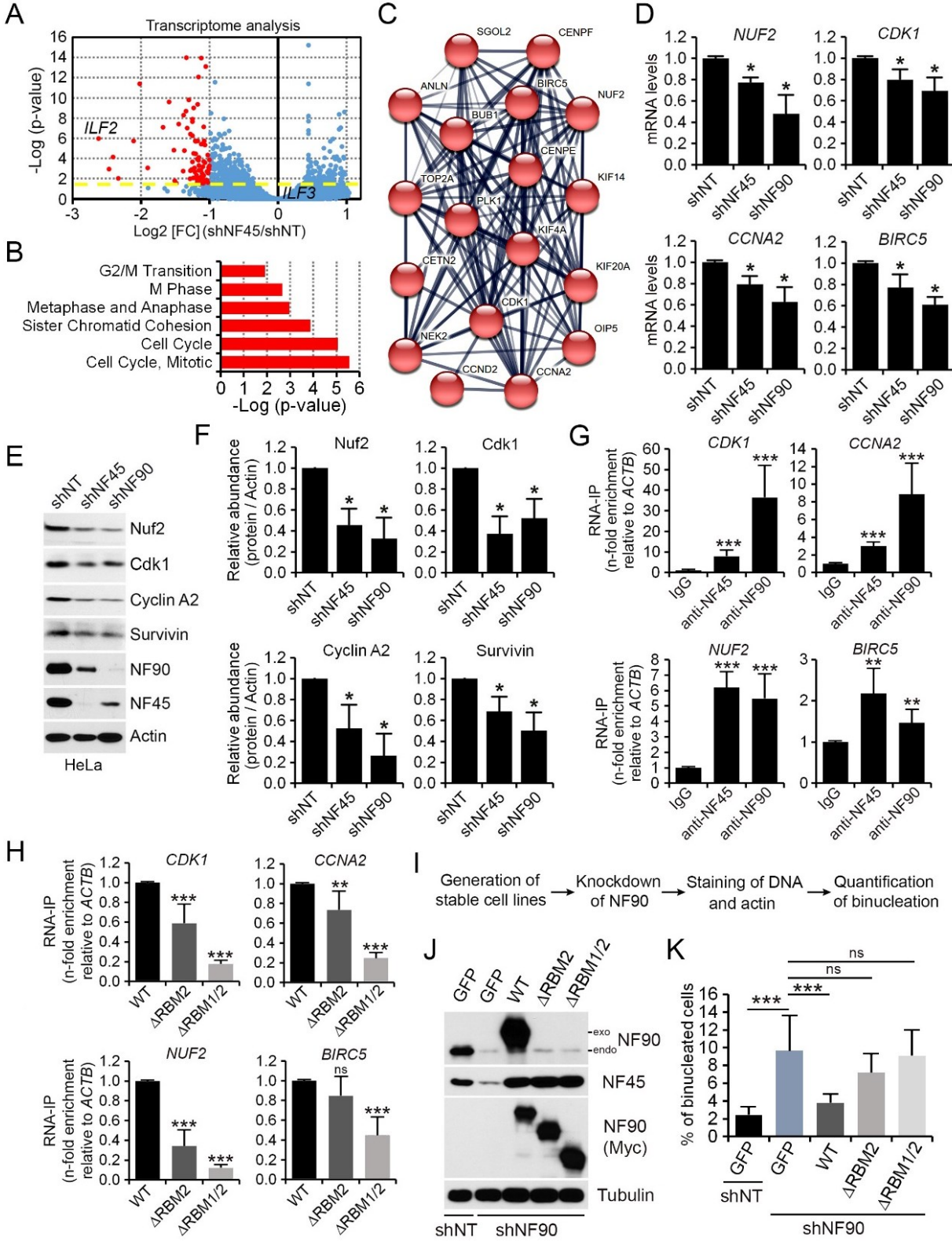
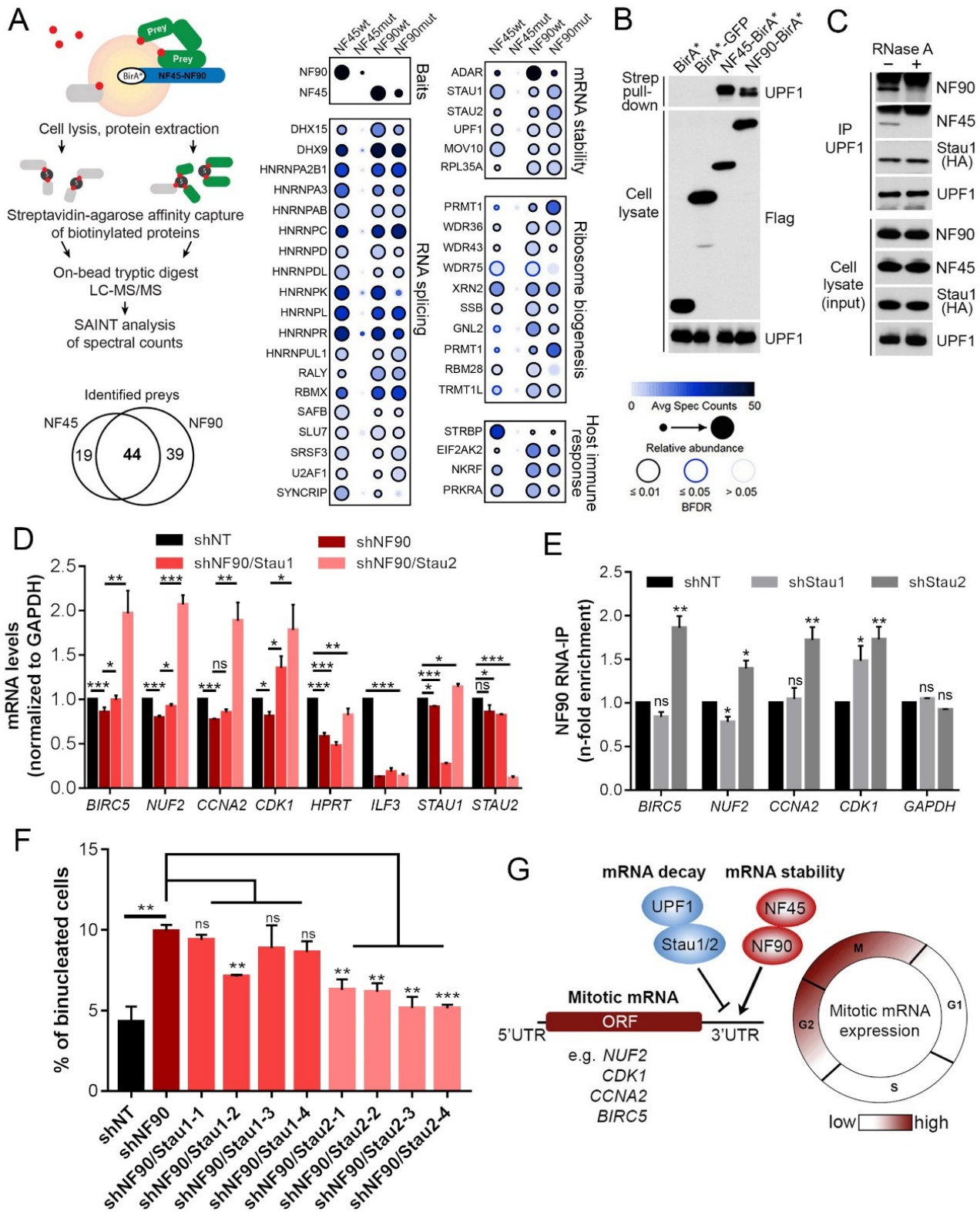


Figure 24. The NF45-NF90 complex regulates the expression of a cluster of mitotic genes.

(A) Transcriptome analysis of HepG2 cells depleted for NF45/ILF2. Red dots indicate genes that are significantly depleted by more than 2-fold-change compared to control. **(B)** Classification of mRNAs significantly decreased in HepG2 cells depleted for NF45, based on Reactome GO term enrichments associated with adjusted p-values. **(C)** Network representation of mitotic genes significantly decreased (>2 fold-change) in response to NF45 depletion. Network edges represent functional interaction between these genes. **(D)** HeLa cells were depleted for NF45 or NF90 using shRNAs, and NUF2, CDK1, BIRC5 and CCNA2 mRNAs were quantified by qPCR. * $p < 0.05$ (two-tailed t-test). **(E, F)** HeLa cells were depleted for NF45 or NF90 using shRNAs. Abundance of NUF2, CDK1, Survivin and Cyclin A2 were assessed by immunoblotting and quantified over a minimum of 3 independent experiments. * $p < 0.05$ (two-tailed t-test). **(G)** Relative abundance of NUF2, CDK1, CCNA2 and BIRC5 mRNAs immunoprecipitated with control IgG, anti-NF45 or anti-NF90 antibodies, as measured by qPCR and normalized to the level of ACTB. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ (two-tailed t-test). **(H)** HEK293 cells were transfected with Myc-tagged NF90 (WT, Δ RMB2, Δ RBM1/2). The relative abundance of NUF2, CDK1, CCNA2 and BIRC5 mRNAs immunoprecipitated with the anti-Myc antibody was then measured by qPCR. **(I)** Schematic representation of the knockdown-rescue pipeline. **(J, K)** HeLa cells were transduced with GFP or Myc-tagged NF90 (WT, Δ RMB2, Δ RBM1/2), and endogenous NF90 was depleted using a shRNA targeting its 3'UTR. Quantification of binucleated cells was done by analyzing at least 1500 cells per conditions. NF45 and NF90 abundance was assessed by immunoblotting. *** $p < 0.001$ (two-tailed t-test)



(A) Schematic representation of the BioID pipeline for analyzing the proximity interactome of NF45 and NF90. Venn diagram showing common and respective preys identified for NF45 and NF90. Dot plot of proximity interactors for NF45 and NF90. All high-confidence proximity interactors are listed and organized according to biological functions. **(B)** HEK293 stably expressing inducible BirA*, BirA*-GFP, NF45-BirA* and NF90-BirA* were induced with tetracycline and labeled with biotin during 24h. Biotinylated proteins were precipitated using streptavidin beads, and UPF1 was detected using anti-UPF1 antibodies. **(C)** HEK293 cells transfected with HA-tagged Stau1 were immunoprecipitated with endogenous UPF1 using anti-UPF1 antibody. Immunoprecipitates were treated or not with RNase A (10 µg/ml). **(D)** qPCR of HeLa cells stably expressing shNT, shNF90, and combination of shNF90/shStau1 or shNF90/shStau2. *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001 (two-tailed t-test). **(E)** Relative abundance of NUF2, CDK1, CCNA2 and BIRC5 mRNAs immunoprecipitated with the anti-NF90 antibody in HEK293 cells stably expressing shNT, shStau1 or shStau2. *p<0.05 **p<0.01 (two-tailed t-test). **(F)** Quantification of binucleated cells expressing shNT, shNF90, and shNF90 combined with 4 different shRNAs targeting Stau1 or Stau2 by immunofluorescence. At least 1000 cells per condition were quantified. *p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001 (two-tailed t-test). **(G)** Schematic model of the competition between the NF45-NF90 complex and Stau1/2-UPF1 complex for the regulation of mitotic fitness.

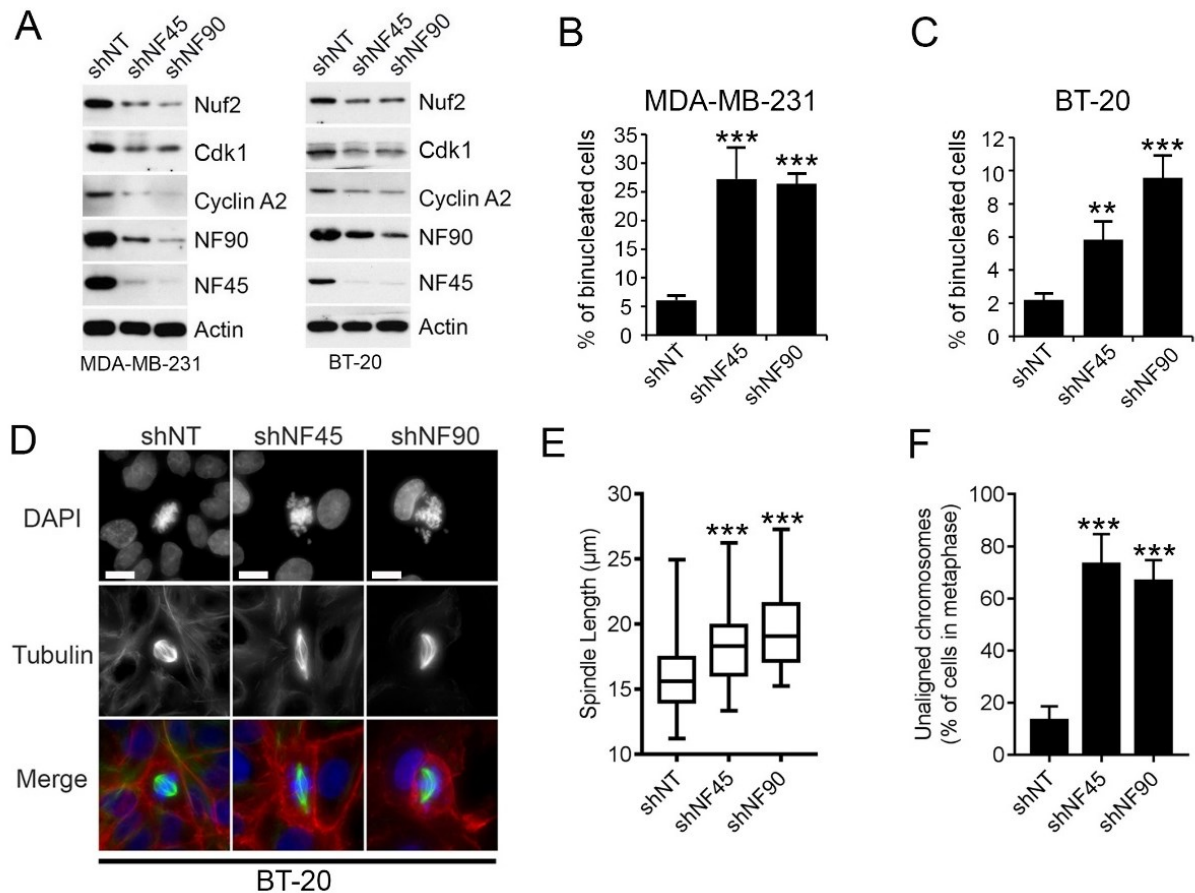
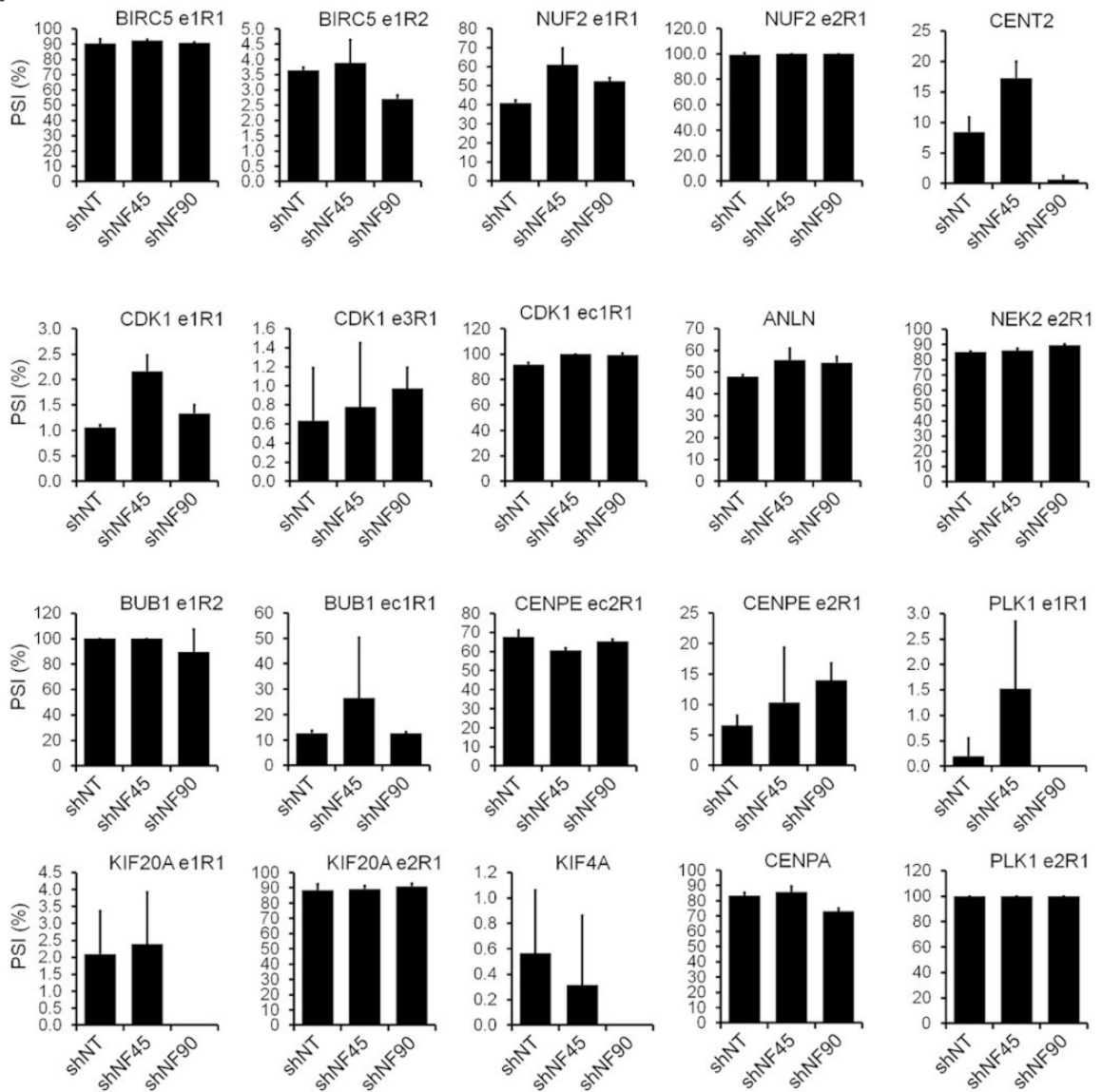


Figure 26. Impact of NF45 or NF90 depletion in breast cancer cell lines.

(A) Triple negative breast cancer cell lines BT20 and MDA-MB-231 cells were depleted for NF45 or NF90 using shRNAs. Abundance of NUF2, CDK1, CCNA2 and Survivin were assessed by immunoblotting. (B, C) Quantification of binucleated cells by immunofluorescence in response to NF45 or NF90 depletion. A minimum of 1500 cells per condition was quantified. *** $p < 0.001$ (two-tailed t -test) (D) BT-20 cells subjected to NF45 or NF90 depletion were stained for Tubulin (green), F-Actin (red) and DNA (blue) and imaged at 60x magnification. Scale bar 25 μm (E) Quantification of BT-20 cells metaphase spindle length. At least 25 cells per condition were analyzed. *** $p < 0.0001$ (one-way ANOVA). (F) Quantification of BT-20 cells having unaligned chromosomes in metaphase. At least 50 cells per condition were analyzed. *** $p < 0.001$ (two-tailed t -test). Related to Figure 3.

A



B

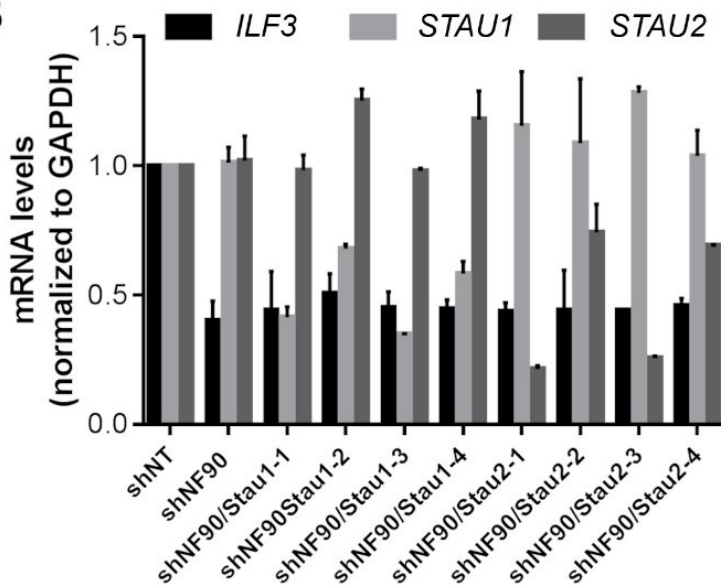


Figure 27. Analysis of mitotic gene alternative splicing in response to NF45 and NF90 depletion.

(A) HeLa cells stably expressing shNT, shNF45 or shNF90 were extracted for RNA and Alternative Splicing PCR was performed to quantify the different splicing isoforms of mitotic genes. **(B)** qPCR of HeLa cells stably expressing shNT, shNF90, and combinations of shNF90/shStau1 or shNF90/shStau2 using 4 different shRNAs targeting Stau1 or Stau2. *ILF3*, *STAU1* and *STAU2* mRNA levels correspond to the conditions found in the functional assay perform in Figure 4F. Related to Figure 4

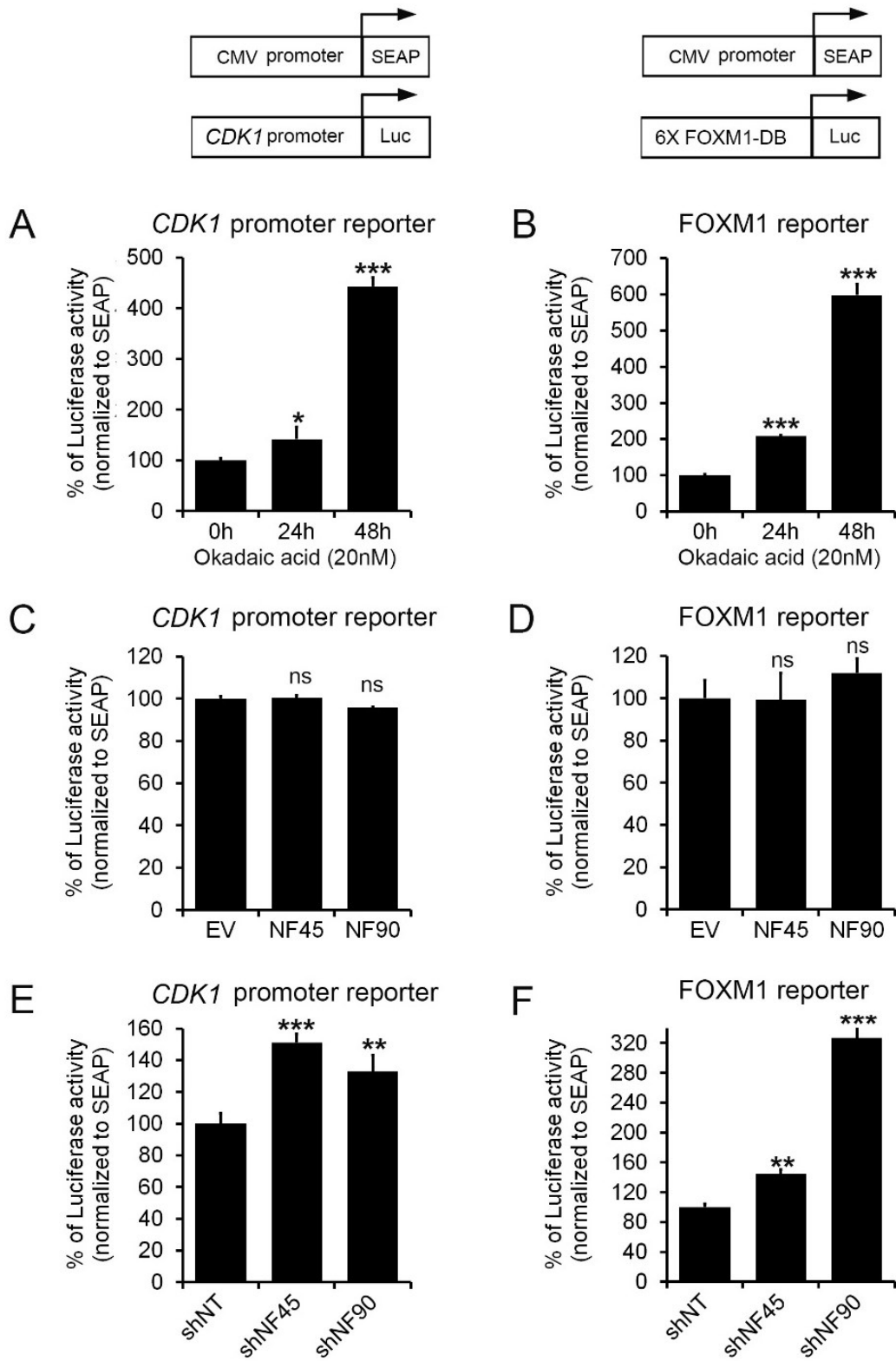


Figure 28. Transcriptional regulation of mitotic genes in cells with loss- and gain-of-function in NF45 and NF90.

(A, B) HEK293 cells were transfected with plasmids encoding luciferase under the control of the *CDK1* promoter or 6x FoxM1 DNA-binding motifs, and treated with 20 nM Okadaic acid for 24h or 48h. * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$ (two-tailed *t*-test). **(C, D)** HEK293 cells were co-transfected with NF45 or NF90 overexpressing vectors and plasmids encoding luciferase under the control of the *CDK1* promoter or 6x FoxM1 DNA-binding motifs. **(E, F)** HEK293 cells stably expressing shRNA targeting NF45 or NF90 were transfected with plasmids encoding luciferase under the control of the *CDK1* promoter or 6x FoxM1 DNA-binding motifs. ** $p < 0.05$ *** $p < 0.001$ (two-tailed *t*-test).

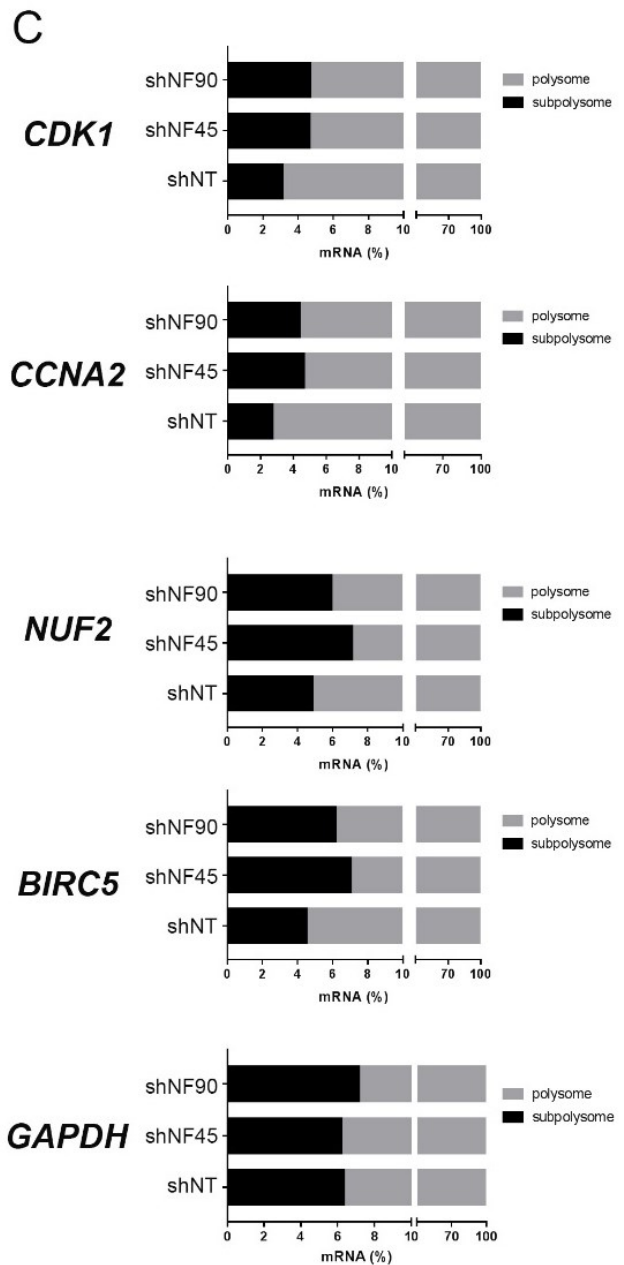
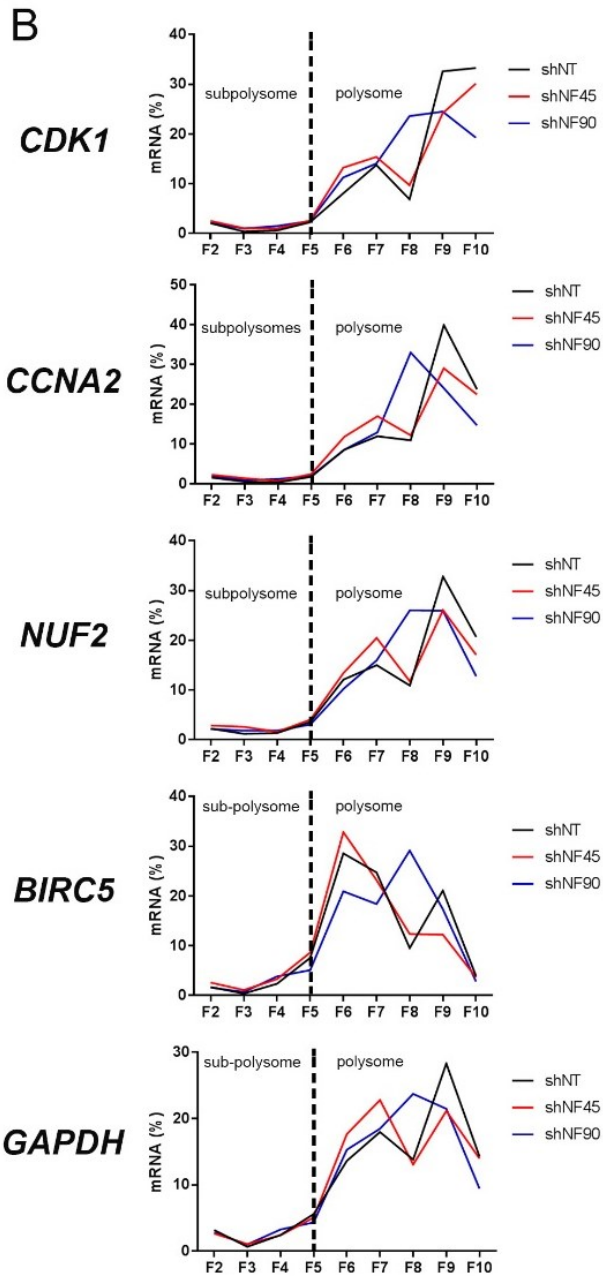
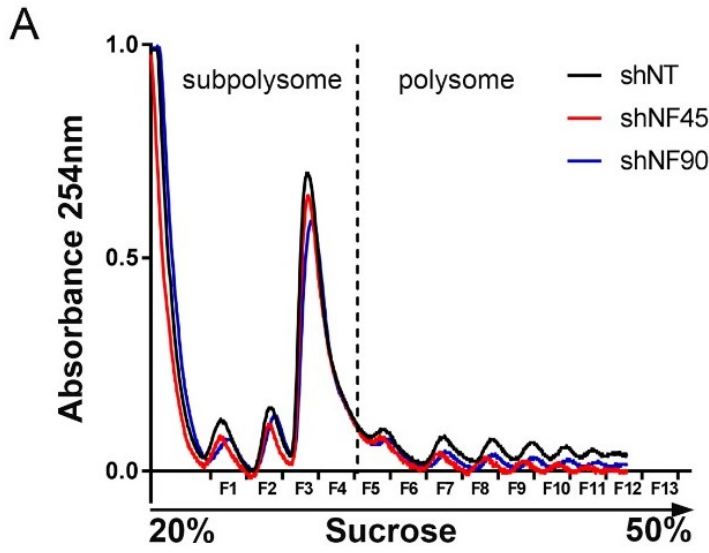


Figure 29. Translational regulation of mitotic genes in response to NF45 or NF90 depletion.

(A) Ribosome profiling of HeLa cells stably expressing shRNAs targeting NF45 or NF90. **(B)** Relative distribution of *CDK1*, *CCNA2*, *NUF2*, *BIRC5* and *GAPDH* mRNA in the different ribosomal fractions. **(C)** Normalized distribution of *CDK1*, *CCNA2*, *NUF2*, *BIRC5* and *GAPDH* mRNAs in the subpolysome and polysome fractions. Related to Figure 4

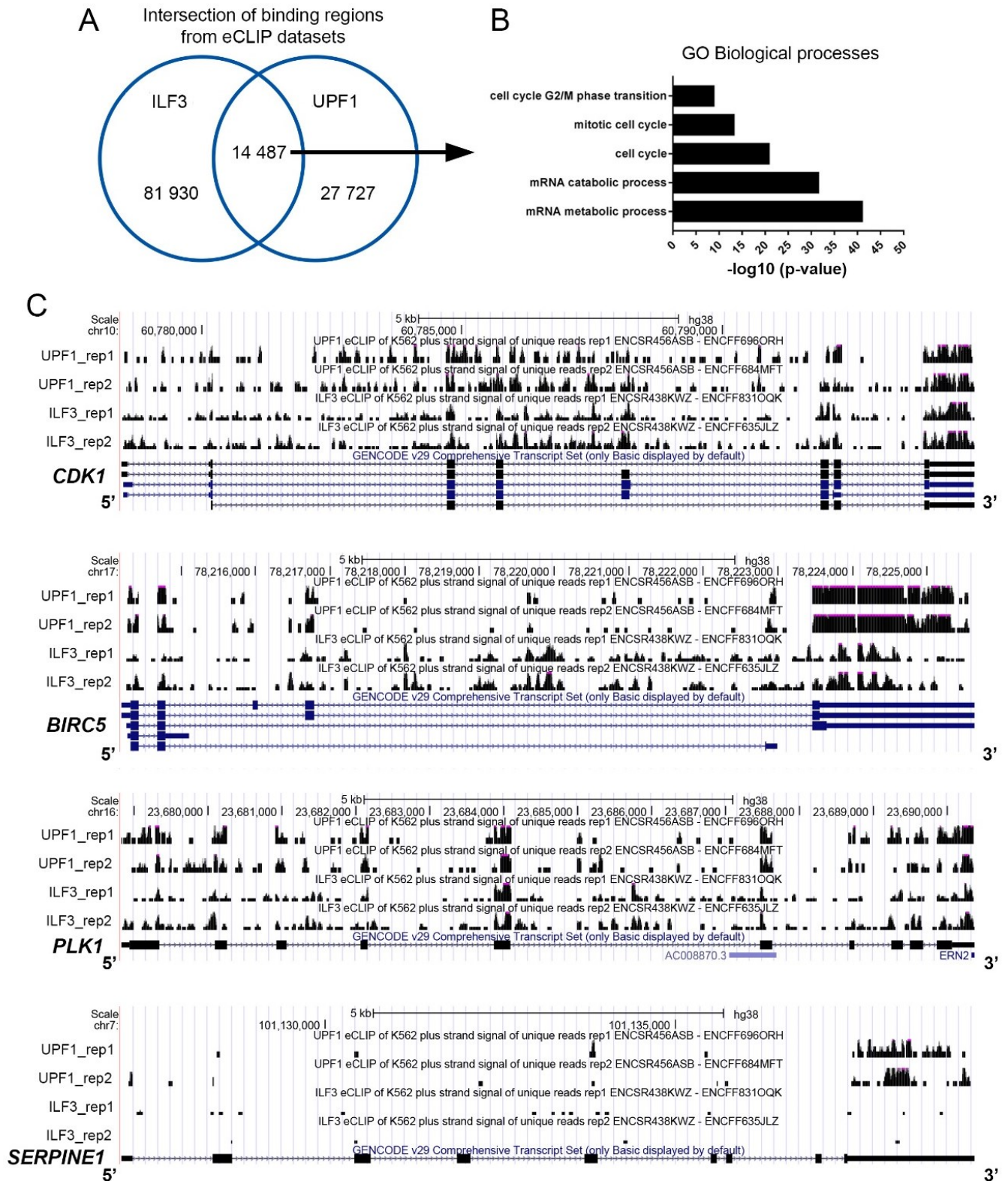


Figure 30. Intersection of NF90 and UPF1 binding regions on target mRNAs.

(A) Overlapping binding sites between ILF3 (GEO: GSE91760) and UPF1 (GEO: GSE91776) eCLIP datasets from K562 cells obtained from the ENCODE database (www.encodeproject.org). **(B)** Gene Ontology analysis of overlapping peaks between ILF3 and UPF1 eCLIP datasets. **(C)** Representation of ILF3 and UPF1 eCLIP peaks on CDK1, BIRC5, PLK1 and SERPINE1 genes using the UCSC genome browser. Coding exons are showed by blocks connected by lines representing introns. 5' and 3'UTR are represented as thinner blocks on the leading and trailing ends of the genes. Related to Figure 4

3 Chapitre 3: CDK1 promotes NF90 phosphorylation at the G2/M phase of the cell cycle

Sami Nourreddine^{1,3}, Maya Nikolova^{1,3}, Geneviève Lavoie¹, Philippe P. Roux^{1,2}.

¹Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada.

²Department of Pathology and Cell Biology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada.

³Department of Molecular Biology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada.

3.1 Mise en contexte

Dans le chapitre 2, nous avons identifié le complexe NF45-NF90 comme un nouveau régulateur de l'expression périodique des gènes du cycle cellulaire. La plupart des effecteurs connus qui contrôlent l'expression des gènes du cycle cellulaire, tels que les facteurs de transcriptions FOXM1 ou E2F, sont eux-mêmes très finement régulés, le plus souvent par des modifications post-traductionnelles. Ainsi, nous avons lancé un projet pour déterminer si NF45 et NF90 sont régulés ou modifiés à travers le cycle cellulaire.

Premièrement nous avons mesuré les niveaux protéiques et de messagers de NF45 et NF90 dans des cellules synchronisées en phase G1/S puis relâchée jusqu'en phase G2/M. Tandis que l'expression de NF45 et NF90 ne varient pas à travers le cycle cellulaire, nous avons identifié une phosphorylation sur NF90 durant la phase G2/M provoquant un retard de migration de la protéine sur gel. Dans des cellules en phase G2/M, cette phosphorylation est contrôlée par la kinase CDK1 et la phosphatase PP2A. De plus, nous avons trouvé que CDK1 phosphoryle directement NF90 sur sa Thr368, qui est responsable du retard de migration sur gel de NF90. Enfin l'activation de CDK1 provoque l'export cytoplasmique de NF90 et augmente la capacité de NF90 à lier l'ARNm de *CDK1*, suggérant une modulation des fonctions moléculaires de NF90.

Ainsi, dans cette étude nous avons découvert NF90 comme un nouveau substrat de CDK1 qui affecterait la localisation cellulaire de NF90 ainsi que ses fonctions moléculaires. Cette régulation pourrait être impliqué dans des mécanismes de rétrocontrôles positifs menant à l'activation de CDK1 à l'entrée de la mitose

3.2 Abstract

Cell cycle progression is regulated by cyclin-CDK complexes, which promote transcriptional programs specific to each phase. Post-transcriptional mechanisms also appear to regulate cell cycle progression, as was shown for the NF45-NF90 RNA-binding complex and its role at the G2/M phase of the cell cycle. While the NF45-NF90 complex controls the stability of several mitotic mRNAs, the mechanisms involved in its regulation remain elusive. Here we show that NF90 becomes phosphorylated on Ser/Thr residues when cells enter the G2/M phase of the cell cycle. Using several pharmacological inhibitors, we find that CDK1 is the predominant protein kinase regulating NF90 phosphorylation. Using prediction softwares and site-directed mutagenesis, we found that CDK1 directly phosphorylates NF90 on Thr368. CDK1 activation induced by mitotic entry or the expression of a constitutively-activated mutant (CDK1^{AF}; T14A/Y15F) was found to promote NF90 cytoplasmic export. Concomitant to this, we found that NF90 binds more strongly to the CDK1 mRNA, suggesting that its phosphorylation state regulates mRNA binding. Altogether, our results show that NF90 is phosphorylated by CDK1 at the G2/M phase of the cell cycle, which may promote CDK1 expression in a positive feedback loop.

3.3 Introduction

Nuclear Factor-90 (NF90) is an RNA-binding protein that forms a functional heterodimer with Nuclear Factor-45 (NF45) that regulates gene expression at multiple levels. Indeed, the NF45-NF90 complex has been involved in several molecular processes including, splicing (Marchesini et al. 2017), noncoding-RNA processing (Masuda et al. 2013), mRNA stability (Song et al. 2017), and translation (Watson, Bellora, and Macias 2020) through binding to double-stranded RNA (dsRNA) structures. Early studies identified NF45 and NF90 as key regulators of the immune response by controlling *IL-2* transcription and mRNA stability in T cells (Shi et al. 2007; Shim et al. 2002). Additionally, NF90 cooperates with the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) to regulate the host immune response to viral infections (Wen et al. 2014). More recently, NF45 and NF90 have been extensively studied in cancer, as their expression was found to be associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma (Jiang et al. 2015), lung cancer (Xu et al. 2020), bladder cancer (Zhuang et al. 2017), cervical cancer (Zhang et al. 2018) and breast cancer (Jin et al. 2018). In cancer cells, NF45 and NF90 expression appears to be correlated with cell proliferation, as the complex was shown to regulate the expression of many cell cycle genes. Furthermore, the NF45-NF90 complex was shown to promote the expression of many mitotic genes, including *CDK1*, *CCNA2*, *BIRC5* and *NUF2*, through binding of their 3'UTR mRNA region (Nourreddine et al. 2020).

Cell cycle progression is mainly orchestrated by cyclin-CDK complexes, which phosphorylate hundreds of substrates to guide cell cycle-dependent gene expression (Orlando et al. 2008). For example, the FOXM1 transcription factor drives mitotic gene expression after its phosphorylation by cyclin A-CDK1 at the G2 phase (Laoukili, Alvarez, et al. 2008). Similarly, during G1 phase, the cyclin D-CDK4/6 complex phosphorylates Rb (Retinoblastome-associated protein) and thereby releases activated E2F transcription factors, which induce expression of S-phase-promoting genes (Harbour et al. 1999). The cell cycle must be precisely coordinated in time to ensure unidirectional progression through cell cycle phases and successful cell division. Therefore, phase specific regulators, like E2F or FOXM1, are

accurately activated and inactivated at specific times in the cell cycle (Marti et al. 1999; Laoukili, Alvarez-Fernandez, et al. 2008). We previously showed that the NF45-NF90 complex is required for mitosis, as it controls the expression of essential mitotic genes, but how this complex is regulated during cell cycle progression remains unknown.

Here, we analyzed NF45 and NF90 expression during the cell cycle and identified a phosphorylation event on NF90 occurring at the G2/M transition. Using pharmacological inhibitors, we found that this post-translational modification is regulated by CDK1 and we determined that CDK1 directly phosphorylates NF90 on Thr368. We also found that CDK1 activation leads to NF90 export from the nucleus to the cytoplasm and correlates with stronger association between NF90 and *CDK1* mRNA. Altogether, our study identified a cell cycle-dependent phosphorylation event on NF90 mediated by CDK1 during the G2/M transition, and this phosphorylation appears to be involved in a CDK1 positive feedback loop that occurs prior mitosis onset.

3.4 Results

NF90 is phosphorylated at the G2/M transition of the cell cycle

We previously identified the NF45-NF90 complex as a major regulator of mitotic gene expression (Nourredine et al. 2020). To assess whether NF45 or NF90 expression could be regulated during the cell cycle, we synchronized HeLa cells at the G1/S transition by double thymidine block (DTB) and harvested cell lysates every 2 hours after DTB release, up to 12 hours. At 8 hours post-DTB, we found that *CCNB1* mRNA level increased by 2-fold, while *CCNE1* mRNA levels decreased by 2-fold, which indicated that cells are well synchronized and started to enter in mitosis around t=8 (Figure 1A). We quantified *ILF2* and *ILF3* mRNA levels by RT-qPCR during this time course and did not find significant changes, suggesting that these genes are not subject to transcriptional regulation during the cell cycle (Figure 1A). We also verified NF45 and NF90 protein levels by western blots, and similarly, we found steady

expression levels throughout the time course (Figure 1B). Interestingly, NF90 displayed an electrophoretic shift at t=10-12 hours, suggesting the presence of a post-translational modification on NF90 occurring at the G2/M phase. To confirm this phenomenon, we synchronized a panel of human cell lines in G2/M using nocodazole, and found similar electrophoretic shift in NF90 compared to asynchronous cells (Figure 1C). To investigate if this post-translational modification could be a phosphorylation event, we performed an *in vitro* phosphatase assay on G2/M-synchronized cell extract. We found that incubation of λ -phosphatase for 30 minutes completely abolished the electrophoretic shift of NF90 (Figure 1D), suggesting that NF90 becomes phosphorylated at G2/M transition.

Regulation of NF90 phosphorylation by CDK1 and PP2A in the G2/M phase of the cell cycle

To identify the potential kinase(s) involved in NF90 phosphorylation, HeLa cells were synchronized in mitosis using nocodazole, and then treated for 10 minutes with pharmacological inhibitors targeting specific mitotic kinases, such as CDK1 (RO-3306), PLK1 (BI-2536), and Aurora B (AZD-1152) prior to cell lysis (Figure 2A). Then, endogenous NF90 was immunoprecipitated (IP) and monitored for potential phosphorylation using the MPM2 antibody, which recognizes proteins that share common mitotic phosphorylation events (phospho-S/TP) (Kuang et al. 1989). Compared to asynchronous cells, NF90 immunoprecipitated from mitotic cells displayed an electrophoretic shift and a strong MPM2 signals (Figure 2B). Interestingly, the CDK1 inhibitor RO-3306, but not PLK1 nor Aurora B inhibitors, strongly abrogated the electrophoretic shift in NF90 and the MPM2 signal (Figure 2B). Moreover, in the same conditions, the MPM2 signal in NF90 was increased when cells were treated with LB-100, a selective PP2A inhibitor (Figure 2C). Taken together, these results indicate that NF90 phosphorylation in G2/M appears to be controlled by the antagonistic actions of CDK1 and PP2A.

CDK1 phosphorylates NF90 on Threonine 368

CDK1 is an important player in cell cycle progression that phosphorylates hundreds of substrates at mitotic entry (Enserink and Kolodner 2010). Based on the known consensus phosphorylation motif of CDK1 (S/TPxK/R) (Songyang et al. 1994) (Figure 3A), we searched the amino acid sequence of NF90 and found 3 potential threonine (T368, T504, T592) and 2 serine (S173, S382) residues that could be targeted by CDK1. All these sites have previously been shown to be phosphorylated in large-scale mass spectrometry studies (Figure 3B). Using the Scansite bioinformatics tool (Obenauer, Cantley, and Yaffe 2003), we ranked these potential phosphorylation sites based on the CDK1 consensus motif (Scansite score) (Figure 3B), and found that T368 and S382 were the highest scoring sites (top 0.25%). In addition, both residues were found to be well-conserved in mammals (Figure 3C). To assess whether the 5 sites identified by Scansite could be phosphorylated in mitosis, we generated individual NF90 mutants by replacing Ser/Thr residues by unphosphorylatable alanine residues. Mutant proteins were then transfected in HEK293 cells, which were synchronized in mitosis using nocodazole treatment. Cells were then lysed and NF90 phosphorylation assayed using the MPM2 antibody (Figure 3D). While we found that NF90-WT, -S173A, -S382A, -T504A and -T592A produced strong MPM2 signal when synchronized in mitosis, no signal could be found associated with the NF90-T368A mutant, suggesting that T368 is the predominant CDK1 phosphorylation site. Furthermore, the NF90-T368A mutant did not display an electrophoretic shift as the one observed with NF90-WT (Figure 3E). To test if CDK1 could directly phosphorylate NF90, we performed an *in vitro* kinase assay with purified NF90-myc (WT and T368A) from asynchronous cell lysates and active recombinant GST-CDK1/CCNB1. While the phospho-signal associated with NF90-WT was strongly increased by GST-CDK1/CCNB1 incubation, we found that the NF90-T368A mutant remained unchanged (Figure 3F). Therefore, our results show that CDK1 directly phosphorylates NF90 on T368, and that this residue is involved in the phosphorylation events observed on NF90 during mitosis.

CDK1 activity correlates with NF90 export to the cytoplasm and enhances its binding to CDK1 mRNA

In resting cells, NF90 is mostly localized in the nucleus, but in response to different stimuli, NF90 accumulates in the cytoplasm (Pei et al. 2008 ; Li et al. 2017). For example, upon T-cell activation, NF90 is phosphorylated by AKT on S647, which promotes NF90 translocation to the cytoplasm in order to stabilize the *IL2* mRNA (Pei et al. 2008). To determine if CDK1-mediated phosphorylation of NF90 at T368 regulates its subcellular localization, we performed subcellular fractionation experiments. As expected, we found that in asynchronous cells, NF90 is mainly localized in the nuclear compartment (Figure 4A). When cells are synchronized in G2/M phase, the phosphorylated form of NF90, corresponding to the shifted band, appears to be predominantly found in the cytoplasmic fraction (Figure 4A). To test whether CDK1 activity regulates the NF90 cytoplasmic enrichment, we transfected an active form of CDK1 (CDK1^{AF}; T14A/Y15F) in HEK293 cells and quantified endogenous NF90 localization in more than 800 individual cells. While we found that NF90 was mainly localized in the nucleus of control cells (>92%), CDK1^{AF} expression appeared to significantly increase the number of cells with cytoplasmic NF90 by 2-fold (% of cells with cytoplasmic NF90 : empty vector: 8% vs CDK1^{AF}:21%) (Figure 4B). These results suggested that CDK1 activity is correlated with NF90 cytoplasmic localization.

Previously, we found that NF90 regulates CDK1 expression through binding to the *CDK1* mRNA (Nourredine et al. 2020). NF90-binding to the *CDK1* mRNA was found to prevent its degradation by Staufen-mediated mRNA decay (SMD), a mechanism that normally occurs in the cytoplasm (Park and Maquat 2013). To determine if the cytoplasmic localization of NF90 correlated with increased *CDK1* mRNA binding, we performed RNA-IP (RIP) of endogenous NF90 followed by RT-qPCR. In asynchronous cells,

relatively to mRNA quantified in the input we pulldown 10.9 % of CDK1 mRNA using NF90 antibody (Figure 4C). In G2/M phase, NF90 RIP enriched by two-fold (24.8 %) the amount of CDK1 mRNA while no change was observed for control mRNA (*Actin*, *GAPDH*) (Figure 4C). Taken together, we found that CDK1 kinase activity, induced either cell synchronization or by

activating mutation, leads to NF90 cytoplasmic export and enhance its mRNA binding towards *CDK1* mRNA.

3.5 Discussion

In this study, we investigated NF45 and NF90 expression upon cell cycle progression and found that their expression was steady at protein and mRNA level. However, we observed phosphorylation on NF90 occurring at G2/M transition (Figure 1). We showed that NF90 phosphorylation is enhanced by PP2A inhibition, and that a selective CDK1 inhibitor abolishes it (Figure 2). We identified 5 potential CDK1 phosphorylation sites (S/TP) in NF90, and found that NF90 is directly phosphorylated by CDK1 on Thr368 (Figure 3). We compared the subcellular localization of NF90 between asynchronous and G2/M synchronized cells, and we observed that phospho-NF90 is predominantly cytoplasmic, as when cells are stimulated with active CDK1 (CDK1^{AF}) (Figure 4). We found that NF90 cytoplasmic translocation is associated with an increased binding to the *CDK1* mRNA, suggesting a positive feedback loop whereby CDK1 activity regulates its own expression through NF90 phosphorylation.

During interphase, CDK1 is inactivated by inhibitory phosphorylation (T14/Y15) and lack of CCNA/B expression. Entry in mitosis requires CDK1 activation by a switch-like process that relies on CCNB1 expression and CDC25 activity, constituting a positive feedback loop for CDK1 activation (Izumi and Maller 1993; Porter and Donoghue 2003). Furthermore, CDK1 expression is also modulated throughout the cell cycle and peaks in G2 phase (Santos, Wernersson, and Jensen 2015). We previously showed that NF90 controls CDK1 expression by binding its mRNA and preventing mRNA decay via SMD (Nourreddine et al. 2020). Here we found that phospho-NF90 is significantly more associated to the *CDK1* mRNA than NF90 purified from asynchronous cells (Figure 4). Therefore, our results suggest that CDK1 phosphorylation on NF90 increases its binding to the *CDK1* mRNA and correlates with higher

CDK1 expression. This mechanism suggests that NF90 is involved in a positive feedback loop that promotes CDK1 activation at mitotic onset.

Our results show that CDK1 phosphorylates NF90 on Thr368 when cells are synchronized in G2/M phase. Interestingly, T368 is adjacent to a Nuclear Localization Signal (NLS), which could be involved in NF90 cytoplasmic accumulation when CDK1 is activated (Figure 3). We have determined the subcellular distribution of NF90-WT, -T368A, -T368D in synchronized cells and found no difference (Figure S1), suggesting that T368 phosphorylation is not sufficient to induce NF90 cytoplasmic translocation. However, T368 unphosphorylatable mutant (T368A) prevents NF90 electrophoretic shift observed by western blot in G2/M cells (Figure 3), suggesting that T368 could be a CDK1-dependent priming site for other phosphorylation events. Even though we found that T368 is responsible for the MPM2 phospho-signal in NF90, we cannot exclude that NF90 phosphorylation by other active mitotic kinases, such as Aurora A/B or PLK, are involved. When cells progress from G2-phase to mitosis, several mitotic regulators become activated by sequential phosphorylation that involve multiple kinases. For example, the G2/M specific transcription factor FOXM1 is activated by a primary phosphorylation on T596 by cyclin B-CDK1, which subsequently recruits PLK1 that phosphorylates FOXM1 on S715 and S724 (Chen et al. 2009). Such mechanism could take place for NF90 phosphorylation, which would be interesting to determine using non-biased approaches, such as mass spectrometry.

3.6 Acknowledgments

We acknowledge Dr. Yaffe for developing the Scansite webtool that was used to identify CDK1-dependent phosphorylation sites on NF90. This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research (MOP-142374 and PJT-152995 to P.P.R.), and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (P.P.R.). P.P.R. is a scholar of the Fonds de la recherche du Québec - Santé (FRQS).

3.7 Author contributions

Sami Nourreddine designed all experiments and wrote the initial draft of the manuscript. Maya Nikolova performed nuclear-cytoplasmic fractionation, as well as *in vitro* phosphatase assays. Geneviève Lavoie performed RNA immunoprecipitations. Philippe P. Roux participated in study design, drafted and finalized the manuscript with Sami Nourreddine.

3.8 Materials and Methods

Cell lines. HeLa, MDA-MB-231 and HEK293 cells were maintained at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco) with 4.5 g/liter glucose supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. BT-20 cells were maintained at 37°C in Alpha modified Eagle's Medium (Wisent) with 10% FBS and antibiotics. MCF10A cells were maintained at 37°C in DMEM-F12 (Wisent) supplemented with 5% horse serum, EGF, Hydrocortisone, insulin and antibiotics.

Cell cycle synchronizations. HeLa cells were synchronized in mitosis with a double thymidine block followed by nocodazole (Sigma-Aldrich) treatment for 18 h. Twenty-four hours after being seeded, cells were exposed to 2 mM thymidine (Sigma Aldrich) for 16 h. Cells were then released for 6 h followed by a second thymidine block for a further 16 h, then HeLa cell were incubated overnight with nocodazole at 1.5 µM.

DNA constructs. The original plasmids encoding human NF45, NF90 (pCDNA3-NF45 and pCDNA3-NF90) and were respectively obtained from Dr. Mathews (New Jersey Medical School, NJ, USA). These DNA constructs were used as template for generating 6Myc-tagged NF90 WT, NF90 S173A, NF90 T368A, NF90 S382A, NF90 T504A, NF90 T592A in the pcDNA3 backbone. We purchased the CDK1 T14A/Y15F (pcDNA3-cdc2-AF) from Addgene (Watertown, MA, USA).

Transfections. HEK293 cells were transfected by calcium phosphate precipitation as previously described (Roux et al. 2004).

Immunoprecipitations and Immunoblotting. Cell lysates were prepared as previously described (Roux et al. 2004). Briefly, cells were washed three times with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in BLB (10 mM K₃PO₄, 1 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM MgCl₂, 50 mM β-glycerophosphate, 0.5% Nonidet P-40, 0.1% Brij 35, 0.1% deoxycholic acid, 1 mM sodium orthovanadate [Na₃VO₄], 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and a cOmplete protease inhibitor cocktail tablet (Roche). For immunoprecipitations, cell lysates were incubated with the indicated antibodies for 2 h, followed by 1 h of incubation with protein A–Sepharose CL-4B beads (GE Healthcare). Immunoprecipitates were washed three times in lysis buffer, and beads were eluted and boiled in 2× reducing sample buffer (5× buffer is 60 mM Tris-HCl [pH 6.8], 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, and 0.1% bromophenol blue). Eluates and total cell lysates were subjected to 10 to 12% SDS-PAGE, and resolved proteins were transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes for immunoblotting. The data presented are representative of results from at least three independent experiments.

In vitro Phosphatase assay. Asynchronous and synchronized HeLa cells were lysed in BLB lysis buffer. Cell lysates were incubated for 30 minutes at 30°C with λ-PPase (New England BioLabs) at 8 000 units/ml in a 50 μL final volume. Then samples were diluted in Laemmli buffer and protein levels were assessed by Western blots.

In vitro Kinase assay. For CDK1 kinase assay, recombinant activated GST CDK1-CCNB1 purchased from SignalChem (Richmond, BC) was used with purified 6myc tagged NF90 as substrate (WT and T368A) from HEK293 expressing cells, and under linear assay conditions. Assays were performed for 30 min at 30°C in kinase buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM MgCl₂, 5 mM β-glycerophosphate, and supplemented with 0.5 μM ATP). Then samples were diluted in Laemmli buffer and protein levels were assessed by Western blots. Phosphorylation activity was measured by phospho-specific antibody MPM2 (Millipore-Sigma).

Immunofluorescence Microscopy. For immunofluorescence analyses, 2.5×10^5 HEK293 cells were seeded in 24-well plates containing coverslips. 48h post-transfection (CDK1^{AF} and NF90-6myc), cells were fixed in 3.7% formaldehyde for 10 min. Cells were washed twice in PBS, permeabilized for 5 min in PBS containing 0.3% Triton X-100 and blocked with PBS containing 1% bovine serum albumin for 1h. Cells were incubated for 1 h with anti-Myc antibody, and then incubated with anti-mouse Alexa488 (Invitrogen) for 30 min. Cells were stained with DAPI Vectashield (VectorLabs). Images were acquired on a Zeiss LSM700.

Nuclear/cytoplasmic fractionation. HeLa cells were lysed with Fractionation lysis buffer (100 nM PMSF, 100 nM Sodium orthovanadate, 1 mM DTT, 0.1% v/v Triton X-100). Total lysate was centrifuged at 1 300 g for 5 minutes at 4°C. The supernatant was then collected in a new tube and centrifuged at 14 000 g for 5 minutes at 4°C, this supernatant corresponds to the cytoplasmic fraction. The pellet from the first centrifugation was resuspended in Fractionation lysis buffer and then centrifuged at 1 300 g for 5 minutes at 4°C. Supernatant was discarded and the pellet kept as the nuclear fraction. Protein quantification was performed on the cytoplasmic fraction by Bradford assay. Nuclear and cytoplasmic fraction were then resuspended in Laemmli buffer and protein levels were assessed by western blotting.

RNA Extraction and Quantitative Real-Time PCR. Total RNA from cells was extracted by using the RNeasy minikit (Qiagen). Total RNA was reverse transcribed by using a cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Gene expression levels of the endogenous controls glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and beta-actin (ACTB) were determined by using pre-validated TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems). Expression levels of queried and control genes were determined by using assays designed with the Universal Probe Library (UPL) from Roche. PCRs were performed on an ABI Real Time 7900HT cycler and analyzed with SDS 2.2 software. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed with TaqMan gene expression master mix (Applied Biosystems), and all samples were tested in duplicate.

mRNA levels of queried genes were normalized to the averaged levels of both GAPDH and ACTB.

RNA-Immunoprecipitation (RIP). Cells were washed with ice-cold PBS and lysed in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl at pH 7.4, 300 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.05% NP-40, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 200 U/mL RNase Out, 100 µg/mL yeast tRNA (Sigma), cComplete protease inhibitors. For immunoprecipitations, cell lysates were precleared with protein A-Sepharose beads for 30 min and then incubated with the indicated antibody for 2 h, followed by 1 h of incubation with protein A-Sepharose beads. Immunoprecipitates were washed six times with RIP buffer and divided for immunoblotting and RNA extraction. RNA was eluted twice with elution buffer (PK; 50 mM Tris-HCl at pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% SDS, 5 mM DTT, 400 U/mL RNase Out, 0.25 µg/mL yeast) during 15 min at 65°C and digested with 4 mg/mL proteinase K (Roche) for 40 min at 37°C. RNA was then extracted with phenol-chloroform.

Reagents and Antibodies. Antibodies used for protein detection by western blot or immunofluorescence were Anti-NF45 (Bethyl), anti-N90 (Bethyl), anti-CDK1 (Santa Cruz), anti-Tubulin (Sigma-Aldrich), anti-Actin (Sigma-Aldrich), anti-Myc (Sigma-Aldrich), anti-CCNB1 (Cell Signaling), anti-MPM2 (Millipore-Sigma), anti-phospho-H3 Ser10 (Cell Signaling), anti-trimethyl-H3 (Abcam), Nocodazole (Sigma-Aldrich), DAPI vectashield (Vectorlabs). All secondary horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibodies used for immunoblotting were purchased from Chemicon.

3.9 References

- Chen, Y. J., C. Dominguez-Brauer, Z. Wang, J. M. Asara, R. H. Costa, A. L. Tyner, L. F. Lau, and P. Raychaudhuri. 2009. 'A conserved phosphorylation site within the forkhead domain of FoxM1B is required for its activation by cyclin-CDK1', *J Biol Chem*, 284: 30695-707.
- Enserink, J. M., and R. D. Kolodner. 2010. 'An overview of Cdk1-controlled targets and processes', *Cell Div*, 5: 11.
- Harbour, J. W., R. X. Luo, A. Dei Santi, A. A. Postigo, and D. C. Dean. 1999. 'Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1', *Cell*, 98: 859-69.
- Izumi, T., and J. L. Maller. 1993. 'Elimination of cdc2 phosphorylation sites in the cdc25 phosphatase blocks initiation of M-phase', *Mol Biol Cell*, 4: 1337-50.
- Jiang, W., H. Huang, L. Ding, P. Zhu, H. Saiyin, G. Ji, J. Zuo, D. Han, Y. Pan, D. Ding, X. Ma, Y. Zhang, J. Wu, Q. Yi, J. O. Liu, H. Huang, Y. Dang, and L. Yu. 2015. 'Regulation of cell cycle of hepatocellular carcinoma by NF90 through modulation of cyclin E1 mRNA stability', *Oncogene*, 34: 4460-70.
- Jin, Z., L. Xu, L. Zhang, M. Zhao, D. Li, L. Ye, Y. Ma, S. Ren, H. Yu, D. Wang, C. Liang, and B. Chen. 2018. 'Interleukin enhancer binding factor 2 is a prognostic biomarker for breast cancer that also predicts neoadjuvant chemotherapy responses', *Am J Transl Res*, 10: 1677-89.
- Kuang, J., J. Zhao, D. A. Wright, G. F. Saunders, and P. N. Rao. 1989. 'Mitosis-specific monoclonal antibody MPM-2 inhibits *Xenopus* oocyte maturation and depletes maturation-promoting activity', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86: 4982-6.
- Laoukili, J., M. Alvarez-Fernandez, M. Stahl, and R. H. Medema. 2008. 'FoxM1 is degraded at mitotic exit in a Cdh1-dependent manner', *Cell Cycle*, 7: 2720-6.

- Laoukili, J., M. Alvarez, L. A. Meijer, M. Stahl, S. Mohammed, L. Kleij, A. J. Heck, and R. H. Medema. 2008. 'Activation of FoxM1 during G2 requires cyclin A/Cdk-dependent relief of autorepression by the FoxM1 N-terminal domain', *Mol Cell Biol*, 28: 3076-87.
- Marchesini, M., Y. Ogoti, E. Fiorini, A. Aktas Samur, L. Nezi, M. D'Anca, P. Storti, M. K. Samur, I. Ganan-Gomez, M. T. Fulciniti, N. Mistry, S. Jiang, N. Bao, V. Marchica, A. Neri, C. Bueso-Ramos, C. J. Wu, L. Zhang, H. Liang, X. Peng, N. Giuliani, G. Draetta, K. Clise-Dwyer, H. Kantarjian, N. Munshi, R. Orlowski, G. Garcia-Manero, R. A. DePinho, and S. Colla. 2017. 'ILF2 Is a Regulator of RNA Splicing and DNA Damage Response in 1q21-Amplified Multiple Myeloma', *Cancer Cell*, 32: 88-100 e6.
- Marti, A., C. Wirbelauer, M. Scheffner, and W. Krek. 1999. 'Interaction between ubiquitin-protein ligase SCFSKP2 and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation', *Nat Cell Biol*, 1: 14-9.
- Masuda, K., Y. Kuwano, K. Nishida, K. Rokutan, and I. Imoto. 2013. 'NF90 in posttranscriptional gene regulation and microRNA biogenesis', *Int J Mol Sci*, 14: 17111-21.
- Nourredine, S., G. Lavoie, J. Paradis, K. Ben El Kadhi, A. Meant, L. Aubert, B. Grondin, P. Gendron, B. Chabot, M. Bouvier, S. Carreno, and P. P. Roux. 2020. 'NF45 and NF90 Regulate Mitotic Gene Expression by Competing with Staufen-Mediated mRNA Decay', *Cell Rep*, 31: 107660.
- Obenauer, J. C., L. C. Cantley, and M. B. Yaffe. 2003. 'Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs', *Nucleic Acids Res*, 31: 3635-41.
- Orlando, D. A., C. Y. Lin, A. Bernard, J. Y. Wang, J. E. Socolar, E. S. Iversen, A. J. Hartemink, and S. B. Haase. 2008. 'Global control of cell-cycle transcription by coupled CDK and network oscillators', *Nature*, 453: 944-7.

- Park, E., and L. E. Maquat. 2013. 'Staufen-mediated mRNA decay', *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 4: 423-35.
- Pei, Y., P. Zhu, Y. Dang, J. Wu, X. Yang, B. Wan, J. O. Liu, Q. Yi, and L. Yu. 2008. 'Nuclear export of NF90 to stabilize IL-2 mRNA is mediated by AKT-dependent phosphorylation at Ser647 in response to CD28 costimulation', *J Immunol*, 180: 222-9.
- Porter, L. A., and D. J. Donoghue. 2003. 'Cyclin B1 and CDK1: nuclear localization and upstream regulators', *Prog Cell Cycle Res*, 5: 335-47.
- Roux, P. P., B. A. Ballif, R. Anjum, S. P. Gygi, and J. Blenis. 2004. 'Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 13489-94.
- Santos, A., R. Wernersson, and L. J. Jensen. 2015. 'Cyclebase 3.0: a multi-organism database on cell-cycle regulation and phenotypes', *Nucleic Acids Res*, 43: D1140-4.
- Shi, L., W. R. Godfrey, J. Lin, G. Zhao, and P. N. Kao. 2007. 'NF90 regulates inducible IL-2 gene expression in T cells', *J Exp Med*, 204: 971-7.
- Shim, J., H. Lim, R. Yates J, and M. Karin. 2002. 'Nuclear export of NF90 is required for interleukin-2 mRNA stabilization', *Mol Cell*, 10: 1331-44.
- Song, D., H. Huang, J. Wang, Y. Zhao, X. Hu, F. He, L. Yu, and J. Wu. 2017. 'NF90 regulates PARP1 mRNA stability in hepatocellular carcinoma', *Biochem Biophys Res Commun*, 488: 211-17.
- Songyang, Z., S. Blechner, N. Hoagland, M. F. Hoekstra, H. Piwnica-Worms, and L. C. Cantley. 1994. 'Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases', *Curr Biol*, 4: 973-82.
- Watson, S. F., N. Bellora, and S. Macias. 2020. 'ILF3 contributes to the establishment of the antiviral type I interferon program', *Nucleic Acids Res*, 48: 116-29.

- Wen, X., X. Huang, B. W. Mok, Y. Chen, M. Zheng, S. Y. Lau, P. Wang, W. Song, D. Y. Jin, K. Y. Yuen, and H. Chen. 2014. 'NF90 exerts antiviral activity through regulation of PKR phosphorylation and stress granules in infected cells', *J Immunol*, 192: 3753-64.
- Xu, Z., H. Huang, X. Li, C. Ji, Y. Liu, X. Liu, J. Zhu, Z. Wang, H. Zhang, and J. Shi. 2020. 'High expression of interleukin-enhancer binding factor 3 predicts poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma', *Oncol Lett*, 19: 2141-52.
- Zhang, W., Z. Xiong, T. Wei, Q. Li, Y. Tan, L. Ling, and X. Feng. 2018. 'Nuclear factor 90 promotes angiogenesis by regulating HIF-1alpha/VEGF-A expression through the PI3K/Akt signaling pathway in human cervical cancer', *Cell Death Dis*, 9: 276.
- Zhuang, J., L. Shen, L. Yang, X. Huang, Q. Lu, Y. Cui, X. Zheng, X. Zhao, D. Zhang, R. Huang, H. Guo, and J. Yan. 2017. 'TGFbeta1 Promotes Gemcitabine Resistance through Regulating the LncRNA-LET/NF90/miR-145 Signaling Axis in Bladder Cancer', *Theranostics*, 7: 3053-67.

3.10 Figures

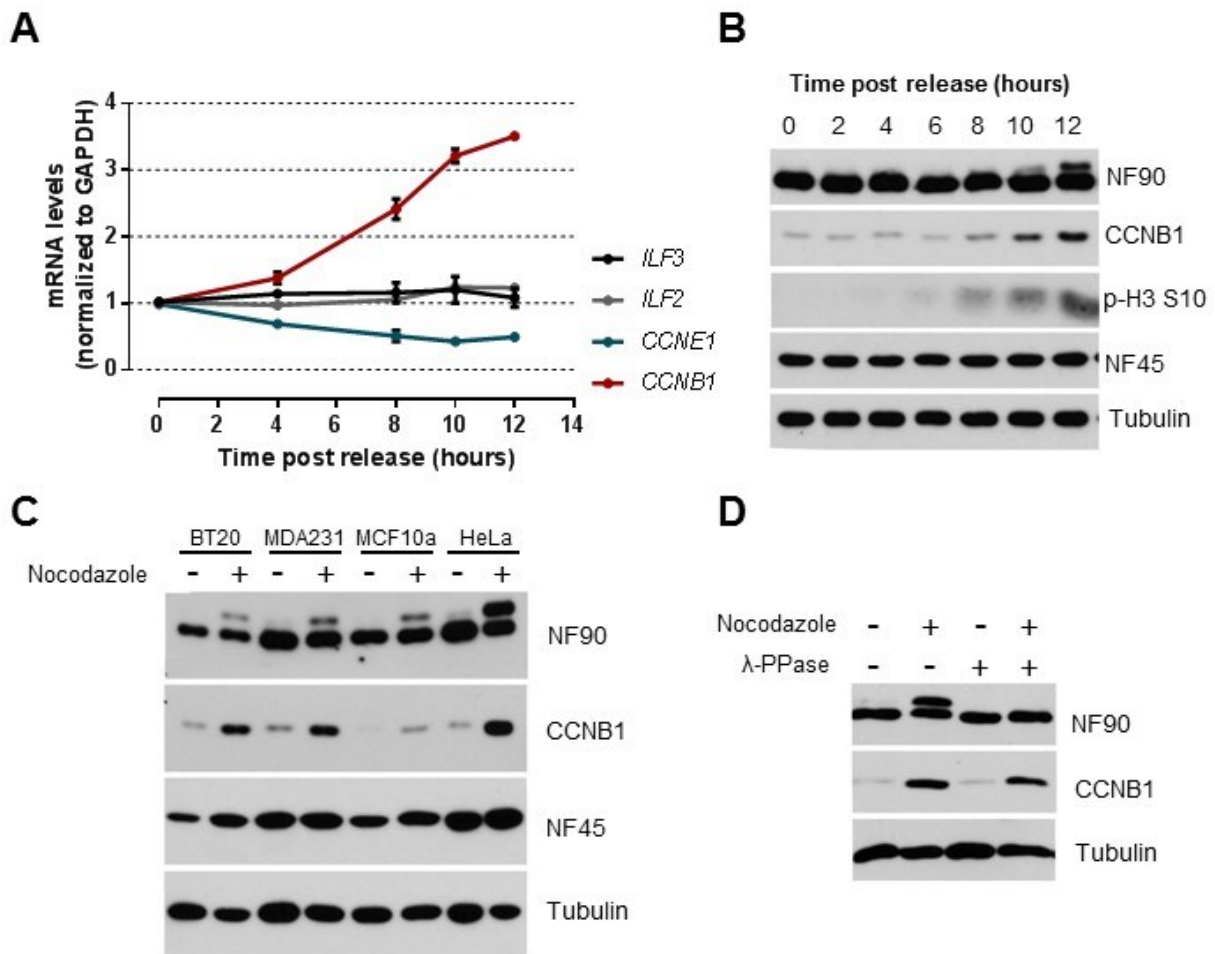


Figure 31. Analysis of NF45/90 expression through cell cycle progression.

(A) HeLa cells were synchronized by DTB and released. Total RNA was extracted at 4-, 8-, 10- and 12-hours post-DTB release and ILF2/NF45, ILF3/NF90, CCNB1, CCNE1 mRNAs were quantified by RT-qPCR and normalized to GAPDH mRNA levels. (B) HeLa cells were synchronized by DTB and released. Protein cell lysate were harvest at 2-, 4-, 6-, 8-, 10-, 12-hours post-DTB release and protein levels of NF45, NF90, CCNB1, p-H3 Serine 10, and tubulin were detected by western blot. (C) BT20, MDA-MB-231 (MB231), MCF10a and HeLa cells were synchronized in G2/M by nocodazole treatment. Protein levels of NF45, NF90, CCNB1 and tubulin were detected by western blot. (D) HeLa cells were synchronized in G2/M by nocodazole treatment. Cell extracts were treated with λ -phosphatase for 30 min at 37°C. Protein levels of NF45, NF90, and CCNB1 were assessed by western blot.

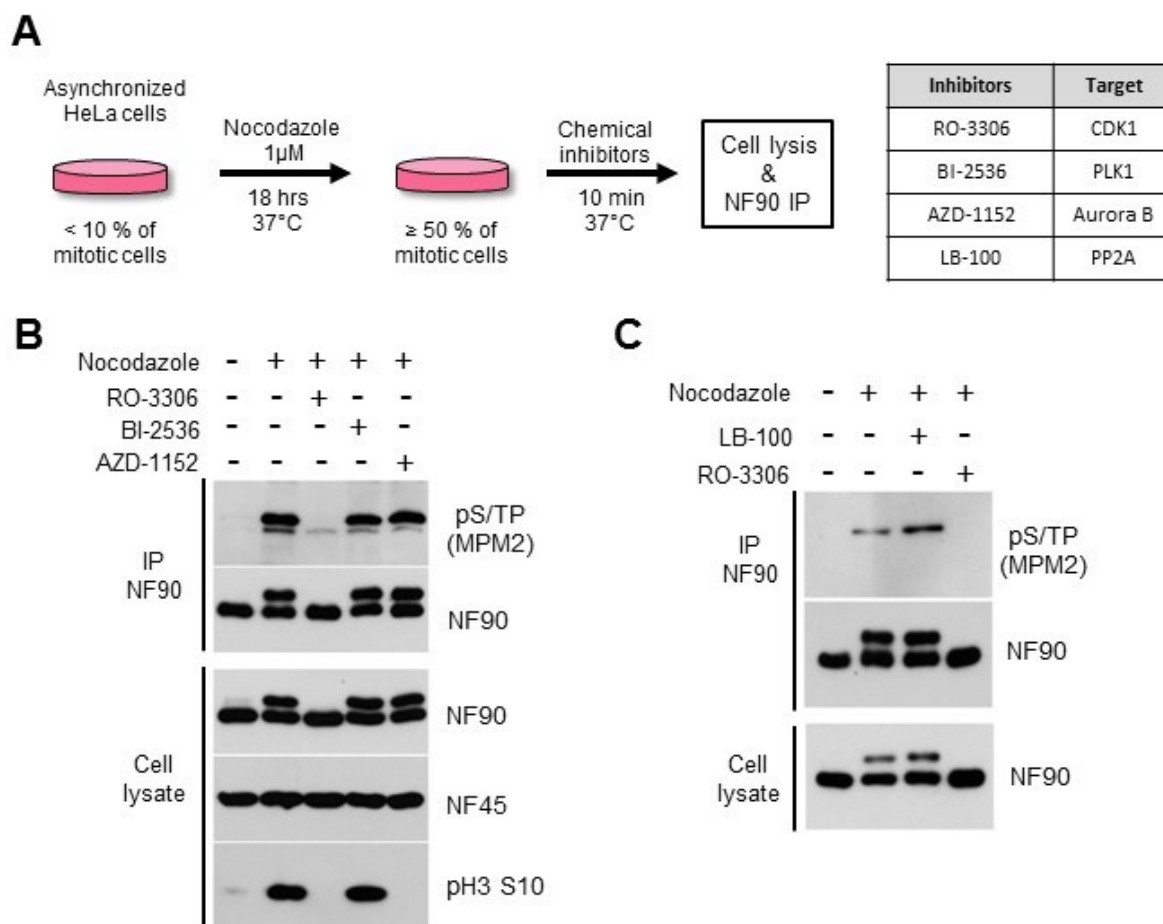


Figure 32. NF90 phosphorylation is regulated by CDK1 and PP2A in mitosis

(A) Schematic representation of the cell synchronization protocol and drug table. **(B, C)** HeLa cells were synchronized in G2/M by Nocodazole. Synchronized cells were either treated with different kinase inhibitors or PP2A inhibitor LB-100. Then, NF90 was immunoprecipitated, and protein levels were assessed by western blot.

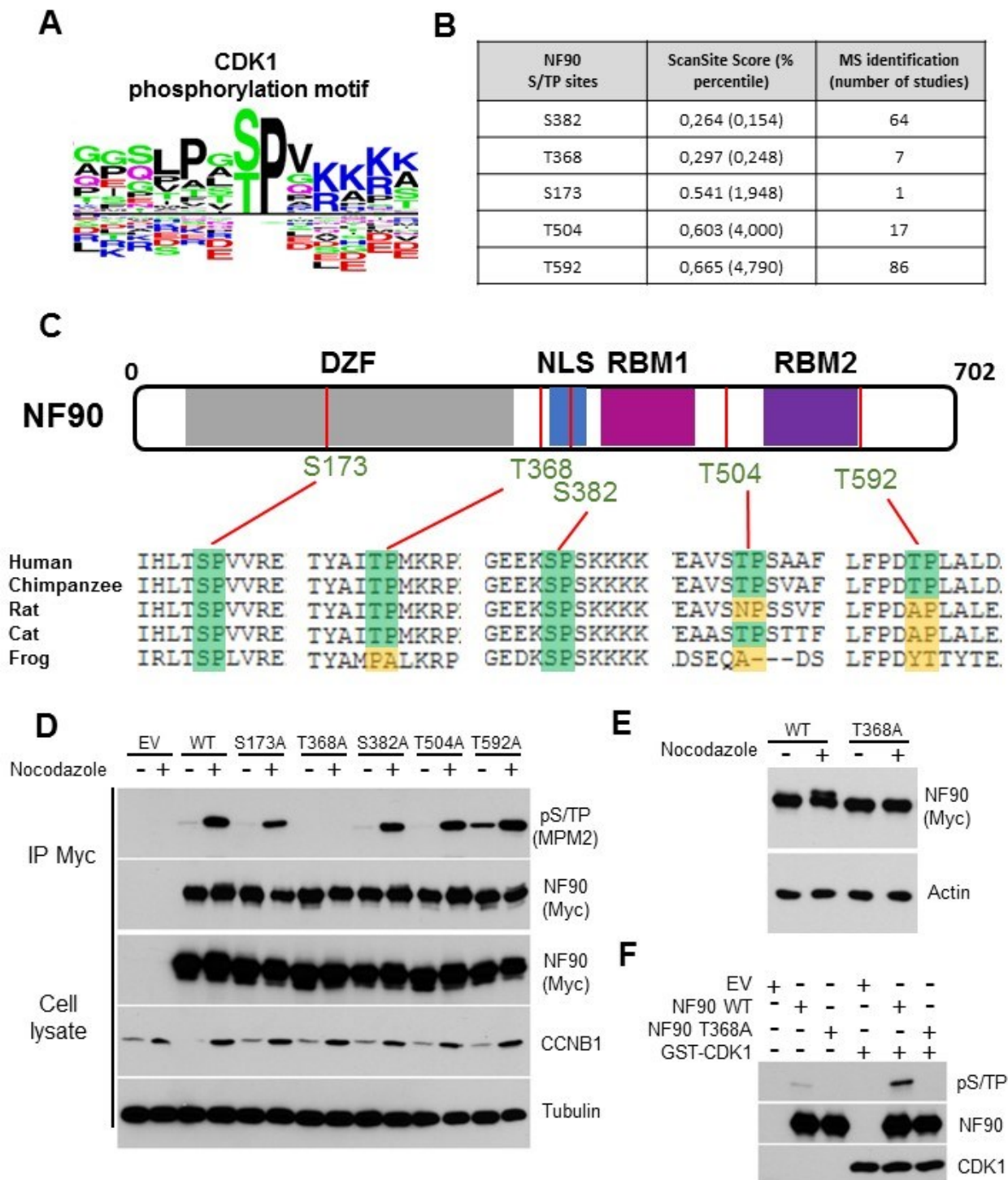


Figure 33. CDK1 directly phosphorylates NF90 on Thr368.

(A) CDK1 phosphorylation motif +/- 6 amino acids generated from 1408 substrate input sequences (Human, Mouse, Rat). (B) CDK1 potential phosphorylation sites on NF90. Residues were ranked based on their Scansite score towards CDK1 phosphorylation motif. Scansite scores are on a 0 to infinity scale, where 0 means a protein sequence perfectly

matches the optimal binding pattern, and larger numbers indicate progressively poorer matches to the optimal consensus sequence. MS identification: number of different datasets were these residues were found to be phosphorylated. Data obtained from www.phosphosite.org. **(C)** Representation of NF90 potential CDK1 phosphorylation sites and amino acids alignment of Homo sapiens (Human), Pan troglodytes (Chimpanzee), Rattus norvegicus (Rat), Felis catus (Cat), and Xenopus laevis (African clawed frog) sequences. **(D)** HEK293 cells were transfected with 6myc tagged NF90-WT, NF90-S173A, NF90-T368A, NF90-S382A, NF90-T504A, or NF90-T592A, and then synchronized in G2/M with nocodazole treatment. Ectopic forms of NF90 were IP using anti-myc antibody, and protein levels were assessed by western blot. **(E)** HEK293 cells were transfected with 6myc tagged NF90-WT or NF90-T368A, protein levels were assessed by western blot. **(F)** In vitro kinase assay with purified NF90-WT or NF90-T368A from asynchronous HEK293 cells and recombinant GST CDK1-CCNB1.

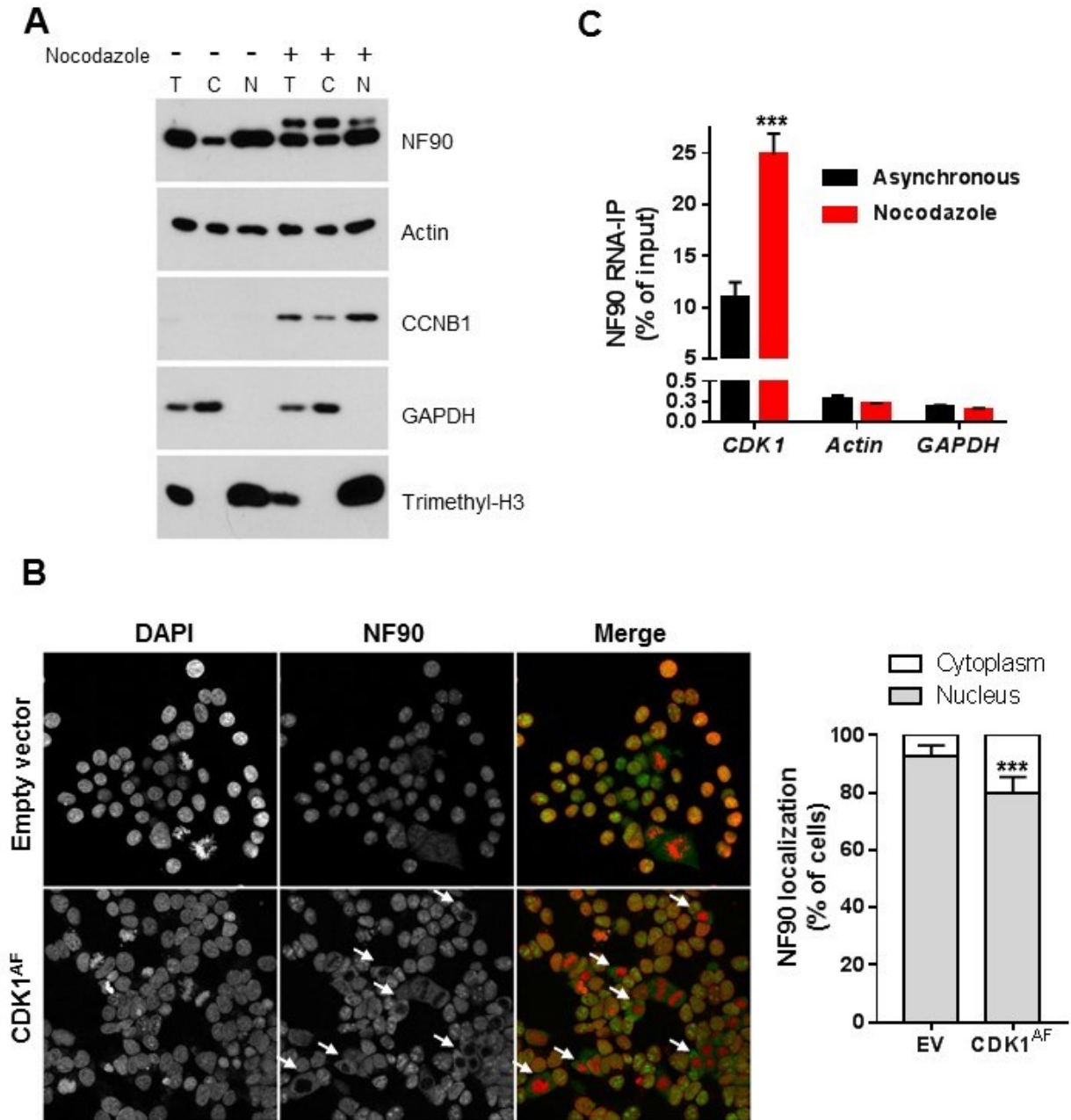


Figure 34. CDK1 activation leads to NF90 cytoplasmic export.

(A) HeLa cells were synchronized in G2/M with nocodazole treatment. Then nuclear and cytoplasmic fractions were prepared from cell lysates. T: Total C: cytoplasmic fraction N: Nuclear fraction. (B) Immunofluorescence of HEK293 cells transfected with CDK1^{AF}(T14A/Y15F) or empty vector (EV). Endogenous NF90 were stained with anti-NF90 (green) and DNA with DAPI (red). White arrows indicate interphase cells with NF90 cytoplasmic localization. Cells were imaged at 20x magnification. (C) HEK293 cells were

synchronized in G2/M with nocodazole treatment. Endogenous NF90 was IP and CDK1, Actin, GAPDH mRNAs were quantified by RT-qPCR and normalized to initial mRNA amounts from the inputs.

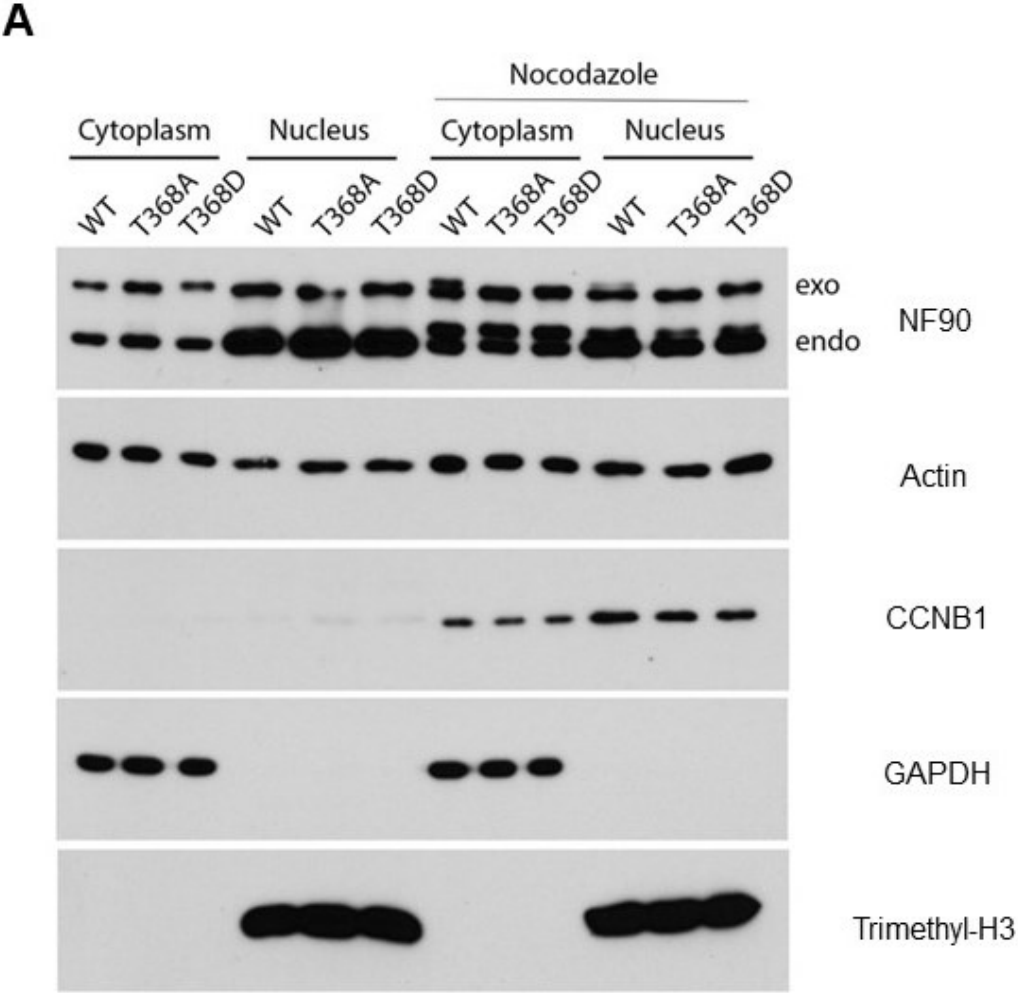


Figure 35. Nuclear cytoplasmic distribution of NF90 WT/T368A/T368D.

(A) HeLa cells stably expressing 6myc tagged NF90-WT, -T368A, T368D were synchronized in G2/M with nocodazole treatment. Then nuclear and cytoplasmic fractions were prepared from cell lysates. T: Total C: cytoplasmic fraction N: Nuclear fraction.

4 Chapitre 4 : High-throughput screening identifies cardiac glycosides as selective modulators of the NF45-NF90 complex

Sami Nourreddine^{1,4}, Justine Paradis², Geneviève Lavoie¹, Thibault Houles¹, Jean Duchaine¹, Dominic Salois¹, Michel Bouvier^{1,5}, Philippe P. Roux^{1,3}

¹Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada.

²Moore's Cancer Center, University of California, San Diego, La Jolla, CA, 92037, USA.

³Department of Pathology and Cell Biology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada.

⁴Department of Molecular Biology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada.

⁵Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, H3T 1J4, Canada.

4.1 Mise en Contexte

Le complexe NF45-NF90 est impliqué dans de nombreuses fonctions biologiques, dont la progression dans le cycle cellulaire. Plusieurs études ont démontré que NF45 et NF90 sont fréquemment surexprimés dans les cancers et associés à un mauvais pronostic. Le complexe NF45-NF90 régule l'expression génique à différents niveaux (transcription, épissage, stabilité des ARNm) en liant les ARN. Dans la première étude où nous avons caractérisé le rôle de NF45-NF90 dans la régulation de l'expression des gènes mitotiques (Chapitre 2), nous avons montré que l'interaction physique entre NF45 et NF90, via leurs domaines DZF, est critique pour leur stabilité protéique. De plus, la liaison de NF45 à NF90 augmente très significativement l'affinité de NF90 pour les ARN. Par conséquent, nous avons postulé que cibler l'interaction entre NF45 et NF90 permettrait d'inhiber les fonctions biologiques du complexe NF45-NF90. Ainsi, nous avons élaboré un projet afin d'identifier des petites molécules pouvant inhiber NF45-NF90.

Pour ce faire, nous avons développé des sondes de BRET permettant de quantifier l'interaction entre NF45 et NF90 dans les cellules vivantes. Cet essai cellulaire a été optimisé pour être réalisé en plaque 384 puits dans le but de réaliser un criblage à haut-débit de petites molécules. Nous avons criblé 120 900 composés sur des cellules HEK293T exprimant les biosenseurs NF45-NF90, et avons identifié 1 629 molécules perturbant le signal BRET. Parmi ces molécules sélectionnées, nous nous sommes focalisés sur celles déjà testées chez l'humain et avons découvert que 14 molécules appartiennent à la même famille, soit les glycosides cardiaques. Nous avons validé l'effet spécifique de ces glycosides cardiaques sur NF45-NF90 en réalisant des doses réponses avec 3 analogues (digoxine, ouabaine et digoxigénine). D'autre part, nous avons observé une similitude phénotypique, en particulier, des défauts de mitose entre les cellules traitées avec les glycosides cardiaques et les cellules déplétées pour NF45 ou NF90.

Ainsi, cette étude nous a permis de découvrir plus de 600 molécules pouvant potentiellement cibler l'interaction entre NF45 et NF90. Parmi celles-ci, nous avons identifié

les glycosides cardiaques qui ont des effets biologiques multiples et complexes. Cette étude apporte des connaissances supplémentaires dans la compréhension du mécanisme pléiotrope des glycosides cardiaques.

4.2 Abstract

Nuclear factor 45 and 90 (NF45 and NF90) form an RNA-binding complex that controls gene expression at multiple levels, including transcription, splicing and RNA stability. Both proteins were shown to be overexpressed in many types of cancer and to correlate with high proliferative rates and poor prognosis. We recently found that the NF45-NF90 complex regulates the expression of important mitotic proteins, suggesting its potential as a therapeutic target in cancer. As the interaction between NF45 and NF90 is essential for its biological function, we developed a bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based assay to measure their interaction in live cells. This assay was used for the high-throughput screening (HTS) of a library of 120 900 small molecules, which resulted in the identification of 1 629 potential hits (1.35% hit rate). Amongst identified compounds, we found 14 molecules belonging to the cardiac glycosides (CGs) family, including digoxin, digoxigenin and ouabain. These compounds were confirmed to modulate the NF45-NF90 complex at IC_{50} values in the 100-250 nM range. CGs have been described to have antiproliferative properties in cancer cells. Similar to the depletion of the NF45-NF90 complex, we found that cells treated with CGs display mitotic defects, including binucleation and resistance to nocodazole-induced mitotic arrest. Altogether, our study suggests that CGs may exert their antimitotic effects by targeting the NF45-NF90 complex.

4.3 Introduction

Nuclear factor 45 and 90 (NF45 and NF90) are ubiquitously expressed heterodimeric proteins that regulate gene expression at several levels (Guan et al. 2008). Using the double stranded RNA-binding domains (dsRBD) of NF90, the NF45-NF90 complex binds various species of RNAs, including DNA-RNA hybrids (Nadel et al. 2015), pre-mRNA, pre-miRNA (Sakamoto et al. 2009), circRNA (Li et al. 2017), and mRNAs (Song et al. 2017). Consequently, the NF45-NF90 complex plays roles in various steps of RNA processing, including alternative splicing (Marchesini et al. 2017), non-coding RNA biogenesis (Masuda et al. 2013), and mRNA stability (Castella et al. 2015), and promotes specific expression programs regulating the cell cycle (Nourreddine et al. 2020), angiogenesis (Vumbaca et al. 2008), DNA damage response (Marchesini et al. 2017), and host immune responses (Watson, Bellora, and Macias 2020). In the past decade, NF45 and NF90 were shown to be overexpressed in patient tumors of many cancer types and their expression levels are significantly correlated with poor prognosis (Zhang et al. 2018; Xu et al. 2020; Wan et al. 2015). Recent work found that the NF45-NF90 complex controls expression of an important cluster of mitotic mRNAs (Nourreddine et al. 2020), highlighting its role in cancer cell proliferation.

Physical interaction between NF45 and NF90 is mediated by their DZF (domain associated with zinc fingers) domains (Wolkowicz and Cook 2012). NF45 lacks RNA-binding capabilities, but its association to NF90 was shown to enhance its affinity towards RNA by about 10-fold (Schmidt et al. 2017). The interaction between NF45 and NF90 induces a mutual thermodynamic stabilization, explaining why, in cells, depletion of NF45 also results in reduced levels of NF90. We previously found that both DZF domains are required for the post-transcriptional regulation by NF45 and NF90 (Nourreddine et al. 2020). Thus, interfering with the NF45-NF90 interaction could greatly alter complex-dependent biological functions, such as cell cycle progression, and could potentially inhibit cell proliferation. Although the interaction between NF45 and NF90 has been well characterized, no compound that targets the NF45-NF90 complex has been identified to date.

Herein, we describe the development of a bioluminescence resonance energy transfer (BRET)-based biosensor to measure the interaction between NF45 and NF90 in live cells. We performed high-throughput screening (HTS) of a small-molecule library of 120 900 compounds, and identified 1 629 hits modulating the interaction between NF45 and NF90. We focused on FDA-approved small-molecules and found 14 cardiac glycosides (CGs) that modulate the NF45-NF90 complex in the 100-250 nM range. Similar to NF45 or NF90 depletion, we found that treatment of cells with several CGs leads to increased binucleation and synchronization failure in response to spindle poisons. Altogether, our results suggest that the antimetabolic effects of CGs are mediated in part through the modulation of the NF45-NF90 complex.

4.4 Results

Development of BRET-based biosensors measuring the NF45-NF90 interaction

To assess the interaction between NF45 and NF90 in living cells, we developed BRET-based biosensors by fusing wild-type NF45 (NF45wt) and NF90 with GFP10 (acceptor) and *Renilla* Luciferase (Rluc; donor), respectively (Figure 1A). As control probes, we introduced mutations within the DZF domain of NF45 (D308R/R319E; NF45mut), which prevents its association with NF90 (Nourredine et al. 2020). We performed titration curves with either NF45wt-GFP10/NF90-Rluc or NF45mut-GFP10/NF90-Rluc at different GFP10 (acceptor)/Rluc (donor) ratios to reach saturation of the BRET signal. Titration curves of the NF45wt/NF90 BRET pair shows a logarithmic increase similar to classical binding curves, confirming the expected binding between NF45wt-GFP10 and NF90-Rluc. Consistent with this, titration curves obtained with NF45mut-GFP10 instead of NF45wt-GFP10 resulted in linear slopes (Figure 1B). Thus, the logarithmic behavior of the titration curves appears specific to the interaction between NF45 and NF90, and mutation in the DZF domain of NF45 is sufficient to disrupt its interaction with NF90, as shown previously with co-immunoprecipitation assays (Nourredine et al. 2020). To

determine if the NF45wt/NF90 probe is sensitive to stoichiometric modulations, we co-transfected NF45wt-GFP10/NF90-Rluc with different amounts of either untagged NF45wt or NF45mut (D308R/R319E). We found that the BRET signal decreased with increasing levels of NF45wt, whereas co-transfection of NF45mut did not significantly alter the BRET signal (Figure 1C). The DZF domains of NF45 and NF90 are not only involved in the physical interaction between the two proteins, but also enhance their stability *in vitro* (Schmidt et al. 2017). Indeed, transfection of untagged NF90 was able to increase GFP counts of NF45wt-GFP10 by ~2-fold, but did not appear to affect the stability of NF45mut-GFP10 (Figure 1D). Collectively, these results indicate that the BRET signal produced by the NF45wt-GFP10/NF90-Rluc pair is consistent with their mutual interaction, and that this biosensor appears to be responsive to stoichiometric changes within the NF45-NF90 complex.

High-throughput small-molecule screening and hits selection

Based on these findings, we decided to optimize the BRET assay in 384-well plates in order to obtain a Z-factor > 0.5 that could be suitable for a small-molecule HTS. Z-factor calculations take into account the mean and the standard deviation of positive (NF45wt-GFP10) and negative (NF45mut-GFP10) conditions. For each of these conditions, we have measured BRET signals over 192 replicates for each conditions to calculate the Z' which was evaluated at ~0.75 based on BRET averages of NF45wt-GFP10/NF90-Rluc ($0.152 \pm 2.2 \%$) and NF45mut-GFP10/NF90-Rluc ($0.082 \pm 2.8 \%$) (Figure 1E). To identify molecules that affect the NF45-NF90 interaction, we screened 120 900 compounds from a diverse set of chemical libraries (Figure S1A). The compounds were incubated at 10 μ M for 3 hours on transfected HEK293T cells. A relatively short incubation time was selected to ensure that the compounds did not affect the expression of biosensors. Each 384-well plate contained DMSO-treated cells as controls, and HEK293T expressing NF45mutGFP10/NF90-Rluc to calculate plate-specific Z'. All compounds were screened using 407 plates in total, and all plates had Z' > 0.55, giving adequate conditions to analyze the activity of all 120 900 compounds (Figure S1B).

As the BRET signal is light-based, we developed a hit selection pipeline to exclude quenching compounds (Figure 2B). GFP quenching was assessed by measuring GFP signal before adding the Rluc substrate, coelenterazine. We then excluded 5 300 compounds that displayed >40% quenching activity towards Rluc or GFP. Amongst the remaining 115 600 compounds, we found 1 629 compounds (1.4 % hit rate) that affected the NF45-NF90 BRET signal by more than 30% (~15-fold S.D.) (Figure 2C). To further remove off-target compounds, we have crossed BRET values obtained from the NF45-NF90 HTS over the average of BRET values collected from 7 different and unrelated BRET-based HTS, which were performed in our research facility. Using this hit selection method, we found 737 hits that alter NF45-NF90 BRET > 30% without disturbing BRET signals of the 7 other BRET pairs (Figure 2D). Amongst the 737 selected hits, we identified 22 that belong to the FDA-approved sub-library (Figure 2B). Using BiNChE webtool (<https://www.ebi.ac.uk/chebi/tools/binche/>), an enrichment analysis tool for Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI) (Moreno et al. 2015), we identified 14 compounds out of 22 ($p\text{-val} = 2.23 \times 10^{-17}$) that belong to the cardenolide family, also known as cardiac glycosides (CGs) (Figure 2E). From our HTS data, these FDA-approved compounds show a higher activity toward the NF45-NF90 BRET pair compared to seven other BRET pairs, suggesting relative specificity towards the NF45-NF90 complex. Altogether, our HTS strategy led to the identification of CGs as potential modulators of the NF45-NF90 interaction.

CGs modulate the NF45-NF90 complex in a dose-dependent manner

In the primary screen (Figure 2), NF45-NF90 BRET perturbations were assessed at only one concentration (10 μM) for each drug. Thus, to confirm results obtained with CGs, we first performed dose-response curves with 3 CGs, digoxin, digoxigenin and ouabain. We found that digoxin, digoxigenin and ouabain treatment for 3 hours modulated NF45-NF90 BRET signals in a dose-dependent manner with IC_{50} values below 300 nM (Figure 3A), thus validating results obtained from the primary screen (Figure 2). Then, to test whether CGs specifically target the

NF45-/NF90 interaction, we compared dose-response curves obtained with NF45/NF90 and Ezrin/CaaX BRET pairs. The Ezrin/CaaX biosensor has been characterized by Leguay et al. (Leguay et al. 2020), and these constructs provide a control to the selectivity of CGs toward NF45-NF90. While CGs provide a dose-dependent curve with a Hill slope >2 on NF45-NF90 BRET, Ezrin/CaaX BRET was not affected by CGs and the dose-response curve fitting was not significant (Figure 3B and Figure S2). CGs are known to directly target the Na⁺/K⁺ATPase channel and block K⁺ influx (Langer 1972). To assess whether inhibition of K⁺ influx indirectly affects the NF45/NF90 interaction, we assessed dose-response curves of Amiodarone, a potassium channel blocker used in the clinic for arrhythmias (Haverkamp, Israel, and Parwani 2017). Notably, Amiodarone did not alter the NF45/NF90 BRET in a dose-dependent manner (Figure 3A and Figure S2), suggesting that the activity of CGs against the NF45-NF90 complex may not be related to inhibition of K⁺ influx. Altogether, these results validate CGs as potential hits targeting the interaction between NF45 and NF90.

CG treatment results in mitotic defects reminiscent of NF45-NF90 loss-of-function

We previously identified NF45 and NF90 as important mitotic regulators. Depletion of NF45 or NF90 increases the rate of mitotic catastrophe which impairs cell growth (Nourreddine et al. 2020). CGs have been described as anti-proliferative compounds, but their effect on mitotic fitness has not been thoroughly investigated (Calderon-Montano et al. 2014). First, we assessed cell survival upon digoxin or ouabain treatment for 48 hours to determine optimal concentrations to use for binucleation assay. We found that digoxin and ouabain significantly affected HeLa cell survival with respectively IC₅₀ of 100 nM and 27 nM using WST-1 assay (Figure 4A). Then to evaluate mitotic progression, we quantified binucleated cells, which are representative of mitotic defects, by analyzing at least 500 cells using immunofluorescence. HeLa cells were treated with digoxin or ouabain for 48 hours at their IC₅₀ to cover at least 3 rounds of cell cycle (HeLa cell cycle time is about 12 hours). Similar to NF45 or NF90 knockdown, we found that CG treatment increased binucleation from 2.5 % in DMSO control

to 18.2 % and 16.4 %, respectively, with digoxin and ouabain at 100 nM (Figure 4B). We previously showed that NF45 or NF90 knockdown affects the nocodazole-induced spindle assembly checkpoint (SAC) (Nourreddine et al. 2020). To test the strength of this mitotic checkpoint, we synchronized HeLa cells using nocodazole (1 μ M) for 18 hours. In DMSO-treated cells, nocodazole treatment resulted in 77 % of the cells to be arrested in G2/M phase, whereas only 16% were blocked in G2/M when treated with either digoxin or ouabain (Figure 4D). Thus, CG treatment appears to weaken nocodazole-induced G2/M arrest, as we observed in NF45- or NF90-depleted cells (Figure 4C). Collectively, our results show that CG treatments result in comparable mitotic phenotypes (binucleation, SAC slippage) as the knockdown of NF45 or NF90, suggesting that CGs inhibit NF45-NF90-dependent functions related to mitosis.

4.5 Discussion

In this study, we developed BRET probes that assess the interaction between NF45 and NF90, which were optimized for HTS (Figure 1). We screened 120 900 compounds and amongst the 1 629 positive hits, we found 14 CGs (Figure 2). We performed dose-response curves for three CGs (digoxin, digoxigenin and ouabain) and validated their selectivity towards the NF45-NF90 complex (Figure 3). Interestingly, CG treatment was found to result in a similar mitotic phenotype than NF45 or NF90 depletion (Figure 4), suggesting that CGs exert their anti-proliferative effects in part by targeting the NF45-NF90 complex.

Besides their use for cardiac failure, CGs have been extensively studied in the context of cancer (Reddy et al. 2020). CGs display strong anti-cancer activity by reducing cell proliferation or by inducing cell death in different cancer subtypes (Cerella, Dicato, and Diederich 2013). Recently, digoxin was shown to impair colorectal cancer cell proliferation by causing G1 and G2/M arrest (Hou et al. 2020). Likewise, digoxin and ouabain were shown to induce G2 arrest in breast cancer cells, and this mechanism was shown to be independent of Na⁺/K⁺ pump inhibition (Busonero et al. 2020). We previously found that the NF45-NF90

complex is an important regulator of mitotic gene expression (e.g. *CDK1*, *BIRC5*, *NUF2*, *CCNA2*) (Nourredine et al. 2020). Intriguingly, CGs such as digoxin, ouabain or bufalin were already shown to downregulate the expression of *BIRC5*, *CDK1* and *TOP2A*, which are three important mitotic mRNAs and also NF45-NF90 targets (Liu et al. 2020; Xu et al. 2015 ; Li et al. 2014). In these studies, gene expression was measured between 24 to 48 hours post-treatment. Here we showed that CGs specifically target NF45-NF90 interaction within 3 hours and lead to a similar mitotic phenotype of NF45 or NF90 knockdown. Taken together, NF45-NF90 complex could possibly be involved in the mechanism of action where CGs induce mitotic genes downregulation. However, more work will be necessary to determine whether NF45-NF90 interaction is directly targeted by CGs and modulate NF45-NF90 interactions towards mRNAs.

CGs exhibit pleiotropic biological effects, and have been so far shown to display antiarrhythmic, anti-cancer and anti-viral activities (Reddy et al. 2020). Indeed, CGs have been identified as antivirals for many types of viruses such as Ebola (Dowall et al. 2016), Influenza (Hoffmann, Palese, and Shaw 2008), and HIV (Wong et al. 2018). Wong et al. showed that CGs are potent inhibitors of HIV gene expression by decreasing expression of Rev, Gag and Tat mRNA and protein levels. Interestingly, NF90 interacts directly with *Tat* RNA, and knockdown of NF90 downregulates *Tat* expression which inhibits transcriptional activation of HIV (Agbottah et al. 2007). Furthermore, NF90 is also found to be a host factor for Ebola , and Influenza viruses (Shabman et al. 2011 ; Wang et al. 2009). As we found for cell cycle progression, NF90 knockdown leads to an antiviral response similarly to CGs treatments. Thus, it would be interesting to assess molecular functions of NF90 in regard to viral replication when infected cells are treated with CGs.

In conclusion, CGs and NF45-NF90 knockdown display several common phenotypes, and further molecular characterization of CGs on NF45/NF90 interaction would help to understand pleiotropic effects of CGs in the various biological context.

4.6 Acknowledgment

We acknowledge Dr. Carréno for providing Ezrin/CAAX BRET constructs. This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research (MOP-142374 and PJT-152995 to P.P.R.), and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (P.P.R.). P.P.R. is a scholar of the Fonds de la recherche du Québec - Santé (FRQS).

4.7 Author contributions

Sami Nourreddine designed all experiments, prepared the reagents for the HTS, performed dose-response curves, immunofluorescence and FACS experiments, and wrote the initial draft of the manuscript. Justine Paradis performed subcloning and optimization of the NF45-NF90 BRET biosensors. Jean Duchaine and Dominic Salois performed the NF45-NF90 high-throughput screen. Geneviève Lavoie and Thibault Houles performed proliferation assays. Philippe P. Roux participated in study design, drafted and finalized the manuscript.

4.8 Materials and Methods

DNA constructs. The original plasmids encoding human NF45, NF90 (pCDNA3-NF45 and pCDNA3-NF90) and were respectively obtained from Dr. Mathews (New Jersey Medical School, NJ, USA). These DNA constructs were used as template for generating RlucII tagged or GFP10 tagged NF90, and NF45 in the pcDNA3 backbone. Ezrin-RlucII and CaaX-GFP were obtained from Dr. Carréno (Université de Montréal, QC, Canada).

High-throughput Screening. 20 million of HEK293T cells were plated in CellStacks (Corning) and transfected with PEI 24 hours later. 48 hours post-transfection, cells were resuspended in Tyrode buffer (pH 6.5, NaCl 134 mM, KCl 2.7 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgCl₂ 1.05 mM, NaHPO₄ 417 µM, NaHCO₃ 11.9 mM, glucose 5.56 mM) and dispensed in 384 well plates using Multidrop combi (Thermofisher). Using Biomek workstation (Beckman Coulter) compounds were added at 10 µM to 384 well plate and were incubated for 3 hours at 37 °C. GFP signals

were measured with Synergy NEO (Biotek). Then luciferase substrate, Coelenterazine 400a (Biotium) in tyrode buffer with 1% pluronic, was added to 384 well plates at 2.5 μ M final concentration and were incubated for 10 min 37°C. Subsequently, Luciferase and GFP signals were measured with Synergy NEO plate reader and BRET ratio was calculated.

Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) Assays. BRET assays were performed as described previously (Nourredine et al. 2020). For BRET400-GFP10, proteins were fused to RLucII (donor) and GFP10 (acceptor). Coelenterazine-400a (coel-400a) (Biotium) was used as the luciferase substrate to generate light with a maximal emission peak at 400 nm, allowing GFP10 excitation (maximum at 400 nm). BRET was measured using a Mithras LB940 Multimode Microplate Reader (Berthold Technologies) equipped with either a BRET480-YFP filter set (donor 480 \pm 20 nm and acceptor 530 \pm 20 nm filters) or a BRET400-GFP10 filter set (donor 400 \pm 70 nm and acceptor 515 \pm 20 nm filters). Briefly, cells were seeded the day after transfection in a poly-L-ornithine (Sigma-Aldrich)–pretreated 96-well microplate (CulturePlate; PerkinElmer Inc.). BRET values were collected after the addition of the luciferase substrate at a final concentration of 2.5 μ M. BRET signals were determined as the ratio of the light emitted by acceptor (GFP10) over donor (RLucII).

Dose-Response Curves. HEK293T transfected with BRET biosensors (NF45/NF90, CaaX/Ezrin) were resuspended in Tyrode buffer and seeded into 96 well plates. For each drug, 8 doses (10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1000 nM, 3000 nM, 10 000 nM) were added to cells in quadruplicates. Drugs were incubated for 3 hours at 37°C, and then Coelenterazine-400a (coel-400a) (Biotium) was added at a final concentration of 2.5 μ M to produce light with maximal peak at 400 nm. BRET values were normalized to DMSO control. Dose response curves were plotted with four parameter (4-PL) curve fitting using GraphPad Prism software (GraphPad Software).

Immunofluorescence microscopy. For immunofluorescence analyses, 6 x 10⁴ HeLa cells were seeded in 24-well plates containing coverslips. Twenty-four hours later, cells were fixed in 3.7% formaldehyde for 10 min. Cells were washed twice in PBS, permeabilized for 5 min in

PBS containing 0.3% Triton X-100 and blocked with PBS containing 1% bovine serum albumin for 1h. Cells were incubated for 30min with anti-tubulin Alexa488 (Invitrogen), Phalloidin-Texas Red (Invitrogen) antibodies. Cells were stained with DAPI Vectashield (VectorLabs). Images were acquired on a LSM700.

Proliferation Assays. For proliferation assays, HeLa cells were grown in medium supplemented with 5% FBS. The relative number of viable cells was measured every 24 h during four consecutive days using the 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt (WST-1), cell proliferation assay from Roche, as shown elsewhere (Julien et al., 2010). The absorbance was measured at 490 nm using a Tecan GENios Plus microplate reader, and the results displayed represent the mean of triplicates \pm standard error (SE).

Synchronization and Flow Cytometric Analysis of Cell Cycle Distribution. HeLa cells were synchronized in mitosis with a double thymidine block followed by nocodazole (Sigma-Aldrich) treatment for 18 h. Twenty-four hours after being seeded, cells were exposed to 2 mM thymidine (Sigma Aldrich) for 16 h. Cells were then released for 6 h followed by a second thymidine block for a further 16 h, then HeLa cell were incubated overnight with nocodazole at 1.5 μ M. The DNA and RNA intercalating fluorescent dye propidium iodide (Sigma-Aldrich) was used to quantify cellular DNA content and cell cycle distribution. After treatment, HeLa cells were harvested and fixed in 95% ethanol at -20°C . Before analysis, cells were incubated with RNase A (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma-Aldrich) and stained with propidium iodide (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 30 min. Samples were immediately analyzed by flow cytometry with a BD FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences) at low flow rate. A total of 2×10^4 events was recorded per sample, and the cell fraction G0/G1, S and G2/M phases were quantified with BD FACSDiva software (BD Biosciences) and plots were done with FlowJo.

4.9 References

- Agbottah, E. T., C. Traviss, J. McArdle, S. Karki, G. C. St Laurent, 3rd, and A. Kumar. 2007. 'Nuclear Factor 90(NF90) targeted to TAR RNA inhibits transcriptional activation of HIV-1', *Retrovirology*, 4: 41.
- Busonero, C., S. Leone, F. Bianchi, E. Maspero, M. Fiocchetti, O. Palumbo, M. Cicolletti, S. Bartoloni, and F. Acconcia. 2020. 'Ouabain and Digoxin Activate the Proteasome and the Degradation of the ERalpha in Cells Modeling Primary and Metastatic Breast Cancer', *Cancers (Basel)*, 12.
- Calderon-Montano, J. M., E. Burgos-Moron, M. L. Orta, D. Maldonado-Navas, I. Garcia-Dominguez, and M. Lopez-Lazaro. 2014. 'Evaluating the cancer therapeutic potential of cardiac glycosides', *Biomed Res Int*, 2014: 794930.
- Castella, S., R. Bernard, M. Corno, A. Fradin, and J. C. Larcher. 2015. 'Ilf3 and NF90 functions in RNA biology', *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 6: 243-56.
- Cerella, C., M. Dicato, and M. Diederich. 2013. 'Assembling the puzzle of anti-cancer mechanisms triggered by cardiac glycosides', *Mitochondrion*, 13: 225-34.
- Dowall, S. D., K. Bewley, R. J. Watson, S. S. Vasan, C. Ghosh, M. M. Konai, G. Gausdal, J. B. Lorens, J. Long, W. Barclay, I. Garcia-Dorival, J. Hiscox, A. Bosworth, I. Taylor, L. Easterbrook, J. Pitman, S. Summers, J. Chan-Pensley, S. Funnell, J. Vipond, S. Charlton, J. Haldar, R. Hewson, and M. W. Carroll. 2016. 'Antiviral Screening of Multiple Compounds against Ebola Virus', *Viruses*, 8.
- Guan, D., N. Altan-Bonnet, A. M. Parrott, C. J. Arrigo, Q. Li, M. Khaleduzzaman, H. Li, C. G. Lee, T. Pe'ery, and M. B. Mathews. 2008. 'Nuclear factor 45 (NF45) is a regulatory subunit of complexes with NF90/110 involved in mitotic control', *Mol Cell Biol*, 28: 4629-41.
- Haverkamp, W., C. Israel, and A. Parwani. 2017. '[Clinical aspects of treatment with amiodarone]', *Herzschrittmacherther Elektrophysiol*, 28: 307-16.

- Hoffmann, H. H., P. Palese, and M. L. Shaw. 2008. 'Modulation of influenza virus replication by alteration of sodium ion transport and protein kinase C activity', *Antiviral Res*, 80: 124-34.
- Hou, Y. Q., Y. Y. Wang, X. C. Wang, Y. Liu, C. Z. Zhang, Z. S. Chen, Z. Zhang, W. Wang, and D. X. Kong. 2020. 'Multifaceted anti-colorectal tumor effect of digoxin on HCT8 and SW620 cells in vitro', *Gastroenterol Rep (Oxf)*, 8: 465-75.
- Laird, G. M., E. E. Eisele, S. A. Rabi, D. Nikolaeva, and R. F. Siliciano. 2014. 'A novel cell-based high-throughput screen for inhibitors of HIV-1 gene expression and budding identifies the cardiac glycosides', *J Antimicrob Chemother*, 69: 988-94.
- Langer, G. A. 1972. 'Effects of digitalis on myocardial ionic exchange', *Circulation*, 46: 180-7.
- Leguay, K., B. Decelle, Y. He, M. Hogue, H. Kobayashi, C. Le Gouill, M. Bouvier, S. Carréno. 2020. 'Development of conformational BRET biosensors that monitor Ezrin, Radixin and Moesin activation in real-time', *bioRxiv* 10.1101/2020.07.10.197707
- Li, M., X. Yu, H. Guo, L. Sun, A. Wang, Q. Liu, X. Wang, and J. Li. 2014. 'Bufalin exerts antitumor effects by inducing cell cycle arrest and triggering apoptosis in pancreatic cancer cells', *Tumour Biol*, 35: 2461-71.
- Li, X., C. X. Liu, W. Xue, Y. Zhang, S. Jiang, Q. F. Yin, J. Wei, R. W. Yao, L. Yang, and L. L. Chen. 2017. 'Coordinated circRNA Biogenesis and Function with NF90/NF110 in Viral Infection', *Mol Cell*, 67: 214-27 e7.
- Liss, M., M. H. Radke, J. Eckhard, M. Neuenschwander, V. Dauksaite, J. P. von Kries, and M. Gotthardt. 2018. 'Drug discovery with an RBM20 dependent titin splice reporter identifies cardenolides as lead structures to improve cardiac filling', *PLoS One*, 13: e0198492.
- Liu, S. H., J. Yu, J. F. Creeden, J. M. Sutton, S. Markowiak, R. Sanchez, J. Nemunaitis, A. Kalinoski, J. T. Zhang, R. Damoiseaux, P. Erhardt, and F. C. Brunicardi. 2020. 'Repurposing metformin, simvastatin and digoxin as a combination for targeted therapy for pancreatic ductal adenocarcinoma', *Cancer Lett*, 491: 97-107.

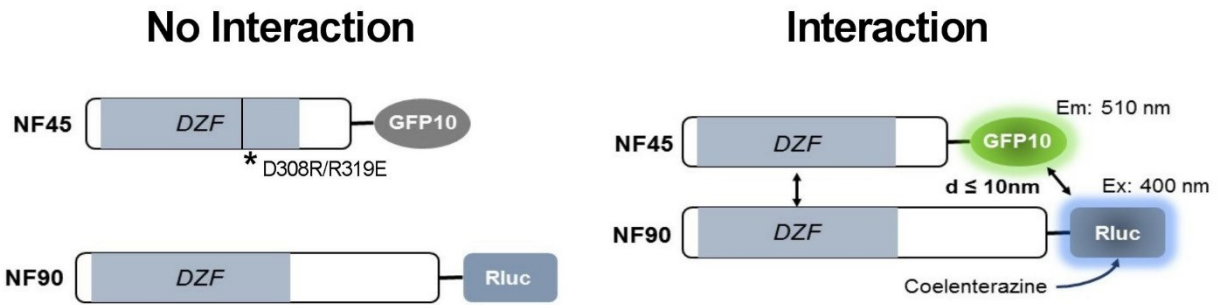
- Marchesini, M., Y. Ogoti, E. Fiorini, A. Aktas Samur, L. Nezi, M. D'Anca, P. Storti, M. K. Samur, I. Ganan-Gomez, M. T. Fulciniti, N. Mistry, S. Jiang, N. Bao, V. Marchica, A. Neri, C. Bueso-Ramos, C. J. Wu, L. Zhang, H. Liang, X. Peng, N. Giuliani, G. Draetta, K. Clise-Dwyer, H. Kantarjian, N. Munshi, R. Orlowski, G. Garcia-Manero, R. A. DePinho, and S. Colla. 2017. 'ILF2 Is a Regulator of RNA Splicing and DNA Damage Response in 1q21-Amplified Multiple Myeloma', *Cancer Cell*, 32: 88-100 e6.
- Masuda, K., Y. Kuwano, K. Nishida, K. Rokutan, and I. Imoto. 2013. 'NF90 in posttranscriptional gene regulation and microRNA biogenesis', *Int J Mol Sci*, 14: 17111-21.
- Mi, S., Y. Li, J. Yan, and G. F. Gao. 2010. 'Na(+)/K (+)-ATPase beta1 subunit interacts with M2 proteins of influenza A and B viruses and affects the virus replication', *Sci China Life Sci*, 53: 1098-105.
- Moreno, P., S. Beisken, B. Harsha, V. Muthukrishnan, I. Tudose, A. Dekker, S. Dornfeldt, F. Taruttis, I. Grosse, J. Hastings, S. Neumann, and C. Steinbeck. 2015. 'BiNChE: a web tool and library for chemical enrichment analysis based on the ChEBI ontology', *BMC Bioinformatics*, 16: 56.
- Nadel, J., R. Athanasiadou, C. Lemetre, N. A. Wijetunga, O. Broin P, H. Sato, Z. Zhang, J. Jeddloh, C. Montagna, A. Golden, C. Seoighe, and J. M. Greally. 2015. 'RNA:DNA hybrids in the human genome have distinctive nucleotide characteristics, chromatin composition, and transcriptional relationships', *Epigenetics Chromatin*, 8: 46.
- Nourredine, S., G. Lavoie, J. Paradis, K. Ben El Kadhi, A. Meant, L. Aubert, B. Grondin, P. Gendron, B. Chabot, M. Bouvier, S. Carreno, and P. P. Roux. 2020. 'NF45 and NF90 Regulate Mitotic Gene Expression by Competing with Staufen-Mediated mRNA Decay', *Cell Rep*, 31: 107660.
- Reddy, D., R. Kumavath, D. Barh, V. Azevedo, and P. Ghosh. 2020. 'Anticancer and Antiviral Properties of Cardiac Glycosides: A Review to Explore the Mechanism of Actions', *Molecules*, 25.

- Sakamoto, S., K. Aoki, T. Higuchi, H. Todaka, K. Morisawa, N. Tamaki, E. Hatano, A. Fukushima, T. Taniguchi, and Y. Agata. 2009. 'The NF90-NF45 complex functions as a negative regulator in the microRNA processing pathway', *Mol Cell Biol*, 29: 3754-69.
- Schmidt, T., Knick, P., Lillie, H., Friedrich, S., Golbik, R.P., and Behrens, S.E. (2017). The properties of the RNA-binding protein NF90 are considerably modulated by complex formation with NF45. *The Biochemical journal* 474, 259-280.
- Shabman, R. S., D. W. Leung, J. Johnson, N. Glennon, E. E. Gulcicek, K. L. Stone, L. Leung, L. Hensley, G. K. Amarasinghe, and C. F. Basler. 2011. 'DRBP76 associates with Ebola virus VP35 and suppresses viral polymerase function', *J Infect Dis*, 204 Suppl 3: S911-8.
- Song, D., H. Huang, J. Wang, Y. Zhao, X. Hu, F. He, L. Yu, and J. Wu. 2017. 'NF90 regulates PARP1 mRNA stability in hepatocellular carcinoma', *Biochem Biophys Res Commun*, 488: 211-17.
- Stoilov, P., C. H. Lin, R. Damoiseaux, J. Nikolic, and D. L. Black. 2008. 'A high-throughput screening strategy identifies cardiotoxic steroids as alternative splicing modulators', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 11218-23.
- Vumbaca, F., K. N. Phoenix, D. Rodriguez-Pinto, D. K. Han, and K. P. Claffey. 2008. 'Double-stranded RNA-binding protein regulates vascular endothelial growth factor mRNA stability, translation, and breast cancer angiogenesis', *Mol Cell Biol*, 28: 772-83.
- Wan, C., C. Gong, L. Ji, X. Liu, Y. Wang, L. Wang, M. Shao, L. Yang, S. Fan, Y. Xiao, X. Wang, M. Li, G. Zhou, and Y. Zhang. 2015. 'NF45 overexpression is associated with poor prognosis and enhanced cell proliferation of pancreatic ductal adenocarcinoma', *Mol Cell Biochem*, 410: 25-35.
- Wang, P., W. Song, B. W. Mok, P. Zhao, K. Qin, A. Lai, G. J. Smith, J. Zhang, T. Lin, Y. Guan, and H. Chen. 2009. 'Nuclear factor 90 negatively regulates influenza virus replication by interacting with viral nucleoprotein', *J Virol*, 83: 7850-61.

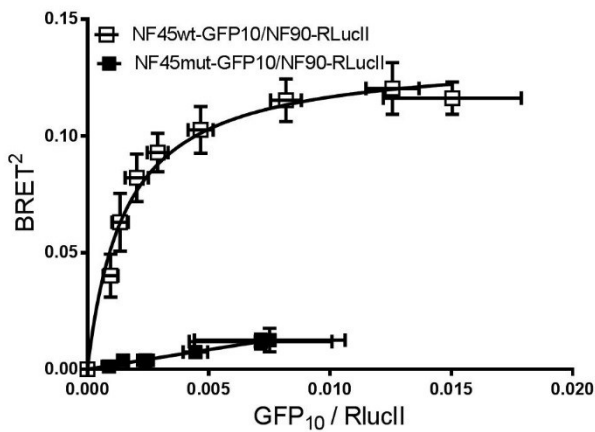
- Watson, S. F., N. Bellora, and S. Macias. 2020. 'ILF3 contributes to the establishment of the antiviral type I interferon program', *Nucleic Acids Res*, 48: 116-29.
- Wolkowicz, U. M., and A. G. Cook. 2012. 'NF45 dimerizes with NF90, Zfr and SPNR via a conserved domain that has a nucleotidyltransferase fold', *Nucleic Acids Res*, 40: 9356-68.
- Wong, R. W., C. A. Lingwood, M. A. Ostrowski, T. Cabral, and A. Cochrane. 2018. 'Cardiac glycoside/aglycones inhibit HIV-1 gene expression by a mechanism requiring MEK1/2-ERK1/2 signaling', *Sci Rep*, 8: 850.
- Xu, Z., H. Huang, X. Li, C. Ji, Y. Liu, X. Liu, J. Zhu, Z. Wang, H. Zhang, and J. Shi. 2020. 'High expression of interleukin-enhancer binding factor 3 predicts poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma', *Oncol Lett*, 19: 2141-52.
- Xu, Z., F. Wang, F. Fan, Y. Gu, N. Shan, X. Meng, S. Cheng, Y. Liu, C. Wang, Y. Song, and R. Xu. 2015. 'Quantitative Proteomics Reveals That the Inhibition of Na(+)/K(+)-ATPase Activity Affects S-Phase Progression Leading to a Chromosome Segregation Disorder by Attenuating the Aurora A Function in Hepatocellular Carcinoma Cells', *J Proteome Res*, 14: 4594-602.
- Zhang, W., Z. Xiong, T. Wei, Q. Li, Y. Tan, L. Ling, and X. Feng. 2018. 'Nuclear factor 90 promotes angiogenesis by regulating HIF-1alpha/VEGF-A expression through the PI3K/Akt signaling pathway in human cervical cancer', *Cell Death Dis*, 9: 276.
- Zhou, Q., Y. Zhu, X. Wei, J. Zhou, L. Chang, H. Sui, Y. Han, D. Piao, R. Sha, and Y. Bai. 2016. 'MiR-590-5p inhibits colorectal cancer angiogenesis and metastasis by regulating nuclear factor 90/vascular endothelial growth factor A axis', *Cell Death Dis*, 7: e2413.

4.10 Figures

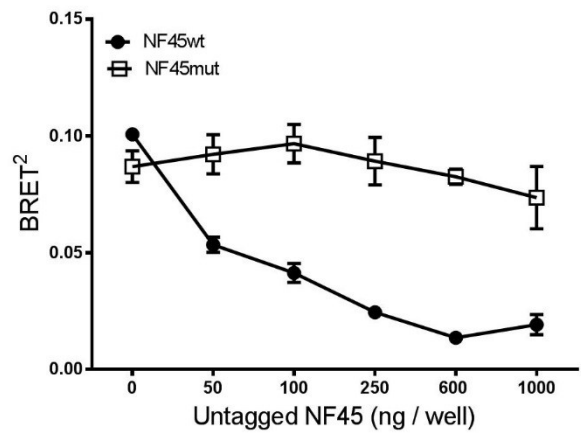
A



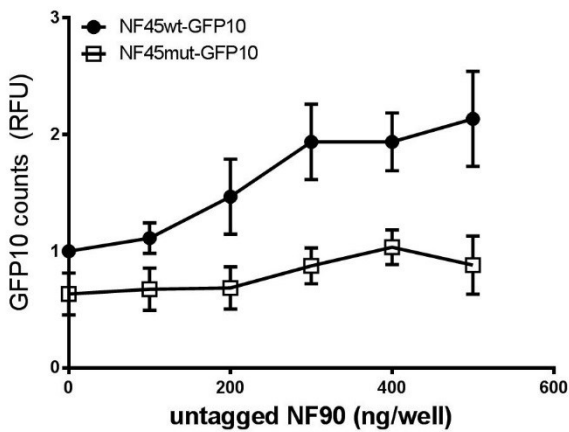
B



C



D



E

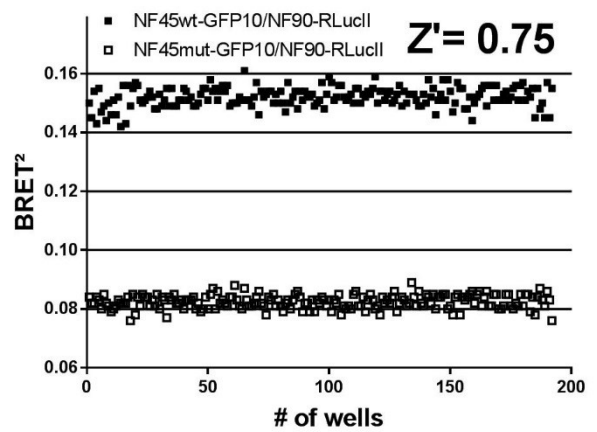


Figure 36. Development of BRET-based biosensor measuring NF45-NF90 interaction

(A) Illustration of NF45 and NF90 biosensor. NF45 and NF90 are respectively fused to GFP10 and Rluc (renilla luciferase) at their c-terminal extremity. Rluc bioluminescent (400 nm) activity is induced by the addition of coelenterazine *in situ*, and GFP10 can be excited within 10 nm

distance from Rluc. **(B)** HEK293T were transfected with NF45wt-GFP10 / NF90Rluc (black box) or NF45mut-GFP10 (D308R/R319E) / NF90Rluc (empty box) at different DNA:DNA ratio (GFP10/Rluc) Graph represent the mean +/- s.d. of three independent experiments. **(C)** HEK293T were co-transfected with NF45wt-GFP10 / NF90Rluc and different amount of untagged NF45wt (black circle) or NF45mut-GFP10 (D308R/R319E) (empty box). Graph represent the mean +/- s.d. of three independent experiments. **(D)** HEK293T were co-transfected with NF45wt-GFP10 (black circle) or NF45mut-GFP10 (D308R/R319E) and untagged NF90. Graph represent the mean +/- s.d. of three independent experiments. **(E)** Determination of Z' score of NF45-NF90 interaction by measurement of BRET² signals from NF45wt-GFP10 / NF90Rluc (black box) or NF45mut-GFP10 (D308R/R319E) / NF90Rluc (empty box) in 384 well plates.

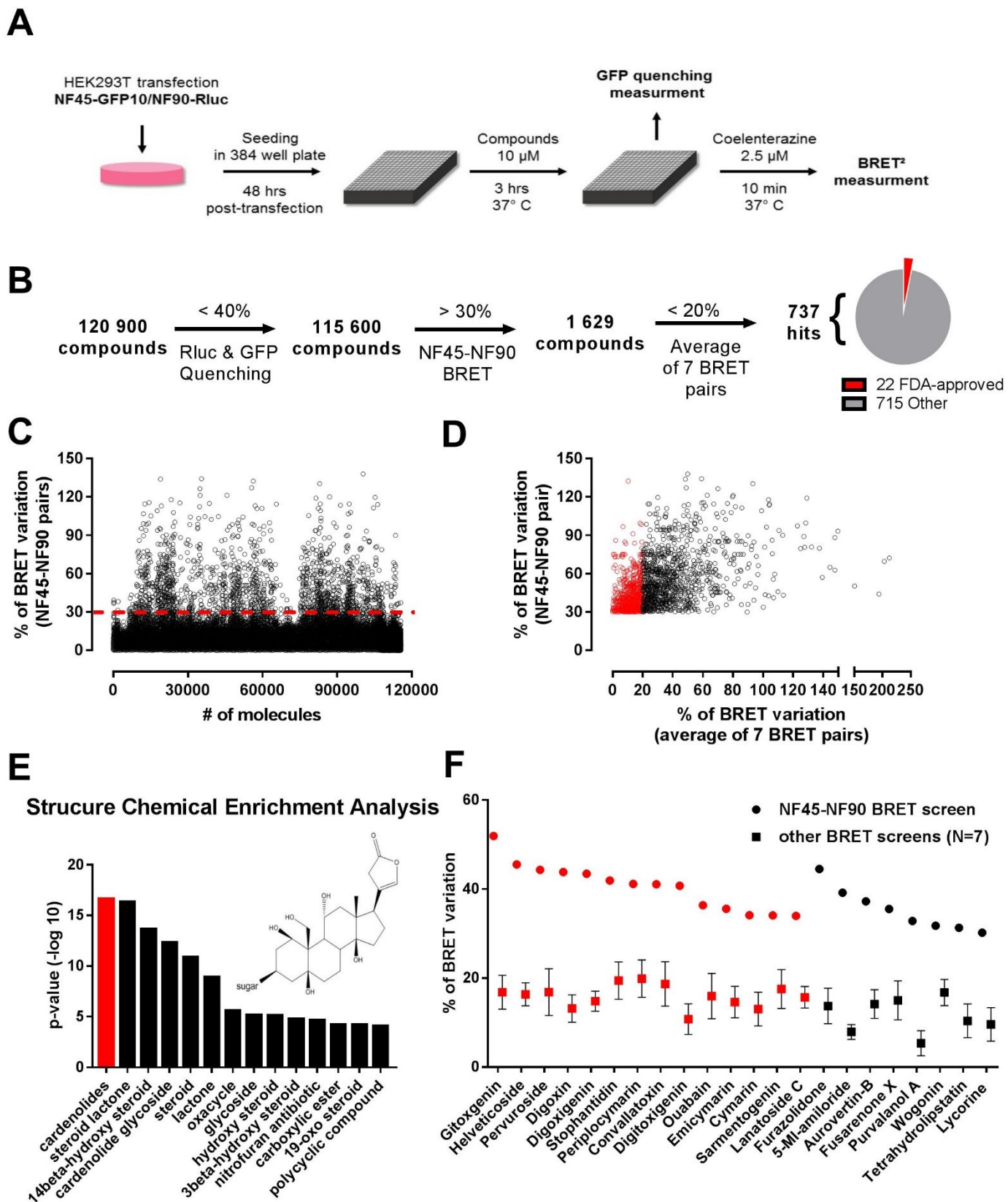
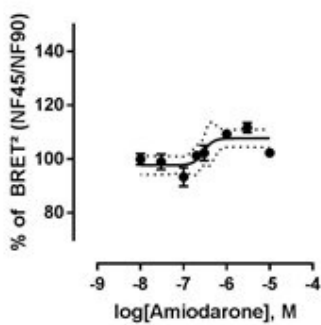
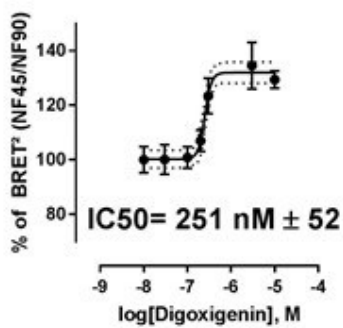
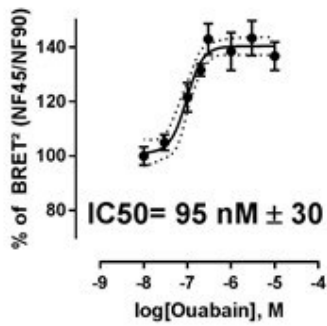
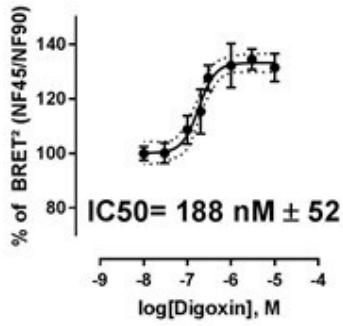
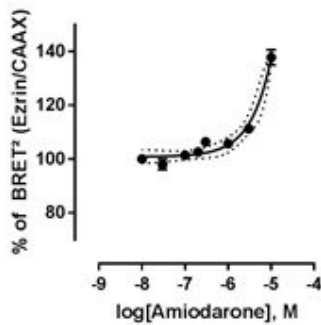
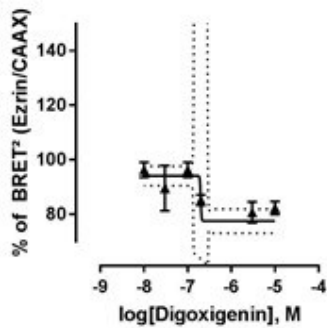
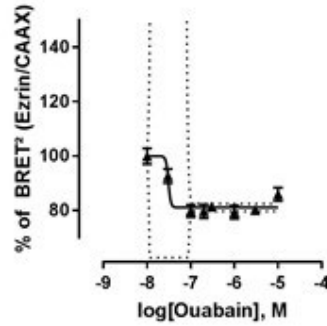
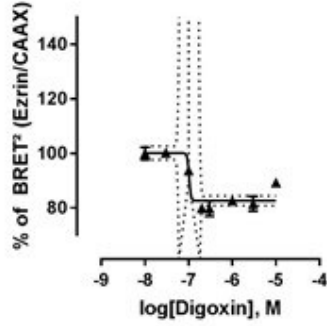
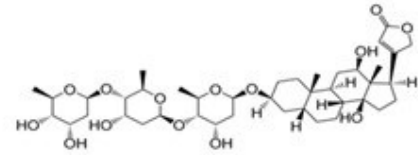


Figure 37. High-throughput small molecule screening of NF45-NF90.

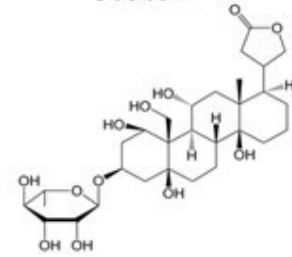
(A) Schematic representation of HTS protocol performed in NF45-GFP10/NF90-Rluc HEK293T expressing cells. **(B)** Hits selection pipeline. **(C)** % of BRET variation of the 115 600 compounds screened on NF45-GFP10/NF90-Rluc HEK293T expressing cells at 10 μ M. Red dashed line represent hit threshold >30%. **(D)** % of BRET variation of the 1 629 compounds (>30% BRET variation NF45-GFP10/NF90-Rluc pair) on average of BRET variation from 7 different BRET pairs screened previously. Red dots are compounds (737) with NF45/NF90 BRET >30% and average BRET variation from 7 other pairs <20%. **(E)** Structure chemical enrichment analysis of the 22 FDA-approved drugs identified in the HTS. Structural representation of common chemical groups of cardenolides family. **(F)** BRET variation of the 22 FDA-approved drugs in NF45-GFP10/NF90-Rluc HTS (dots) and the average from 7 different BRET pairs (box) HTS. Red symbol a compound that belong to cardenolide family.

A**B**

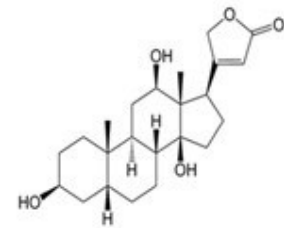
Digoxin



Ouabain



Digoxigenin



Amiodarone

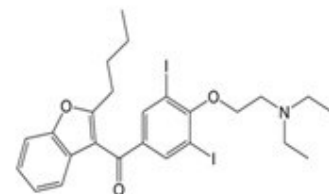


Figure 38. Dose dependent activity of Cardiac glycosides on NF45-NF90 BRET-based biosensors

(A) 8 doses (10 nM to 10 μ M) of drugs (digoxin, ouabain, digoxigenin, amiodarone) were incubated during 3 hours on NF45-GFP10/NF90-Rluc HEK293T expressing cells. Dose response curve were interpolated from experimental points using the four-parameter dose-response curve model. **(B)** 8 doses (10 nM to 10 μ M) of drugs (digoxin, ouabain, digoxigenin, amiodarone) were incubated during 3 hours on CaaX-GFP10/Ezrin-Rluc HEK293T expressing cells. Dose response curve were interpolated from experimental points using the four-parameter dose-response curve model.

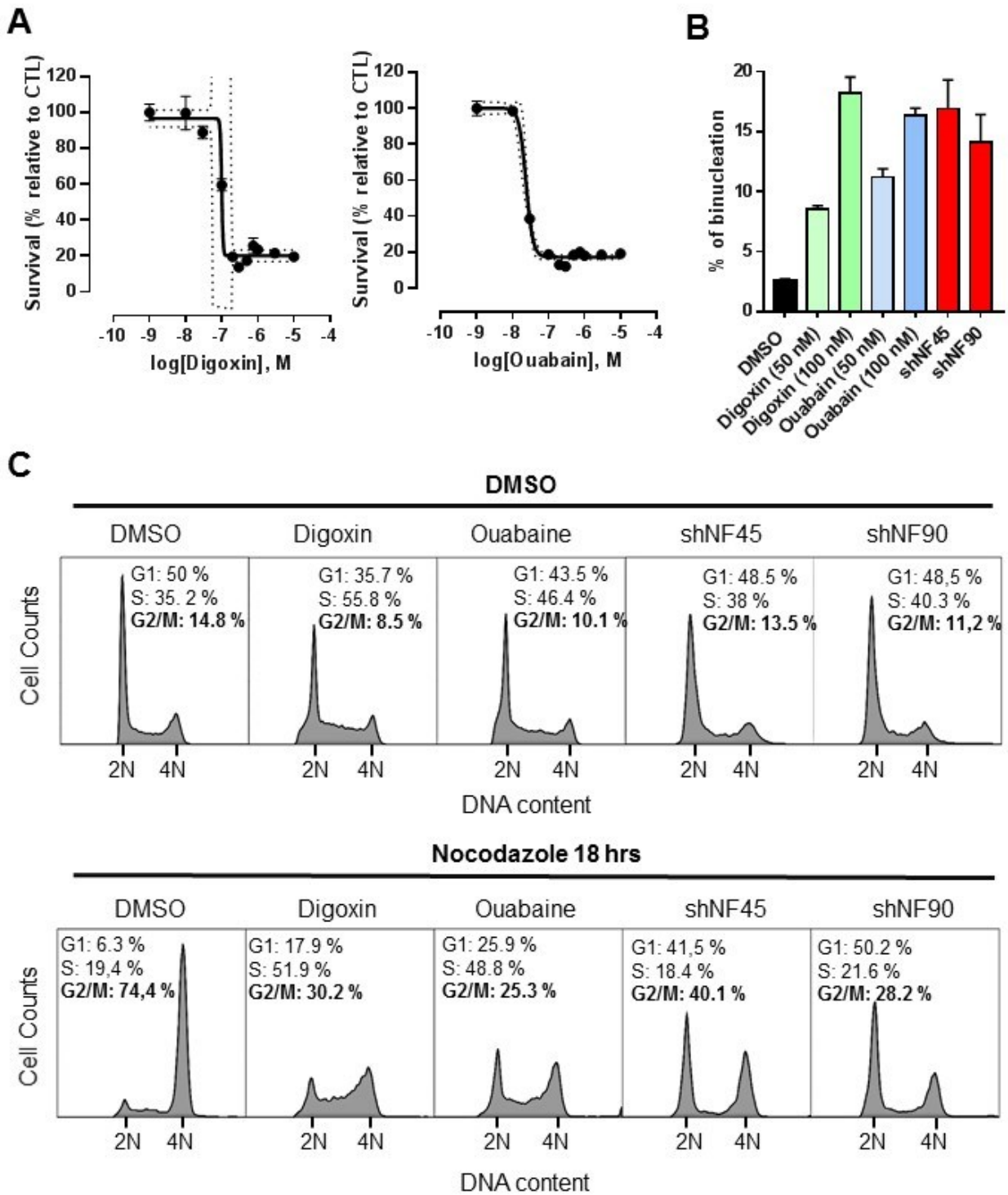


Figure 39. CGs treated cells display a similar mitotic phenotype to NF45 or NF90 knockdown.

(A) WST-1 assay of HeLa cells treated with Digoxin or Ouabain for 48 hours. **(B)** Percentage of binucleated HeLa cells treated with digoxin or ouabain at 50 nM and 100 nM for 48 hours

and HeLa cells NF45 or NF90 knockdown with shRNA. At least 500 cells per conditions were quantified. **(C, D)** Cell cycle distribution of HeLa cells treated with DMSO, digoxin (250 nM,) or ouabain (250 nM) for 18 hours and HeLa cells synchronized in G2/M with 18 hours nocodazole treatment and co-treated with either DMSO, digoxin (250 nM), or Ouabain (250 nM) quantified by flow cytometry. 10 000 cells per condition were quantified.

A

Chemical library	Number of compounds
Chembridge DiverSet	60000
Maybridge HitFinder™	16000
Maybridge	16000
SPECS	16000
Microsource Discovery Spectrum	2000
Biomol (natural products)	500
Prestwick (FDA-approved)	1120
SIGMA Lopac™	1280
UdeM	8000

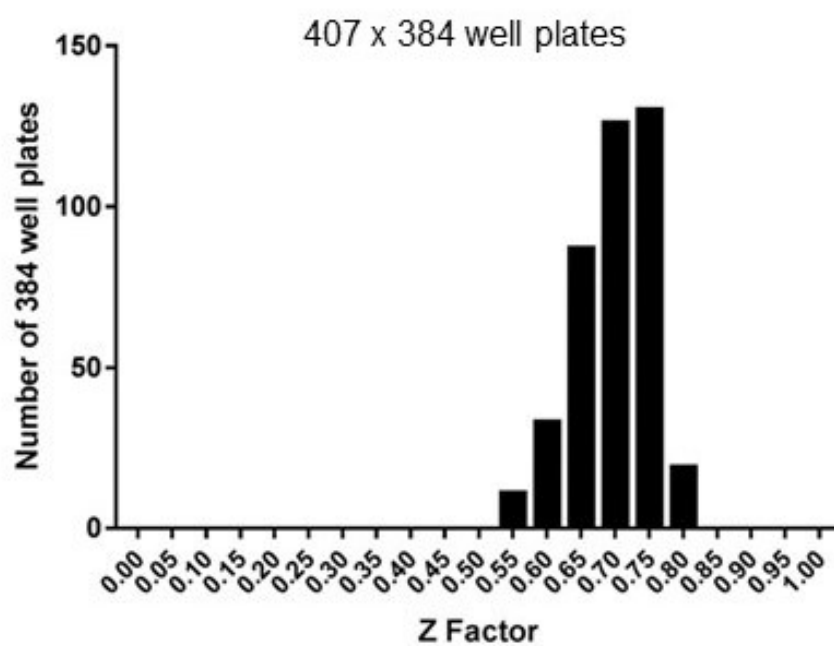
B

Figure 40. Chemical sub-libraries used in NF45/NF90 HTS and Z' distribution of the 384 well plates

(A) Table of the different chemical sub-libraries screened on NF45-NF90 BRET-based biosensor. **(B)** Distribution of the Z' value determined in each 384 well plate used to screen NF45-NF90 BRET-based biosensor.

A

	Digoxin		Ouabain		Digoxigenin		Amiodarone	
BRET pairs	NF90/ NF45	Ezrin/ CaaX	NF90/ NF45	Ezrin/ CaaX	NF90/ NF45	Ezrin/ CaaX	NF90/ NF45	Ezrin/ CaaX
IC50 (nM)	137 to 241	N/A	70 to 124	N/A	218 to 290	N/A	N/A	N/A
Hill slope	2.279	-20.48	2.315	-15.64	5.688	-46.77	3.802	0.9166
R ²	0.8769	0.8511	0.9003	0.8587	0.8872	0.6536	0.4312	0.9218
Adequate dose-response Model	Yes	No	Yes	No	Yes	No	No	No

Figure 41. Statistical values of CGs and amiodarone dose responses curve fitting

Table of dose responses curve fitting values obtained from graphpad prism 4 PL sigmoidal analyzing function.

5 Chapitre 5 : Discussion

5.1 Les rôles du complexe NF45-NF90, un nouveau régulateur post-transcriptionnel de la mitose

5.1.1 Régulation post-transcriptionnel de l'expression des ARNm mitotiques

Dans le chapitre 2, nous avons découvert que la déplétion de NF45 ou NF90 mène à d'importants défauts en mitose résultant d'une baisse d'expression de nombreux gènes mitotiques (Chapitre 2 ; Figure 3). Le complexe NF45-NF90 a la capacité d'affecter l'expression génique en agissant à différents niveaux de régulation (transcription, épissage, stabilité des ARNm, traduction). Afin d'identifier par quel mécanisme l'hétérodimère NF45-NF90 régule l'expression des gènes mitotiques, nous avons testé différents niveaux de régulation (Chapitre 2 ; Figures S1, S2, S3), et avons découvert que le complexe NF45-NF90 compétitionne avec le complexe de dégradation des ARNm dépendante de Staufen (SMD) (Chapitre 2 ; Figure 4). Ainsi, le complexe NF45-NF90 est un facteur clé dans le contrôle de l'expression des gènes mitotiques à l'échelle post-transcriptionnelle. De manière intéressante, une grande partie des gènes régulés par NF45-NF90 sont aussi des cibles du facteur de transcription FOXM1 (Figure 1). D'autre part, nous avons observé que l'activité transcriptionnelle de FOXM1 n'est pas affectée lorsque l'expression de NF45 ou NF90 est modulée dans les cellules (Chapitre 2 ; Figure 3, S3). De ce fait, il serait intéressant d'étudier plus précisément l'interconnexion existante entre la régulation transcriptionnelle dépendante de FOXM1 et post-transcriptionnelle de l'hétérodimère NF45-NF90 sur les gènes périodiques de la phase G2/M.

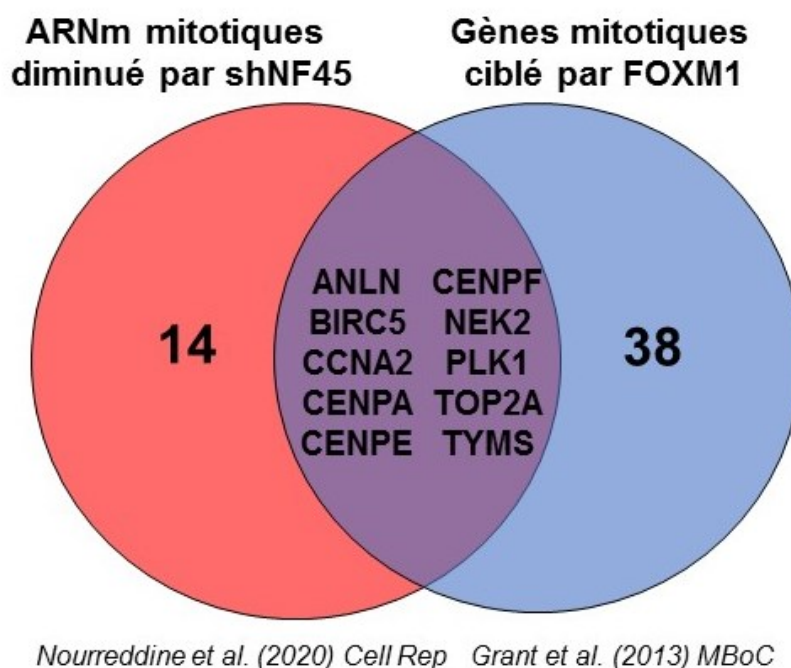


Figure 42. Gènes cible du cycle cellulaire communs entre NF45 et FOXM1 (Grant et al. 2013)

L'analyse corrélative des données TCGA entre l'expression de plus de 600 RBP et les ARNm ayant des fonctions dans le cycle cellulaire, nous a permis d'identifier 39 RBP potentiellement impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (Chapitre 2 ; Figure 1A). Parmi elles, nous avons retrouvé des RBP déjà connus pour leurs rôles dans le cycle cellulaire, tel que HuR/ELAVL1, YBX1 et DDX3X (Kotake et al., 2017 ; Lai et al., 2010 ; Wang et al., 2000), et avons poursuivi NF45/*ILF2* et NF90/*ILF3*. De manière intéressante, la plupart des autres RBP identifiés ont des fonctions dans l'épissage, ou dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique (Figure 2). Par exemple, la Roquin-2/*RC3H2*, une RBP disposant d'une activité ubiquitine ligase dépendante à la liaison d'ARNdb est par ailleurs capable d'induire la déadenylation de certains ARNm (Zhang et al. 2015). La liaison directe de la Roquin-2 aux ARNm comme ceux du *TNF- α* , ou encore de *ICOS* (*Inducible T-cell COStimulator*) induit leurs dégradations et réprime la réponse inflammatoire des cellules T (Pratama et al. 2013). Au vu de la corrélation significative existante entre la Roquin-2/*RC3H2*

et l'expression des gènes périodique du cycle cellulaire (Chapitre 2 ; Figure 1A), il serait intéressant de tester sa fonction dans le contexte du cycle cellulaire similairement à l'étude réalisé sur NF45-NF90.

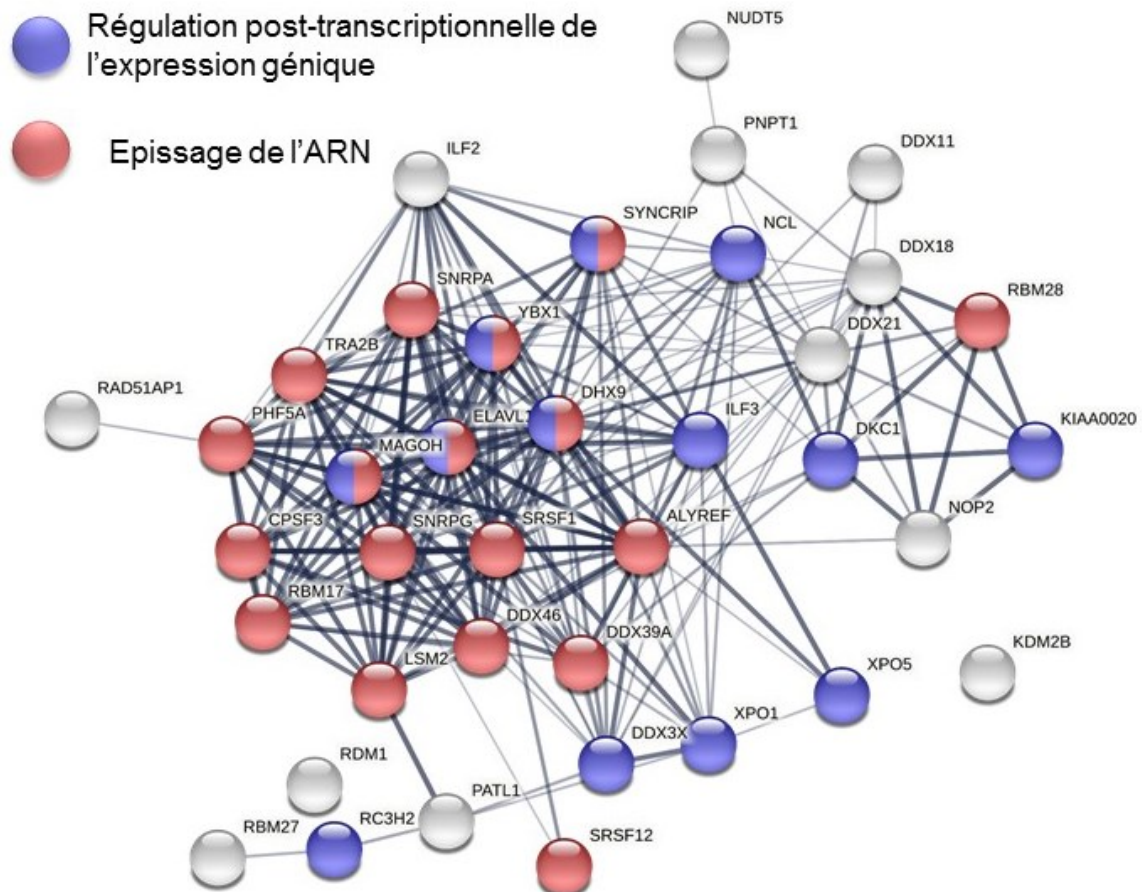


Figure 43. Représentation du réseau STRING d'interaction des RBP dont l'expression corrèle avec les gènes périodiques du cycle cellulaire (Nourredine et al. 2020)

5.1.2 Interactome du complexe NF45-NF90

5.1.2.1 L'interaction fonctionnelle avec les RBP à domaine dsRBD

Dans le chapitre 2, nous avons identifié les interacteurs de proximités potentiels du complexe NF45-NF90 en utilisant la technique de BioID (Chapitre 2 ; Figure 4). Dans cette analyse, on retrouve des interacteurs connus tel que PKR, ADAR ou encore plusieurs

protéines hnRNP validant ainsi notre approche (Saunders et al. 2001; Chaumet et al. 2013; Nie et al. 2005). Grâce à cette analyse de BioID, nous avons pu découvrir de nouveaux partenaires du complexe NF45-NF90, soit les protéines Stau1/2 et UPF1. L'interaction entre NF45-NF90 et Stau1-UPF1 est médiée par l'intermédiaire des ARN cellulaire puisqu'un traitement des lysats cellulaires avec une RNase mène à une perte de la co-immunoprécipitation entre NF45-NF90 et Stau1-UPF1 (Chapitre 2 ; Figure 4C). Cette dépendance aux ARN suggère que NF45-NF90 et Stau1-UPF1 partagent un tropisme pour certains ARN dans la cellule, ce qui les amèneraient potentiellement à proximité dans la cellule. En effet, NF90 et Stau1 sont tous deux composés de domaines dsRBD et peuvent donc avoir des ARN cibles communs, comme nous l'avons démontré pour la régulation des gènes mitotiques. Chez l'homme, il existe seulement une dizaine de protéines constituées de domaines dsRBD. Au cours des dernières années, de plus en plus d'études ont rapporté des liens biologiques et mécanistiques entre les protéines à dsRBD. Par exemple, sous conditions de stress cellulaire induites par des radiations UV, la protéine ADAR, qui contient 3 dsRBD, protège les cellules de l'apoptose en stabilisant les ARNm codant pour des protéines anti-apoptotiques (Sakurai et al. 2017). De façon similaire à la compétition existante entre NF90 et Stau1, ADAR entre en compétition avec Stau1 pour lier les ARNm anti-apoptotiques. Plus largement, dans des conditions de culture cellulaire basales, NF90 a été identifié comme un régulateur négatif important de l'activité désaminase d'ADAR, et cette inhibition est dépendante des domaines dsRBD de NF90 (Freund et al. 2020). L'activité désaminase d'ADAR, qui transforme des adénosines des ARN en inosine, a été récemment impliqué dans un des mécanismes de résistance des cancers envers les thérapies ciblant les points de contrôle immunitaire (Ishizuka et al. 2019). Dans les cellules cancéreuses, ADAR conditionne la réponse inflammatoire aux interférons des cellules via l'activation de la kinase PKR, qui est aussi constituée de domaines dsRBD. D'autre part, NF90 est important pour l'activation de PKR particulièrement lors d'une activation via des ARN viraux (Wen et al. 2014). L'activité synergique ou antagoniste de ces protéines à domaines dsBRD semblent avoir un rôle important dans la réponse inflammatoire des cellules, cependant les relations entre ADAR,

NF90, et PKR dans le contexte de l'immunothérapie des cancers a été encore peu étudié. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1, NF90 est très souvent surexprimé dans les cancers (Chapitre 1 ; Figure 20). Par conséquent, il serait intéressant d'étudier la fonction NF90 dans la sensibilité aux inhibiteurs du point de contrôle immunitaire.

Une autre protéine à dsRBD intéressante que nous avons identifiée dans le BioID, mais seulement avec NF45-BirA, est la protéine DGCR8. DGCR8 est nécessaire à la maturation des miARN en liant les structures d'ARNdb dans le noyau et en dirigeant DROSHA pour cliver les pri-miARN en pre-miARN (Nguyen et al. 2015; Kwon et al. 2016). Par ailleurs, le complexe NF45-NF90 affecte négativement la maturation des miARN, et provoque l'accumulation de pri-miARN lorsqu'ils sont surexprimés (Sakamoto et al. 2009). Dans cette étude, les auteurs ont conclu que DGCR8/DROSHA n'interagissaient pas avec NF45-NF90. Etant donné le lien étroit entre les protéines à dsRBD et l'identification de DGCR8 dans le BioID, il serait tout de même intéressant de tester l'hypothèse d'une compétition entre NF45-NF90 et DGCR8 pour la liaison de certains pri-miARN.

5.1.2.2 L'interaction de proximité avec les protéines du spliceosome

Parmi les protéines de proximité identifiées dans l'analyse du BioID de NF45-NF90, plusieurs sont impliqués dans l'épissage et appartiennent au complexe du spliceosome (Chapitre 2 ; Figure 4A). Le spliceosome est un grand complexe constitué de plus de 150 protéines et de snARN qui orchestre l'épissage des pre-ARNm (Will and Luhrmann 2011). Dans notre analyse des interacteurs potentiel du complexe NF45-NF90, on retrouve 19 protéines appartenant au spliceosome. Ces résultats concordent avec ceux réalisés dans l'étude de Marchesini et al. où ils ont identifié des interacteurs de NF45 par immunoprécipitation suivis de spectrométrie de masse (IP-MS) (Marchesini et al. 2017). Parmi les 19 protéines du spliceosome identifiés dans l'interactome que nous avons effectué, 10 d'entre elles sont aussi retrouvés dans l'étude d'IP-MS de Marchesini et al. (Figure 3). Les auteurs ont établi un lien fonctionnel entre NF45 et YB-1 dans l'épissage des gènes codants pour la réponse aux dommages à l'ADN, cependant le

rôle de NF90 dans l'épissage n'a pas été déterminé dans cette étude. Dans nos expériences de BioID, nous avons aussi établi l'interactome de NF45 et NF90 avec une mutation dans leurs domaines DZF respectifs qui empêchent leur interaction mutuelle (Chapitre 2 ; Figure 4A). Tandis que l'interactome du mutant NF90 demeure quasiment inchangé, celui du mutant NF45 diverge totalement de l'interactome du complexe NF45/NF90. Ceci suggère une dépendance de NF45 à NF90 pour interagir avec certaines protéines, dont certaines impliquées dans l'épissage. Par exemple les protéines identifiées du spliceosome tel que U2AF1, Slu7, RBMX, SRSF3, SYNCRIP et disposent de fonctions majeures dans les processus d'épissage (Zuo and Maniatis 1996 ; Chua and Reed 1999 ; Heinrich et al. 2009 ; Xiao et al. 2016 ; Jurica et al. 2002). Ainsi, il serait intéressant d'étudier plus précisément le rôle du complexe NF45-NF90 sur les fonctions moléculaires des protéines du spliceosome et caractériser plus précisément l'implication de NF90 dans ces processus.

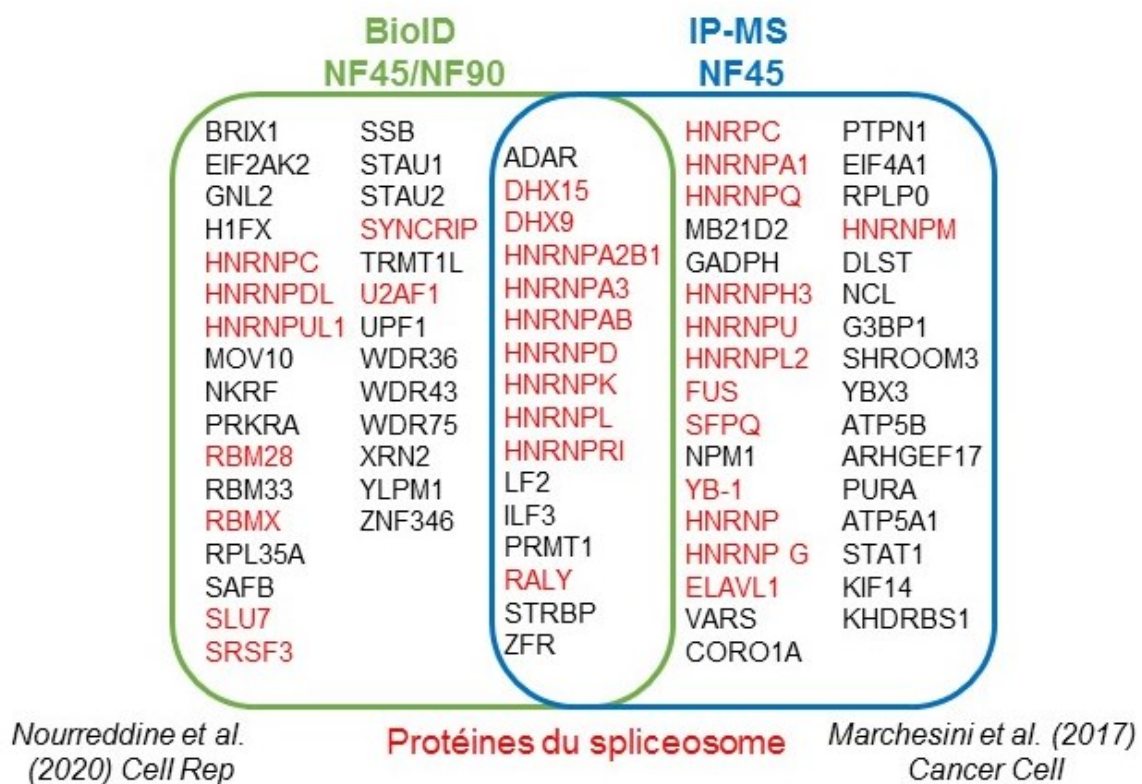


Figure 44. Interacteurs protéiques potentiels issus du BioID NF45-NF90 et de l'IP-MS NF45
(Marchesini et al. 2017)

5.2 Phosphorylation de NF90 par la protéine kinase CDK1

5.2.1 La phosphorylation de NF90 en G2/M

Dans le chapitre 3, nous avons découvert qu'au cours de la progression du cycle cellulaire, NF90 devient phosphorylé autour des phases G2/M (Chapitre 3 ; Figure 1). Cette phosphorylation est marquée par un retard de migration visible (~ 5-10 kDa) de la bande correspondante à NF90 en western blot lorsque les cellules sont synchronisées en mitose. Par ailleurs, cette modification post-traductionnelle se détecte aussi avec l'anticorps MPM2, qui détecte des serines ou thréonines phosphorylées en mitose (Zhao et al. 1989). En utilisant différents inhibiteurs pharmacologiques de kinases actives en mitose, nous avons observé que l'inhibition de CDK1 corrèle avec la perte de phosphorylation de NF90 en mitose (Chapitre 3 ; Figure 2), et que CDK1 pouvait phosphoryler directement NF90 sur la Thr368 (Chapitre 4 ; Figure 3). Lorsque ce site est muté en alanine (T368A ; mutant non phosphorylable), les signaux de l'anticorps MPM2 ainsi que la bande mitotique de NF90 disparaissent. L'activité de CDK1, provoquée soit par l'entrée des cellules en mitose ou par la surexpression d'une forme active (CDK1^{AF}), corrèle avec l'export de NF90 vers le cytoplasme (Chapitre 3 ; Figure 4A, B). De manière intéressante, la Thr368 de NF90 est située à proximité d'une séquence NLS, cependant sa mutation en alanine ou acide aspartique ne semble pas affecter la distribution nucléocytoplasmique de NF90 en condition basale et synchronisée (Chapitre 3 ; Figure S1). Ainsi, ces résultats suggèrent que NF90 n'est pas uniquement phosphorylé en Thr368 et CDK1 mais aussi d'autres pourraient phosphoryler d'autres sites en mitoses. Il serait intéressant de réaliser une étude de phospho-protéomique sur NF90 purifié de cellules en interphase et en mitose pour déterminer d'autres sites mitotiques potentiels. Ceci nous amènerait à pouvoir mieux étudier le rôle de ces phosphorylations sur les fonctions du complexe NF45-NF90 et nous amené à découvrir une nouvelle voie de régulation du cycle cellulaire.

5.2.2 Fonction potentielle de la phosphorylation de NF90 en G2/M

Lorsque les cellules sont synchronisées en phase G2/M, nous avons retrouvé que l'ARNm de CDK1 est plus fortement associé à NF90, comparativement à des cellules asynchrones (Chapitre 3 ; Figure 4C). Nous avons vu précédemment que NF45-NF90 pouvait contrôler l'expression de CDK1 au niveau post-transcriptionnel (Chapitre 2). D'autre part, CDK1 fait partie des ARNm les plus différentiellement exprimés en phase G2/M (Santos, Wernersson, and Jensen 2015). Ainsi, la phosphorylation de CDK1 sur NF90 pourrait potentiellement affecter sa propre expression en promouvant l'export de NF90 vers le cytoplasme et la stabilisation du transcrite de CDK1. Ce mécanisme potentiel fait appel à une boucle de rétrocontrôle positive de l'activation de CDK1 nécessaire à la transition de la phase G2 à la phase M. En début de phase G2, quand la cycline B commence à s'exprimer puis s'associe à CDK1, cette dernière inactive Wee1, qui est une kinase inhibitrice de CDK1 en interphase (Harvey et al. 2005). Parallèlement, CDK1 active la phosphatase CDC25 qui favorise la forme active de CDK1 (Timofeev et al. 2010). Pour entrer en mitose, la cellule a besoin d'une forte activité de CDK1, et ainsi, le mécanisme d'activation par rétrocontrôle positif assure une entrée irréversible en mitose (Gavet and Pines 2010). Bien que les mécanismes post-traductionnels d'activation de CDK1 aient été largement étudiés, la variation d'expression de CDK1 au cours du cycle cellulaire demeure encore peu caractérisée.

5.3 Identifications des molécules ciblant l'interaction entre NF45 et NF90

5.3.1 Les glycosides cardiaques

Dans le chapitre 4, nous avons optimisé un biosenseur de l'interaction entre NF45 et NF90 en utilisant la technique du BRET (Chapitre 4 ; Figure 1). Le BRET consiste au transfert de lumière émise par la luciférase (NF90-Luc) à une protéine fluorescente comme la GFP (NF45-GFP) lorsqu'elles sont à proximité l'une de l'autre (<10 nm). Cette technique nous permet de mesurer l'interaction entre les formes exogènes de NF45 et NF90 dans des cellules vivantes, nous permettant de réaliser un criblage à haut débit de 120 900 molécules. Nous avons ainsi identifié autour de 1500 molécules qui affectent le signal BRET de plus de 30 %. Nous nous sommes focalisés sur les 22 composés ayant déjà été testés chez l'humain (Chapitre 4 ; Figure 2). Parmi ceux-ci, 14 sont des glycosides cardiaques, suggérant que cette famille interfère avec l'interaction NF45-NF90. Nous avons ensuite validé leurs effets et leurs spécificités pour NF45/90, en comparant l'effet-dose réponse de 3 analogues (digoxine, digoxigénine et ouabaine) sur des cellules exprimant soit les constructions BRET NF45/NF90 ou CaaX/Ezrin comme contrôle de spécificité (Chapitre 4 ; Figure 3). D'autre part, nous avons observé que le traitement avec la digoxine ou la ouabaine induit des défauts mitotiques de façon similaire à la déplétion de NF45 ou NF90 par ARNi (Chapitre 4 ; Figure 4). La cible principale des glycosides cardiaques est la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$. Pour cette raison, ces drogues sont utilisées en clinique pour traiter les arythmies cardiaques (Digitalis Investigation 1997). Néanmoins, au cours des deux dernières décennies, de plus en plus d'études ont caractérisé leurs rôles anticancéreux et antiviraux (Reddy et al. 2020). Il existe plus de 2000 publications contenant les termes « glycosides cardiaques » et « cancer ». Bon nombre de ces études ont observé des défauts de progression du cycle cellulaire dans des lignées cancéreuses traitées avec des glycosides cardiaques et de façon indépendante de leurs effets sur la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$. Par exemple, Busonero et al. ont montré que le traitement de cellules de cancer du sein avec de la digoxine ou ouabaine provoque un arrêt du cycle cellulaire en phase G2, et ceci, indépendamment de l'inhibition de la pompe à sodium (Busonero et al. 2020). De plus, la digoxine a été identifiée comme inhibiteur de l'expression de

BIRC5 dans un criblage de molécules sur une lignée de cancer du pancréas (Liu et al. 2020). Dans le chapitre 2, nous avons montré que le complexe NF45-NF90 pouvait aussi réguler l'expression de *BIRC5* (Chapitre 2 ; Figure 3). Ainsi, il se pourrait que l'effet des glycosides cardiaques sur le cycle cellulaire soit en partie médié par une inhibition de l'interaction du complexe NF45-NF90. Cependant plusieurs expériences complémentaires seront nécessaires pour répondre à cette hypothèse. Premièrement, il faudrait tester si les glycosides cardiaques ciblent directement le complexe NF45-NF90, en faisant des expériences de thermostabilité de NF45/90 en présence de glycosides cardiaques. Cette expérience pour être complété avec une analyse *in silico* de *docking* entre différent analogue des glycosides cardiaques sur la structure des domaines DZF de NF45 et NF90. Deuxièmement, il faudrait déterminer si la modulation de l'expression de NF45/90 affecte l'effet des glycosides cardiaques sur l'expression des gènes du cycle cellulaire. Et enfin, il faudrait examiner la réponse antiproliférative des glycosides cardiaques selon les niveaux d'expression endogène de NF45/90 dans un panel de lignées cellulaires. En conclusion, les glycosides cardiaques ont des activités biologiques intéressantes pour le traitement des tumeurs, mais ces composés disposent d'un index thérapeutique très étroit qui limite leurs utilisations vers d'autres indications potentielles. Ainsi l'identification de facteurs pouvant affecter leur effet antiprolifératif est d'intérêt, et pourrait permettre la stratification des patients pour la mise au point de futurs essais cliniques étudiant l'efficacité des glycosides cardiaque dans le traitement des cancers.

5.3.2 Les autres inhibiteurs potentiel du complexe NF45-NF90

L'analyse des données du criblage nous a conduit à l'identification d'environ de 1500 molécules capables d'affecter le signal BRET de NF45-NF90 de plus de 30 % (Chapitre 4 ; Figure 2). Dans le but de limiter le nombre de faux positifs, nous avons affiné notre analyse en intersectant nos résultats sur les signaux BRET de NF45-NF90 de chaque molécule avec ceux obtenu dans d'autres criblages sur 7 différentes sondes BRET. Ainsi nous avons pu éliminer plus de 700 molécules qui avaient des effets importants sur les autres sondes BRET,

suggérant un effet non-spécifique sur le biosenseur NF45-NF90. En effet, le BRET est dépendant des signaux de luminescence et de fluorescence, ainsi toutes molécules ayant la propriété d'émettre ou d'interférer à ces longueurs d'ondes à la capacité d'affecter le signal de BRET. Par conséquent, il serait intéressant de mettre au point un essai de criblage secondaire mesurant l'interaction entre NF45 et NF90 avec une autre technique, tel que la polarisation de fluorescence. Cette méthode est basée sur la mesure de la rotation moléculaire et permet de quantifier l'association et la dissociation entre deux protéines en solution dont l'une des deux est marqué avec une protéine fluorescente. Ainsi cette approche permettrait d'éliminer un plus grand nombre de faux positifs, et nous amènerait à valider des inhibiteurs potentiels du complexe NF45-NF90 qui pourront être caractérisé de façon plus approfondie sur l'interaction entre NF45 et NF90.

6 Conclusion

L'hétérodimère NF45-NF90 est impliqué dans la régulation de fonctions biologiques très variées, mais le plus souvent reliées au contrôle de l'expression génique. Par sa capacité à lier des structures d'ARN, le complexe NF45-NF90 agit à presque tous les niveaux de la chaîne d'expression génique (épissage, stabilité des ARNm, traduction). Au cours des dernières années, de nombreuses études ont constaté leurs surexpressions dans plusieurs sous-types de cancer et la corrélation avec le statut prolifératif de ces derniers. Cependant, les mécanismes reliant NF45-NF90 et la prolifération demeurent encore peu caractérisés.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé le phénotype induit par la déplétion de NF45 ou NF90 et avons découvert d'importants défauts en mitose. Ces anomalies, induites par la perte d'expression de NF45/NF90, sont associées à une baisse d'expression d'un groupe de gènes (e.g. *CDK1*, *BIRC5*, *NUF2*, *CCNA2*) ayant des fonctions cruciales pour la division cellulaire. Dans le but de déceler le mécanisme qui prend place dans cette régulation, nous avons identifié l'interactome du complexe NF45/NF90 et découvert les protéines Stau1/2 comme de nouveaux interacteurs de proximité. Ainsi, nous avons mis en évidence un nouveau mécanisme dans lequel NF45/NF90 et Stau1/2 entrent en compétition pour la liaison de certains ARNm mitotiques, conditionnant leurs niveaux d'expression et le bon déroulement de la mitose. Dans une seconde étude, nous avons étudié la régulation de NF45 et NF90 au cours du cycle cellulaire et découvert une nouvelle phosphorylation sur NF90 se produisant durant les phases G2/M. Cette phosphorylation est médiée par CDK1 et son niveau corrèle avec la translocation de NF90 dans le cytoplasme. De plus, cet export est associé à une augmentation de la liaison de NF90 à l'ARNm codant pour *CDK1*, suggérant un nouveau mécanisme d'autorégulation de l'expression de *CDK1* via la phosphorylation de NF90. Enfin, dans une dernière étude nous avons mis au point un biosenseur BRET mesurant l'interaction entre NF45

et NF90 puis criblé une librairie de 120 000 molécules. Ce criblage à haut débit nous a permis d'identifier des centaines de molécules ciblant potentiellement l'interaction entre NF45 et NF90, et avons poursuivi l'étude sur une famille de molécules, les glycosides cardiaques. De façon intéressante, nous avons montré que le traitement des cellules avec les glycosides cardiaques mène à des défauts mitotiques très similaires à la déplétion de NF45 ou NF90, suggérant que l'effet antimitotique des glycosides cardiaque pourrait être provoqué par le ciblage de l'interaction entre NF45 et NF90.

Dans l'ensemble, les travaux de cette thèse mettent en lumière le mécanisme impliquant le complexe NF45-NF90 dans la prolifération cellulaire et permet de mieux comprendre le rôle de cet hétérodimère dans le développement tumoral. D'autre part, nous avons identifié de nombreuses molécules qui peuvent potentiellement affecter les fonctions de ce complexe, et qui pourraient avoir un intérêt thérapeutique dans le traitement des cancers.

7 Références

- Agarwal, M. L., A. Agarwal, W. R. Taylor, and G. R. Stark. 1995. 'p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 8493-7.
- Agbottah, E. T., C. Traviss, J. McArdle, S. Karki, G. C. St Laurent, 3rd, and A. Kumar. 2007. 'Nuclear Factor 90(NF90) targeted to TAR RNA inhibits transcriptional activation of HIV-1', *Retrovirology*, 4: 41.
- Agca, C., K. Boldt, A. Gubler, I. Meneau, A. Corpet, M. Samardzija, M. Stucki, M. Ueffing, and C. Grimm. 2015. 'Expression of leukemia inhibitory factor in Muller glia cells is regulated by a redox-dependent mRNA stability mechanism', *BMC Biol*, 13: 30.
- Aguilera, A., and B. Gomez-Gonzalez. 2008. 'Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences', *Nat Rev Genet*, 9: 204-17.
- Ambros, V. 2004. 'The functions of animal microRNAs', *Nature*, 431: 350-5.
- Antonin, W., and H. Neumann. 2016. 'Chromosome condensation and decondensation during mitosis', *Curr Opin Cell Biol*, 40: 15-22.
- Atherton-Fessler, S., L. L. Parker, R. L. Geahlen, and H. Piwnica-Worms. 1993. 'Mechanisms of p34cdc2 regulation', *Mol Cell Biol*, 13: 1675-85.
- Auweter, S. D., F. C. Oberstrass, and F. H. Allain. 2006. 'Sequence-specific binding of single-stranded RNA: is there a code for recognition?', *Nucleic Acids Res*, 34: 4943-59.
- Avruch, J., X. Long, S. Ortiz-Vega, J. Rapley, A. Papageorgiou, and N. Dai. 2009. 'Amino acid regulation of TOR complex 1', *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296: E592-602.
- Bai, J., Y. Li, and G. Zhang. 2017. 'Cell cycle regulation and anticancer drug discovery', *Cancer Biol Med*, 14: 348-62.
- Ballabeni, A., M. Melixetian, R. Zamponi, L. Masiero, F. Marinoni, and K. Helin. 2004. 'Human geminin promotes pre-RC formation and DNA replication by stabilizing CDT1 in mitosis', *EMBO J*, 23: 3122-32.

- Barbier, J., X. Chen, G. Sanchez, M. Cai, M. Helmsmoortel, T. Higuchi, P. Giraud, X. Contreras, G. Yuan, Z. Feng, R. Nait-Saidi, O. Deas, L. Bluy, J. G. Judde, S. Rouquier, W. Ritchie, S. Sakamoto, D. Xie, and R. Kiernan. 2018. 'An NF90/NF110-mediated feedback amplification loop regulates dicer expression and controls ovarian carcinoma progression', *Cell Res*, 28: 556-71.
- Bartkova, J., B. Gron, E. Dabelsteen, and J. Bartek. 2003. 'Cell-cycle regulatory proteins in human wound healing', *Arch Oral Biol*, 48: 125-32.
- Beier, R., A. Burgin, A. Kiermaier, M. Fero, H. Karsunky, R. Saffrich, T. Moroy, W. Ansorge, J. Roberts, and M. Eilers. 2000. 'Induction of cyclin E-cdk2 kinase activity, E2F-dependent transcription and cell growth by Myc are genetically separable events', *EMBO J*, 19: 5813-23.
- Bertoli, C., J. M. Skotheim, and R. A. de Bruin. 2013. 'Control of cell cycle transcription during G1 and S phases', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14: 518-28.
- Bertomeu, T., J. Coulombe-Huntington, A. Chatr-Aryamontri, K. G. Bourdages, E. Coyaud, B. Raught, Y. Xia, and M. Tyers. 2018. 'A High-Resolution Genome-Wide CRISPR/Cas9 Viability Screen Reveals Structural Features and Contextual Diversity of the Human Cell-Essential Proteome', *Mol Cell Biol*, 38.
- Besson, A., H. C. Hwang, S. Cicero, S. L. Donovan, M. Gurian-West, D. Johnson, B. E. Clurman, M. A. Dyer, and J. M. Roberts. 2007. 'Discovery of an oncogenic activity in p27Kip1 that causes stem cell expansion and a multiple tumor phenotype', *Genes Dev*, 21: 1731-46.
- Bork, P., A. K. Downing, B. Kieffer, and I. D. Campbell. 1996. 'Structure and distribution of modules in extracellular proteins', *Q Rev Biophys*, 29: 119-67.
- Bortz, E., L. Westera, J. Maamary, J. Steel, R. A. Albrecht, B. Manicassamy, G. Chase, L. Martinez-Sobrido, M. Schwemmle, and A. Garcia-Sastre. 2011. 'Host- and strain-specific regulation of influenza virus polymerase activity by interacting cellular proteins', *MBio*, 2.

- Bradner, J. E., D. Hnisz, and R. A. Young. 2017. 'Transcriptional Addiction in Cancer', *Cell*, 168: 629-43.
- Bueno, M. J., and M. Malumbres. 2011. 'MicroRNAs and the cell cycle', *Biochim Biophys Acta*, 1812: 592-601.
- Busonero, C., S. Leone, F. Bianchi, E. Maspero, M. Fiocchetti, O. Palumbo, M. Cipolletti, S. Bartoloni, and F. Acconcia. 2020. 'Ouabain and Digoxin Activate the Proteasome and the Degradation of the ERalpha in Cells Modeling Primary and Metastatic Breast Cancer', *Cancers (Basel)*, 12.
- Bycroft, M., T. J. Hubbard, M. Proctor, S. M. Freund, and A. G. Murzin. 1997. 'The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold', *Cell*, 88: 235-42.
- Calderon-Montano, J. M., E. Burgos-Moron, M. L. Orta, D. Maldonado-Navas, I. Garcia-Dominguez, and M. Lopez-Lazaro. 2014. 'Evaluating the cancer therapeutic potential of cardiac glycosides', *Biomed Res Int*, 2014: 794930.
- Carlton, J. G., A. Caballe, M. Agromayor, M. Kloc, and J. Martin-Serrano. 2012. 'ESCRT-III governs the Aurora B-mediated abscission checkpoint through CHMP4C', *Science*, 336: 220-5.
- Castella, S., R. Bernard, M. Corno, A. Fradin, and J. C. Larcher. 2015. 'Ilf3 and NF90 functions in RNA biology', *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 6: 243-56.
- Cerella, C., M. Dicato, and M. Diederich. 2013. 'Assembling the puzzle of anti-cancer mechanisms triggered by cardiac glycosides', *Mitochondrion*, 13: 225-34.
- Chang, K. Y., and A. Ramos. 2005. 'The double-stranded RNA-binding motif, a versatile macromolecular docking platform', *FEBS J*, 272: 2109-17.
- Chaumet, A., S. Castella, L. Gasmi, A. Fradin, G. Clodic, G. Bolbach, R. Poulhe, P. Denoulet, and J. C. Larcher. 2013. 'Proteomic analysis of interleukin enhancer binding factor 3 (Ilf3) and nuclear factor 90 (NF90) interactome', *Biochimie*, 95: 1146-57.

- Chen, Z., J. Lin, S. Wu, C. Xu, F. Chen, and Z. Huang. 2018. 'Up-regulated miR-548k promotes esophageal squamous cell carcinoma progression via targeting long noncoding RNA-LET', *Exp Cell Res*, 362: 90-101.
- Cheng, S., X. Jiang, C. Ding, C. Du, K. G. Owusu-Ansah, X. Weng, W. Hu, C. Peng, Z. Lv, R. Tong, H. Xiao, H. Xie, L. Zhou, J. Wu, and S. Zheng. 2016. 'Expression and Critical Role of Interleukin Enhancer Binding Factor 2 in Hepatocellular Carcinoma', *Int J Mol Sci*, 17.
- Civelekoglu-Scholey, G., and J. M. Scholey. 2010. 'Mitotic force generators and chromosome segregation', *Cell Mol Life Sci*, 67: 2231-50.
- Clemens, K. R., V. Wolf, S. J. McBryant, P. Zhang, X. Liao, P. E. Wright, and J. M. Gottesfeld. 1993. 'Molecular basis for specific recognition of both RNA and DNA by a zinc finger protein', *Science*, 260: 530-3.
- Collins, C. A., and C. Guthrie. 2000. 'The question remains: is the spliceosome a ribozyme?', *Nat Struct Biol*, 7: 850-4.
- Collins, R. E., and X. Cheng. 2005. 'Structural domains in RNAi', *FEBS Lett*, 579: 5841-9.
- Corthesy, B., and P. N. Kao. 1994. 'Purification by DNA affinity chromatography of two polypeptides that contact the NF-AT DNA binding site in the interleukin 2 promoter', *J Biol Chem*, 269: 20682-90.
- Cowley, S., H. Paterson, P. Kemp, and C. J. Marshall. 1994. 'Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells', *Cell*, 77: 841-52.
- Culjkovic-Kraljacic, B., and K. L. B. Borden. 2018. 'The Impact of Post-transcriptional Control: Better Living Through RNA Regulons', *Front Genet*, 9: 512.
- Dai, W., Q. Wang, T. Liu, M. Swamy, Y. Fang, S. Xie, R. Mahmood, Y. M. Yang, M. Xu, and C. V. Rao. 2004. 'Slippage of mitotic arrest and enhanced tumor development in mice with BubR1 haploinsufficiency', *Cancer Res*, 64: 440-5.

- Damianov, A., Y. Ying, C. H. Lin, J. A. Lee, D. Tran, A. A. Vashisht, E. Bahrami-Samani, Y. Xing, K. C. Martin, J. A. Wohlschlegel, and D. L. Black. 2016. 'Rbfox Proteins Regulate Splicing as Part of a Large Multiprotein Complex LASR', *Cell*, 165: 606-19.
- De Boulle, K., A. J. Verkerk, E. Reyniers, L. Vits, J. Hendrickx, B. Van Roy, F. Van den Bos, E. de Graaff, B. A. Oostra, and P. J. Willems. 1993. 'A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation', *Nat Genet*, 3: 31-5.
- De Guzman, R. N., Z. R. Wu, C. C. Stalling, L. Pappalardo, P. N. Borer, and M. F. Summers. 1998. 'Structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to the SL3 psi-RNA recognition element', *Science*, 279: 384-8.
- Deforz, E., T. R. Vargas, J. Kropp, M. Vandamme, G. Pinna, and A. Polesskaya. 2016. 'IMP-3 protects the mRNAs of cyclins D1 and D3 from GW182/AGO2-dependent translational repression', *Int J Oncol*, 49: 2578-88.
- Diffley, J. F., and K. Labib. 2002. 'The chromosome replication cycle', *J Cell Sci*, 115: 869-72.
- Digitalis Investigation, Group. 1997. 'The effect of digoxin on mortality and morbidity in patients with heart failure', *N Engl J Med*, 336: 525-33.
- Dobrikov, M. I., M. Shveygert, M. C. Brown, and M. Gromeier. 2014. 'Mitotic phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4G1 (eIF4G1) at Ser1232 by Cdk1:cyclin B inhibits eIF4A helicase complex binding with RNA', *Mol Cell Biol*, 34: 439-51.
- Dominski, Z., X. C. Yang, and W. F. Marzluff. 2005. 'The polyadenylation factor CPSF-73 is involved in histone-pre-mRNA processing', *Cell*, 123: 37-48.
- Doolittle, R. F. 1995. 'The multiplicity of domains in proteins', *Annu Rev Biochem*, 64: 287-314.
- Dowall, S. D., K. Bewley, R. J. Watson, S. S. Vasan, C. Ghosh, M. M. Konai, G. Gausdal, J. B. Lorens, J. Long, W. Barclay, I. Garcia-Dorival, J. Hiscox, A. Bosworth, I. Taylor, L. Easterbrook, J. Pitman, S. Summers, J. Chan-Pensley, S. Funnell, J. Vipond, S. Charlton, J. Haldar, R. Hewson, and M. W. Carroll. 2016. 'Antiviral Screening of Multiple Compounds against Ebola Virus', *Viruses*, 8.

- Drummond, D. R., J. Armstrong, and A. Colman. 1985. 'The effect of capping and polyadenylation on the stability, movement and translation of synthetic messenger RNAs in *Xenopus oocytes*', *Nucleic Acids Res*, 13: 7375-94.
- Du, Z., J. K. Lee, S. Fenn, R. Tjhen, R. M. Stroud, and T. L. James. 2007. 'X-ray crystallographic and NMR studies of protein-protein and protein-nucleic acid interactions involving the KH domains from human poly(C)-binding protein-2', *RNA*, 13: 1043-51.
- Duchange, N., J. Pidoux, E. Camus, and D. Sauvaget. 2000. 'Alternative splicing in the human interleukin enhancer binding factor 3 (ILF3) gene', *Gene*, 261: 345-53.
- Edmonds, M., and R. Abrams. 1960. 'Polynucleotide biosynthesis: formation of a sequence of adenylate units from adenosine triphosphate by an enzyme from thymus nuclei', *J Biol Chem*, 235: 1142-9.
- Fabian, M. R., N. Sonenberg, and W. Filipowicz. 2010. 'Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs', *Annu Rev Biochem*, 79: 351-79.
- Fasolo, F., L. Patrucco, M. Volpe, C. Bon, C. Peano, F. Mignone, P. Carninci, F. Persichetti, C. Santoro, S. Zucchelli, D. Sblattero, R. Sanges, D. Cotella, and S. Gustincich. 2019. 'The RNA-binding protein ILF3 binds to transposable element sequences in SINEUP lncRNAs', *FASEB J*, 33: 13572-89.
- Fededa, J. P., and D. W. Gerlich. 2012. 'Molecular control of animal cell cytokinesis', *Nat Cell Biol*, 14: 440-7.
- Finn, R. D., J. Mistry, B. Schuster-Bockler, S. Griffiths-Jones, V. Hollich, T. Lassmann, S. Moxon, M. Marshall, A. Khanna, R. Durbin, S. R. Eddy, E. L. Sonnhammer, and A. Bateman. 2006. 'Pfam: clans, web tools and services', *Nucleic Acids Res*, 34: D247-51.
- Fischer, M., P. Grossmann, M. Padi, and J. A. DeCaprio. 2016. 'Integration of TP53, DREAM, MMB-FOXM1 and RB-E2F target gene analyses identifies cell cycle gene regulatory networks', *Nucleic Acids Res*, 44: 6070-86.

- Foster, D. A., P. Yellen, L. Xu, and M. Saqcena. 2010. 'Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s)', *Genes Cancer*, 1: 1124-31.
- Freund, E. C., A. L. Sapiro, Q. Li, S. Linder, J. J. Moresco, J. R. Yates, 3rd, and J. B. Li. 2020. 'Unbiased Identification of trans Regulators of ADAR and A-to-I RNA Editing', *Cell Rep*, 31: 107656.
- Friedman, R. C., K. K. Farh, C. B. Burge, and D. P. Bartel. 2009. 'Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs', *Genome Res*, 19: 92-105.
- Gavet, O., and J. Pines. 2010. 'Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis', *Dev Cell*, 18: 533-43.
- Gebauer, F., and M. W. Hentze. 2004. 'Molecular mechanisms of translational control', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5: 827-35.
- Geuens, T., D. Bouhy, and V. Timmerman. 2016. 'The hnRNP family: insights into their role in health and disease', *Hum Genet*, 135: 851-67.
- Goel, S., M. J. DeCristo, S. S. McAllister, and J. J. Zhao. 2018. 'CDK4/6 Inhibition in Cancer: Beyond Cell Cycle Arrest', *Trends Cell Biol*, 28: 911-25.
- Gomila, R. C., G. W. Martin, and L. Gehrke. 2011. 'NF90 binds the dengue virus RNA 3' terminus and is a positive regulator of dengue virus replication', *PLoS One*, 6: e16687.
- Gopinathan, L., C. K. Ratnacaram, and P. Kaldis. 2011. 'Established and novel Cdk/cyclin complexes regulating the cell cycle and development', *Results Probl Cell Differ*, 53: 365-89.
- Greenman, C., P. Stephens, R. Smith, G. L. Dalgliesh, C. Hunter, G. Bignell, H. Davies, J. Teague, A. Butler, C. Stevens, S. Edkins, S. O'Meara, I. Vastrik, E. E. Schmidt, T. Avis, S. Barthorpe, G. Bhamra, G. Buck, B. Choudhury, J. Clements, J. Cole, E. Dicks, S. Forbes, K. Gray, K. Halliday, R. Harrison, K. Hills, J. Hinton, A. Jenkinson, D. Jones, A. Menzies, T. Mironenko, J. Perry, K. Raine, D. Richardson, R. Shepherd, A. Small, C. Tofts, J. Varian, T. Webb, S. West, S. Widaa, A. Yates, D. P. Cahill, D. N. Louis, P. Goldstraw, A. G. Nicholson, F. Brasseur, L. Looijenga, B. L. Weber, Y. E. Chiew, A.

- DeFazio, M. F. Greaves, A. R. Green, P. Campbell, E. Birney, D. F. Easton, G. Chenevix-Trench, M. H. Tan, S. K. Khoo, B. T. Teh, S. T. Yuen, S. Y. Leung, R. Wooster, P. A. Futreal, and M. R. Stratton. 2007. 'Patterns of somatic mutation in human cancer genomes', *Nature*, 446: 153-8.
- Gregory, R. I., K. P. Yan, G. Amuthan, T. Chendrimada, B. Doratotaj, N. Cooch, and R. Shiekhattar. 2004. 'The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs', *Nature*, 432: 235-40.
- Grishin, N. V. 2001. 'KH domain: one motif, two folds', *Nucleic Acids Res*, 29: 638-43.
- Grzybowska, E. A., A. Wilczynska, and J. A. Siedlecki. 2001. 'Regulatory functions of 3'UTRs', *Biochem Biophys Res Commun*, 288: 291-5.
- Guan, D., N. Altan-Bonnet, A. M. Parrott, C. J. Arrigo, Q. Li, M. Khaleduzzaman, H. Li, C. G. Lee, T. Pe'ery, and M. B. Mathews. 2008. 'Nuclear factor 45 (NF45) is a regulatory subunit of complexes with NF90/110 involved in mitotic control', *Mol Cell Biol*, 28: 4629-41.
- Guo, C., Y. Xue, G. Yang, S. Yin, W. Shi, Y. Cheng, X. Yan, S. Fan, H. Zhang, and F. Zeng. 2016. 'Nanog RNA-binding proteins YBX1 and ILF3 affect pluripotency of embryonic stem cells', *Cell Biol Int*, 40: 847-60.
- Guth, S., and J. Valcarcel. 2000. 'Kinetic role for mammalian SF1/BBP in spliceosome assembly and function after polypyrimidine tract recognition by U2AF', *J Biol Chem*, 275: 38059-66.
- Gwinn, D. M., D. B. Shackelford, D. F. Egan, M. M. Mihaylova, A. Mery, D. S. Vasquez, B. E. Turk, and R. J. Shaw. 2008. 'AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint', *Mol Cell*, 30: 214-26.
- Halaby, M. J., B. R. Harris, W. K. Miskimins, M. P. Cleary, and D. Q. Yang. 2015. 'Deregulation of Internal Ribosome Entry Site-Mediated p53 Translation in Cancer Cells with Defective p53 Response to DNA Damage', *Mol Cell Biol*, 35: 4006-17.

- Han, J., J. H. Ding, C. W. Byeon, J. H. Kim, K. J. Hertel, S. Jeong, and X. D. Fu. 2011. 'SR proteins induce alternative exon skipping through their activities on the flanking constitutive exons', *Mol Cell Biol*, 31: 793-802.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg. 2011. 'Hallmarks of cancer: the next generation', *Cell*, 144: 646-74.
- Hans, F., and S. Dimitrov. 2001. 'Histone H3 phosphorylation and cell division', *Oncogene*, 20: 3021-7.
- Harashima, A., T. Guettouche, and G. N. Barber. 2010. 'Phosphorylation of the NFAR proteins by the dsRNA-dependent protein kinase PKR constitutes a novel mechanism of translational regulation and cellular defense', *Genes Dev*, 24: 2640-53.
- Hart, T., M. Chandrashekar, M. Aregger, Z. Steinhart, K. R. Brown, G. MacLeod, M. Mis, M. Zimmermann, A. Fradet-Turcotte, S. Sun, P. Mero, P. Dirks, S. Sidhu, F. P. Roth, O. S. Rissland, D. Durocher, S. Angers, and J. Moffat. 2015. 'High-Resolution CRISPR Screens Reveal Fitness Genes and Genotype-Specific Cancer Liabilities', *Cell*, 163: 1515-26.
- Harvey, S. L., A. Charlet, W. Haas, S. P. Gygi, and D. R. Kellogg. 2005. 'Cdk1-dependent regulation of the mitotic inhibitor Wee1', *Cell*, 122: 407-20.
- Herbert, A. 2019. 'ADAR and Immune Silencing in Cancer', *Trends Cancer*, 5: 272-82.
- Hershko, A., H. Heller, S. Elias, and A. Ciechanover. 1983. 'Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown', *J Biol Chem*, 258: 8206-14.
- Higuchi, T., H. Todaka, Y. Sugiyama, M. Ono, N. Tamaki, E. Hatano, Y. Takezaki, K. Hanazaki, T. Miwa, S. Lai, K. Morisawa, M. Tsuda, T. Taniguchi, and S. Sakamoto. 2016. 'Suppression of MicroRNA-7 (miR-7) Biogenesis by Nuclear Factor 90-Nuclear Factor 45 Complex (NF90-NF45) Controls Cell Proliferation in Hepatocellular Carcinoma', *J Biol Chem*, 291: 21074-84.
- Hirano, T. 2005. 'Condensins: organizing and segregating the genome', *Curr Biol*, 15: R265-75.

- Hou, Y. Q., Y. Y. Wang, X. C. Wang, Y. Liu, C. Z. Zhang, Z. S. Chen, Z. Zhang, W. Wang, and D. X. Kong. 2020. 'Multifaceted anti-colorectal tumor effect of digoxin on HCT8 and SW620 cells in vitro', *Gastroenterol Rep (Oxf)*, 8: 465-75.
- Hsu, C. L., and A. Stevens. 1993. 'Yeast cells lacking 5'→3' exoribonuclease 1 contain mRNA species that are poly(A) deficient and partially lack the 5' cap structure', *Mol Cell Biol*, 13: 4826-35.
- Hu, Q., Y. Y. Lu, H. Noh, S. Hong, Z. Dong, H. F. Ding, S. B. Su, and S. Huang. 2013. 'Interleukin enhancer-binding factor 3 promotes breast tumor progression by regulating sustained urokinase-type plasminogen activator expression', *Oncogene*, 32: 3933-43.
- Huang, Q., X. He, X. Qiu, X. Liu, G. Sun, J. Guo, Z. Ding, L. Yang, N. Ban, T. Tao, and D. Wang. 2014. 'Expression of NF45 correlates with malignant grade in gliomas and plays a pivotal role in tumor growth', *Tumour Biol*, 35: 10149-57.
- Huard, J., S. Mueller, E. D. Gilles, U. Klingmuller, and S. Klamt. 2012. 'An integrative model links multiple inputs and signaling pathways to the onset of DNA synthesis in hepatocytes', *FEBS J*, 279: 3290-313.
- Iglesias, N., and F. Stutz. 2008. 'Regulation of mRNP dynamics along the export pathway', *FEBS Lett*, 582: 1987-96.
- Inui, M., G. Martello, and S. Piccolo. 2010. 'MicroRNA control of signal transduction', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11: 252-63.
- Ishizuka, J. J., R. T. Manguso, C. K. Cheruiyot, K. Bi, A. Panda, A. Iracheta-Vellve, B. C. Miller, P. P. Du, K. B. Yates, J. Dubrot, I. Buchumenski, D. E. Comstock, F. D. Brown, A. Ayer, I. C. Kohnle, H. W. Pope, M. D. Zimmer, D. R. Sen, S. K. Lane-Reticker, E. J. Robitschek, G. K. Griffin, N. B. Collins, A. H. Long, J. G. Doench, D. Kozono, E. Y. Levanon, and W. N. Haining. 2019. 'Loss of ADAR1 in tumours overcomes resistance to immune checkpoint blockade', *Nature*, 565: 43-48.
- Isken, O., M. Baroth, C. W. Grassmann, S. Weinlich, D. H. Ostareck, A. Ostareck-Lederer, and S. E. Behrens. 2007. 'Nuclear factors are involved in hepatitis C virus RNA replication', *RNA*, 13: 1675-92.

- Jares, P., A. Donaldson, and J. J. Blow. 2000. 'The Cdc7/Dbf4 protein kinase: target of the S phase checkpoint?', *EMBO Rep*, 1: 319-22.
- Jayachandran, U., H. Grey, and A. G. Cook. 2016. 'Nuclear factor 90 uses an ADAR2-like binding mode to recognize specific bases in dsRNA', *Nucleic Acids Res*, 44: 1924-36.
- Jeong, S. 2017. 'SR Proteins: Binders, Regulators, and Connectors of RNA', *Mol Cells*, 40: 1-9.
- Jiang, W., H. Huang, L. Ding, P. Zhu, H. Saiyin, G. Ji, J. Zuo, D. Han, Y. Pan, D. Ding, X. Ma, Y. Zhang, J. Wu, Q. Yi, J. O. Liu, H. Huang, Y. Dang, and L. Yu. 2015. 'Regulation of cell cycle of hepatocellular carcinoma by NF90 through modulation of cyclin E1 mRNA stability', *Oncogene*, 34: 4460-70.
- Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, and E. Charpentier. 2012. 'A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity', *Science*, 337: 816-21.
- Kao, P. N., L. Chen, G. Brock, J. Ng, J. Kenny, A. J. Smith, and B. Corthesy. 1994. 'Cloning and expression of cyclosporin A- and FK506-sensitive nuclear factor of activated T-cells: NF45 and NF90', *J Biol Chem*, 269: 20691-9.
- Khong, A., and R. Parker. 2020. 'The landscape of eukaryotic mRNPs', *RNA*, 26: 229-39.
- Kim, Y. K., and L. E. Maquat. 2019. 'UPF1 front and center in RNA decay: UPF1 in nonsense-mediated mRNA decay and beyond', *RNA*, 25: 407-22.
- Kippin, T. E., D. J. Martens, and D. van der Kooy. 2005. 'p21 loss compromises the relative quiescence of forebrain stem cell proliferation leading to exhaustion of their proliferation capacity', *Genes Dev*, 19: 756-67.
- Knudsen, E. S., R. Nambiar, S. R. Rosario, D. J. Smiraglia, D. W. Goodrich, and A. K. Witkiewicz. 2020. 'Pan-cancer molecular analysis of the RB tumor suppressor pathway', *Commun Biol*, 3: 158.
- Kops, G. J., B. A. Weaver, and D. W. Cleveland. 2005. 'On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint', *Nat Rev Cancer*, 5: 773-85.

- Kress, T. R., A. Sabo, and B. Amati. 2015. 'MYC: connecting selective transcriptional control to global RNA production', *Nat Rev Cancer*, 15: 593-607.
- Krock, B. L., N. Skuli, and M. C. Simon. 2011. 'Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil', *Genes Cancer*, 2: 1117-33.
- Kronja, I., and T. L. Orr-Weaver. 2011. 'Translational regulation of the cell cycle: when, where, how and why?', *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 366: 3638-52.
- Kuwano, Y., H. H. Kim, K. Abdelmohsen, R. Pullmann, Jr., J. L. Martindale, X. Yang, and M. Gorospe. 2008. 'MKP-1 mRNA stabilization and translational control by RNA-binding proteins HuR and NF90', *Mol Cell Biol*, 28: 4562-75.
- Kwon, S. C., T. A. Nguyen, Y. G. Choi, M. H. Jo, S. Hohng, V. N. Kim, and J. S. Woo. 2016. 'Structure of Human DROSHA', *Cell*, 164: 81-90.
- LaBaer, J., M. D. Garrett, L. F. Stevenson, J. M. Slingerland, C. Sandhu, H. S. Chou, A. Fattaey, and E. Harlow. 1997. 'New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors', *Genes Dev*, 11: 847-62.
- Lai, W. S., E. Carballo, J. M. Thorn, E. A. Kennington, and P. J. Blackshear. 2000. 'Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA. Binding of tristetraprolin-related zinc finger proteins to Au-rich elements and destabilization of mRNA', *J Biol Chem*, 275: 17827-37.
- Laird, G. M., E. E. Eisele, S. A. Rabi, D. Nikolaeva, and R. F. Siliciano. 2014. 'A novel cell-based high-throughput screen for inhibitors of HIV-1 gene expression and budding identifies the cardiac glycosides', *J Antimicrob Chemother*, 69: 988-94.
- Larcher, J. C., L. Gasmi, W. Viranaicken, B. Edde, R. Bernard, I. Ginzburg, and P. Denoulet. 2004. 'Ilf3 and NF90 associate with the axonal targeting element of Tau mRNA', *FASEB J*, 18: 1761-3.
- Lee, J. W., P. C. Liao, K. C. Young, C. L. Chang, S. S. Chen, T. T. Chang, M. D. Lai, and S. W. Wang. 2011. 'Identification of hnRNPH1, NF45, and C14orf166 as novel host interacting partners of the mature hepatitis C virus core protein', *J Proteome Res*, 10: 4522-34.

- Lee, Y., M. Kim, J. Han, K. H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek, and V. N. Kim. 2004. 'MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II', *EMBO J*, 23: 4051-60.
- Leung, C. S., and T. L. Johnson. 2018. 'The Exon Junction Complex: A Multitasking Guardian of the Transcriptome', *Mol Cell*, 72: 799-801.
- Levenberg, S., A. Yarden, Z. Kam, and B. Geiger. 1999. 'p27 is involved in N-cadherin-mediated contact inhibition of cell growth and S-phase entry', *Oncogene*, 18: 869-76.
- Lewis, H. A., K. Musunuru, K. B. Jensen, C. Edo, H. Chen, R. B. Darnell, and S. K. Burley. 2000. 'Sequence-specific RNA binding by a Nova KH domain: implications for paraneoplastic disease and the fragile X syndrome', *Cell*, 100: 323-32.
- Li, W., D. Notani, and M. G. Rosenfeld. 2016. 'Enhancers as non-coding RNA transcription units: recent insights and future perspectives', *Nat Rev Genet*, 17: 207-23.
- Li, X., C. X. Liu, W. Xue, Y. Zhang, S. Jiang, Q. F. Yin, J. Wei, R. W. Yao, L. Yang, and L. L. Chen. 2017. 'Coordinated circRNA Biogenesis and Function with NF90/NF110 in Viral Infection', *Mol Cell*, 67: 214-27 e7.
- Li, Y., and M. Belshan. 2016. 'NF45 and NF90 Bind HIV-1 RNA and Modulate HIV Gene Expression', *Viruses*, 8.
- Li, Y., and M. Kiledjian. 2010. 'Regulation of mRNA decapping', *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 1: 253-65.
- Liao, H. J., R. Kobayashi, and M. B. Mathews. 1998. 'Activities of adenovirus virus-associated RNAs: purification and characterization of RNA binding proteins', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 8514-9.
- Liao, H., F. Ji, T. Helleday, and S. Ying. 2018. 'Mechanisms for stalled replication fork stabilization: new targets for synthetic lethality strategies in cancer treatments', *EMBO Rep*, 19.
- Lin, J., Z. Chen, S. Wu, W. Huang, F. Chen, and Z. Huang. 2019. 'An NF90/long noncoding RNA-LET/miR-548k feedback amplification loop controls esophageal squamous cell carcinoma progression', *J Cancer*, 10: 5139-52.

- Lingel, A., B. Simon, E. Izaurralde, and M. Sattler. 2003. 'Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain', *Nature*, 426: 465-9.
- Liss, M., M. H. Radke, J. Eckhard, M. Neuenschwander, V. Dauksaite, J. P. von Kries, and M. Gotthardt. 2018. 'Drug discovery with an RBM20 dependent titin splice reporter identifies cardenolides as lead structures to improve cardiac filling', *PLoS One*, 13: e0198492.
- Liu, S. H., J. Yu, J. F. Creeden, J. M. Sutton, S. Markowiak, R. Sanchez, J. Nemunaitis, A. Kalinoski, J. T. Zhang, R. Damoiseaux, P. Erhardt, and F. C. Brunicardi. 2020. 'Repurposing metformin, simvastatin and digoxin as a combination for targeted therapy for pancreatic ductal adenocarcinoma', *Cancer Lett*, 491: 97-107.
- Lopes, M., C. Cotta-Ramusino, A. Pellicoli, G. Liberi, P. Plevani, M. Muzi-Falconi, C. S. Newlon, and M. Foiani. 2001. 'The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks', *Nature*, 412: 557-61.
- Lundberg, A., L. S. Lindstrom, J. S. Parker, E. Loverli, C. M. Perou, J. Bergh, and N. P. Tobin. 2020. 'A pan-cancer analysis of the frequency of DNA alterations across cell cycle activity levels', *Oncogene*, 39: 5430-40.
- Lundberg, A. S., and R. A. Weinberg. 1998. 'Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes', *Mol Cell Biol*, 18: 753-61.
- Ma, J. B., K. Ye, and D. J. Patel. 2004. 'Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain', *Nature*, 429: 318-22.
- Malumbres, M., and M. Barbacid. 2005. 'Mammalian cyclin-dependent kinases', *Trends Biochem Sci*, 30: 630-41.
- . 2009. 'Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm', *Nat Rev Cancer*, 9: 153-66.
- Marchesini, M., Y. Ogoti, E. Fiorini, A. Aktas Samur, L. Nezi, M. D'Anca, P. Storti, M. K. Samur, I. Ganan-Gomez, M. T. Fulciniti, N. Mistry, S. Jiang, N. Bao, V. Marchica, A. Neri, C. Bueso-Ramos, C. J. Wu, L. Zhang, H. Liang, X. Peng, N. Giuliani, G. Draetta, K. Clise-

- Dwyer, H. Kantarjian, N. Munshi, R. Orlowski, G. Garcia-Manero, R. A. DePinho, and S. Colla. 2017. 'ILF2 Is a Regulator of RNA Splicing and DNA Damage Response in 1q21-Amplified Multiple Myeloma', *Cancer Cell*, 32: 88-100 e6.
- Maris, C., C. Dominguez, and F. H. Allain. 2005. 'The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression', *FEBS J*, 272: 2118-31.
- Martin, F., A. Schaller, S. Eglite, D. Schumperli, and B. Muller. 1997. 'The gene for histone RNA hairpin binding protein is located on human chromosome 4 and encodes a novel type of RNA binding protein', *EMBO J*, 16: 769-78.
- Marzluff, W. F., and R. J. Duronio. 2002. 'Histone mRNA expression: multiple levels of cell cycle regulation and important developmental consequences', *Curr Opin Cell Biol*, 14: 692-9.
- Massague, J. 2004. 'G1 cell-cycle control and cancer', *Nature*, 432: 298-306.
- Masuda, K., Y. Kuwano, K. Nishida, K. Rokutan, and I. Imoto. 2013. 'NF90 in posttranscriptional gene regulation and microRNA biogenesis', *Int J Mol Sci*, 14: 17111-21.
- Masuda, S., R. Das, H. Cheng, E. Hurt, N. Dorman, and R. Reed. 2005. 'Recruitment of the human TREX complex to mRNA during splicing', *Genes Dev*, 19: 1512-7.
- Masutani, M., T. Nozaki, K. Wakabayashi, and T. Sugimura. 1995. 'Role of poly(ADP-ribose) polymerase in cell-cycle checkpoint mechanisms following gamma-irradiation', *Biochimie*, 77: 462-5.
- Mattison, C. P., and M. Winey. 2006. 'The centrosome cycle', *Results Probl Cell Differ*, 42: 111-46.
- Merrill, M. K., and M. Gromeier. 2006. 'The double-stranded RNA binding protein 76:NF45 heterodimer inhibits translation initiation at the rhinovirus type 2 internal ribosome entry site', *J Virol*, 80: 6936-42.

- Mi, S., Y. Li, J. Yan, and G. F. Gao. 2010. 'Na(+)/K (+)-ATPase beta1 subunit interacts with M2 proteins of influenza A and B viruses and affects the virus replication', *Sci China Life Sci*, 53: 1098-105.
- Mowry, K. L., and J. A. Steitz. 1987. 'Identification of the human U7 snRNP as one of several factors involved in the 3' end maturation of histone pre-messenger RNA's', *Science*, 238: 1682-7.
- Muller, B., and D. Schumperli. 1997. 'The U7 snRNP and the hairpin binding protein: Key players in histone mRNA metabolism', *Semin Cell Dev Biol*, 8: 567-76.
- Murzin, A. G. 1993. 'OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences', *EMBO J*, 12: 861-7.
- Musacchio, A. 2015. 'The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics', *Curr Biol*, 25: R1002-18.
- Nadel, J., R. Athanasiadou, C. Lemetre, N. A. Wijetunga, O. Broin P, H. Sato, Z. Zhang, J. Jeddeloh, C. Montagna, A. Golden, C. Seoighe, and J. M. Greally. 2015. 'RNA:DNA hybrids in the human genome have distinctive nucleotide characteristics, chromatin composition, and transcriptional relationships', *Epigenetics Chromatin*, 8: 46.
- Nagy, P. D., and J. Pogany. 2011. 'The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors', *Nat Rev Microbiol*, 10: 137-49.
- Nahse, V., L. Christ, H. Stenmark, and C. Campsteijn. 2017. 'The Abscission Checkpoint: Making It to the Final Cut', *Trends Cell Biol*, 27: 1-11.
- Nakadai, T., A. Fukuda, M. Shimada, K. Nishimura, and K. Hisatake. 2015. 'The RNA binding complexes NF45-NF90 and NF45-NF110 associate dynamically with the c-fos gene and function as transcriptional coactivators', *J Biol Chem*, 290: 26832-45.
- Nakayama, K. I., and K. Nakayama. 2005. 'Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases', *Semin Cell Dev Biol*, 16: 323-33.
- Narasimha, A. M., M. Kaulich, G. S. Shapiro, Y. J. Choi, P. Sicinski, and S. F. Dowdy. 2014. 'Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation', *Elife*, 3.

- Nguyen, T. A., M. H. Jo, Y. G. Choi, J. Park, S. C. Kwon, S. Hohng, V. N. Kim, and J. S. Woo. 2015. 'Functional Anatomy of the Human Microprocessor', *Cell*, 161: 1374-87.
- Ni, S., J. Zhu, J. Zhang, S. Zhang, M. Li, R. Ni, J. Liu, H. Qiu, W. Chen, H. Wang, and W. Guo. 2015. 'Expression and clinical role of NF45 as a novel cell cycle protein in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC)', *Tumour Biol*, 36: 747-56.
- Ni, T., G. Mao, Q. Xue, Y. Liu, B. Chen, X. Cui, L. Lv, L. Jia, Y. Wang, and L. Ji. 2015. 'Upregulated expression of ILF2 in non-small cell lung cancer is associated with tumor cell proliferation and poor prognosis', *J Mol Histol*, 46: 325-35.
- Nie, Y., L. Ding, P. N. Kao, R. Braun, and J. H. Yang. 2005. 'ADAR1 interacts with NF90 through double-stranded RNA and regulates NF90-mediated gene expression independently of RNA editing', *Mol Cell Biol*, 25: 6956-63.
- Nolte, R. T., R. M. Conlin, S. C. Harrison, and R. S. Brown. 1998. 'Differing roles for zinc fingers in DNA recognition: structure of a six-finger transcription factor IIIA complex', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 2938-43.
- Nourredine, S., G. Lavoie, J. Paradis, K. Ben El Kadhi, A. Meant, L. Aubert, B. Grondin, P. Gendron, B. Chabot, M. Bouvier, S. Carreno, and P. P. Roux. 2020. 'NF45 and NF90 Regulate Mitotic Gene Expression by Competing with Staufen-Mediated mRNA Decay', *Cell Rep*, 31: 107660.
- Nussbacher, J. K., and G. W. Yeo. 2018. 'Systematic Discovery of RNA Binding Proteins that Regulate MicroRNA Levels', *Mol Cell*, 69: 1005-16 e7.
- Ohno, M., J. Komakine, E. Suzuki, M. Nishizuka, S. Osada, and M. Imagawa. 2011. 'Interleukin enhancer-binding factor 3 functions as a liver receptor homologue-1 co-activator in synergy with the nuclear receptor co-activators PRMT1 and PGC-1alpha', *Biochem J*, 437: 531-40.
- Orford, R. L., C. Robinson, J. M. Haydon, R. K. Patient, and M. J. Guille. 1998. 'The maternal CCAAT box transcription factor which controls GATA-2 expression is novel and developmentally regulated and contains a double-stranded-RNA-binding subunit', *Mol Cell Biol*, 18: 5557-66.

- Oubridge, C., N. Ito, P. R. Evans, C. H. Teo, and K. Nagai. 1994. 'Crystal structure at 1.92 Å resolution of the RNA-binding domain of the U1A spliceosomal protein complexed with an RNA hairpin', *Nature*, 372: 432-8.
- Panda, A. C. 2018. 'Circular RNAs Act as miRNA Sponges', *Adv Exp Med Biol*, 1087: 67-79.
- Park, E., and L. E. Maquat. 2013. 'Staufen-mediated mRNA decay', *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 4: 423-35.
- Parker, J. S., M. Mullins, M. C. Cheang, S. Leung, D. Voduc, T. Vickery, S. Davies, C. Fauron, X. He, Z. Hu, J. F. Quackenbush, I. J. Stijleman, J. Palazzo, J. S. Marron, A. B. Nobel, E. Mardis, T. O. Nielsen, M. J. Ellis, C. M. Perou, and P. S. Bernard. 2009. 'Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes', *J Clin Oncol*, 27: 1160-7.
- Parker, L. M., I. Fierro-Monti, and M. B. Mathews. 2001. 'Nuclear factor 90 is a substrate and regulator of the eukaryotic initiation factor 2 kinase double-stranded RNA-activated protein kinase', *J Biol Chem*, 276: 32522-30.
- Patino, C., A. L. Haenni, and S. Urcuqui-Inchima. 2015. 'NF90 isoforms, a new family of cellular proteins involved in viral replication?', *Biochimie*, 108: 20-4.
- Pavletich, N. P. 1999. 'Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors', *J Mol Biol*, 287: 821-8.
- Pawson, T., and P. Nash. 2003. 'Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains', *Science*, 300: 445-52.
- Pei, Y., P. Zhu, Y. Dang, J. Wu, X. Yang, B. Wan, J. O. Liu, Q. Yi, and L. Yu. 2008. 'Nuclear export of NF90 to stabilize IL-2 mRNA is mediated by AKT-dependent phosphorylation at Ser647 in response to CD28 costimulation', *J Immunol*, 180: 222-9.
- Perez de Castro, I., G. de Carcer, and M. Malumbres. 2007. 'A census of mitotic cancer genes: new insights into tumor cell biology and cancer therapy', *Carcinogenesis*, 28: 899-912.
- Perri, F., S. Pisconti, and G. Della Vittoria Scarpati. 2016. 'P53 mutations and cancer: a tight linkage', *Ann Transl Med*, 4: 522.
- Pickart, C. M. 2001. 'Mechanisms underlying ubiquitination', *Annu Rev Biochem*, 70: 503-33.

- Pollak, M. 2008. 'Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia', *Nat Rev Cancer*, 8: 915-28.
- Pratama, A., R. R. Ramiscal, D. G. Silva, S. K. Das, V. Athanasopoulos, J. Fitch, N. K. Botelho, P. P. Chang, X. Hu, J. J. Hogan, P. Mana, D. Bernal, H. Korner, D. Yu, C. C. Goodnow, M. C. Cook, and C. G. Vinuesa. 2013. 'Roquin-2 shares functions with its paralog Roquin-1 in the repression of mRNAs controlling T follicular helper cells and systemic inflammation', *Immunity*, 38: 669-80.
- Proudfoot, N. 2004. 'New perspectives on connecting messenger RNA 3' end formation to transcription', *Curr Opin Cell Biol*, 16: 272-8.
- Quinones-Valdez, G., S. S. Tran, H. I. Jun, J. H. Bahn, E. W. Yang, L. Zhan, A. Brummer, X. Wei, E. L. Van Nostrand, G. A. Pratt, G. W. Yeo, B. R. Graveley, and X. Xiao. 2019. 'Regulation of RNA editing by RNA-binding proteins in human cells', *Commun Biol*, 2: 19.
- Ramirez-Valle, F., S. Braunstein, J. Zavadil, S. C. Formenti, and R. J. Schneider. 2008. 'eIF4GI links nutrient sensing by mTOR to cell proliferation and inhibition of autophagy', *J Cell Biol*, 181: 293-307.
- Ranpura, S. A., U. Deshmukh, and P. P. Reddi. 2008. 'NF45 and NF90 in murine seminiferous epithelium: potential role in SP-10 gene transcription', *J Androl*, 29: 186-97.
- Reddy, D., R. Kumavath, D. Barh, V. Azevedo, and P. Ghosh. 2020. 'Anticancer and Antiviral Properties of Cardiac Glycosides: A Review to Explore the Mechanism of Actions', *Molecules*, 25.
- Reichman, T. W., L. C. Muniz, and M. B. Mathews. 2002. 'The RNA binding protein nuclear factor 90 functions as both a positive and negative regulator of gene expression in mammalian cells', *Mol Cell Biol*, 22: 343-56.
- Rigo, F., Y. Hua, S. J. Chun, T. P. Prakash, A. R. Krainer, and C. F. Bennett. 2012. 'Synthetic oligonucleotides recruit ILF2/3 to RNA transcripts to modulate splicing', *Nat Chem Biol*, 8: 555-61.

- Ronco, C., A. R. Martin, L. Demange, and R. Benhida. 2017. 'ATM, ATR, CHK1, CHK2 and WEE1 inhibitors in cancer and cancer stem cells', *Medchemcomm*, 8: 295-319.
- Roux, P. P., and I. Topisirovic. 2018. 'Signaling Pathways Involved in the Regulation of mRNA Translation', *Mol Cell Biol*, 38.
- Sakamoto, S., K. Aoki, T. Higuchi, H. Todaka, K. Morisawa, N. Tamaki, E. Hatano, A. Fukushima, T. Taniguchi, and Y. Agata. 2009. 'The NF90-NF45 complex functions as a negative regulator in the microRNA processing pathway', *Mol Cell Biol*, 29: 3754-69.
- Sakamoto, S., K. Morisawa, K. Ota, J. Nie, and T. Taniguchi. 1999. 'A binding protein to the DNase I hypersensitive site II in HLA-DR alpha gene was identified as NF90', *Biochemistry*, 38: 3355-61.
- Sakurai, M., Y. Shiromoto, H. Ota, C. Song, A. V. Kossenkov, J. Wickramasinghe, L. C. Showe, E. Skordalakes, H. Y. Tang, D. W. Speicher, and K. Nishikura. 2017. 'ADAR1 controls apoptosis of stressed cells by inhibiting Staufen1-mediated mRNA decay', *Nat Struct Mol Biol*, 24: 534-43.
- Sanchez-Vega, F., M. Mina, J. Armenia, W. K. Chatila, A. Luna, K. C. La, S. Dimitriadoy, D. L. Liu, H. S. Kantheti, S. Saghafeinia, D. Chakravarty, F. Daian, Q. Gao, M. H. Bailey, W. W. Liang, S. M. Foltz, I. Shmulevich, L. Ding, Z. Heins, A. Ochoa, B. Gross, J. Gao, H. Zhang, R. Kundra, C. Kandoth, I. Bahceci, L. Dervishi, U. Dogrusoz, W. Zhou, H. Shen, P. W. Laird, G. P. Way, C. S. Greene, H. Liang, Y. Xiao, C. Wang, A. Iavarone, A. H. Berger, T. G. Bivona, A. J. Lazar, G. D. Hammer, T. Giordano, L. N. Kwong, G. McArthur, C. Huang, A. D. Tward, M. J. Frederick, F. McCormick, M. Meyerson, Network Cancer Genome Atlas Research, E. M. Van Allen, A. D. Cherniack, G. Ciriello, C. Sander, and N. Schultz. 2018. 'Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas', *Cell*, 173: 321-37 e10.
- Santos, A., R. Wernersson, and L. J. Jensen. 2015. 'Cyclebase 3.0: a multi-organism database on cell-cycle regulation and phenotypes', *Nucleic Acids Res*, 43: D1140-4.
- Saunders, L. R., D. J. Perkins, S. Balachandran, R. Michaels, R. Ford, A. Mayeda, and G. N. Barber. 2001. 'Characterization of two evolutionarily conserved, alternatively spliced

- nuclear phosphoproteins, NFAR-1 and -2, that function in mRNA processing and interact with the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR', *J Biol Chem*, 276: 32300-12.
- Schmelzle, T., and M. N. Hall. 2000. 'TOR, a central controller of cell growth', *Cell*, 103: 253-62.
- Schmidt, T., S. Friedrich, R. P. Golbik, and S. E. Behrens. 2017. 'NF90-NF45 is a selective RNA chaperone that rearranges viral and cellular riboswitches: biochemical analysis of a virus host factor activity', *Nucleic Acids Res*, 45: 12441-54.
- Schoenberg, D. R. 2011. 'Mechanisms of endonuclease-mediated mRNA decay', *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2: 582-600.
- Searles, M. A., D. Lu, and A. Klug. 2000. 'The role of the central zinc fingers of transcription factor IIIA in binding to 5 S RNA', *J Mol Biol*, 301: 47-60.
- Shabman, R. S., D. W. Leung, J. Johnson, N. Glennon, E. E. Gulcicek, K. L. Stone, L. Leung, L. Hensley, G. K. Amarasinghe, and C. F. Basler. 2011. 'DRBP76 associates with Ebola virus VP35 and suppresses viral polymerase function', *J Infect Dis*, 204 Suppl 3: S911-8.
- Sherr, C. J., and F. McCormick. 2002. 'The RB and p53 pathways in cancer', *Cancer Cell*, 2: 103-12.
- Sherr, C. J., and J. M. Roberts. 1999. 'CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression', *Genes Dev*, 13: 1501-12.
- Shi, L., W. R. Godfrey, J. Lin, G. Zhao, and P. N. Kao. 2007. 'NF90 regulates inducible IL-2 gene expression in T cells', *J Exp Med*, 204: 971-7.
- Shi, L., D. Qiu, G. Zhao, B. Corthesy, S. Lees-Miller, W. H. Reeves, and P. N. Kao. 2007. 'Dynamic binding of Ku80, Ku70 and NF90 to the IL-2 promoter in vivo in activated T-cells', *Nucleic Acids Res*, 35: 2302-10.
- Shi, L., G. Zhao, D. Qiu, W. R. Godfrey, H. Vogel, T. A. Rando, H. Hu, and P. N. Kao. 2005. 'NF90 regulates cell cycle exit and terminal myogenic differentiation by direct binding

- to the 3'-untranslated region of MyoD and p21WAF1/CIP1 mRNAs', *J Biol Chem*, 280: 18981-9.
- Shin, H. J., S. S. Kim, Y. H. Cho, S. G. Lee, and H. M. Rho. 2002. 'Host cell proteins binding to the encapsidation signal epsilon in hepatitis B virus RNA', *Arch Virol*, 147: 471-91.
- Shuman, S. 2001. 'Structure, mechanism, and evolution of the mRNA capping apparatus', *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 66: 1-40.
- Siomi, H., M. J. Matunis, W. M. Michael, and G. Dreyfuss. 1993. 'The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif', *Nucleic Acids Res*, 21: 1193-8.
- Song, D., H. Huang, J. Wang, Y. Zhao, X. Hu, F. He, L. Yu, and J. Wu. 2017. 'NF90 regulates PARP1 mRNA stability in hepatocellular carcinoma', *Biochem Biophys Res Commun*, 488: 211-17.
- Sotillo, R., E. Hernando, E. Diaz-Rodriguez, J. Teruya-Feldstein, C. Cordon-Cardo, S. W. Lowe, and R. Benezra. 2007. 'Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice', *Cancer Cell*, 11: 9-23.
- Soucek, T., R. S. Yeung, and M. Hengstschlager. 1998. 'Inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 upon loss of the tuberous sclerosis complex gene-2', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 15653-8.
- Stark, H., and R. Luhrmann. 2006. 'Cryo-electron microscopy of spliceosomal components', *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 35: 435-57.
- Steigemann, P., C. Wurzenberger, M. H. Schmitz, M. Held, J. Guizetti, S. Maar, and D. W. Gerlich. 2009. 'Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization', *Cell*, 136: 473-84.
- Stoilov, P., C. H. Lin, R. Damoiseaux, J. Nikolic, and D. L. Black. 2008. 'A high-throughput screening strategy identifies cardiotonic steroids as alternative splicing modulators', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 11218-23.
- Subramanian, A. R. 1983. 'Structure and functions of ribosomal protein S1', *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 28: 101-42.

- Tanaka, S., and J. F. Diffley. 2002. 'Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase', *Nat Cell Biol*, 4: 198-207.
- Tang, J., P. N. Kao, and H. R. Herschman. 2000. 'Protein-arginine methyltransferase I, the predominant protein-arginine methyltransferase in cells, interacts with and is regulated by interleukin enhancer-binding factor 3', *J Biol Chem*, 275: 19866-76.
- Taylor, W. R., S. E. DePrimo, A. Agarwal, M. L. Agarwal, A. H. Schonthal, K. S. Katula, and G. R. Stark. 1999. 'Mechanisms of G2 arrest in response to overexpression of p53', *Mol Biol Cell*, 10: 3607-22.
- Tcherkezian, J., M. Cargnello, Y. Romeo, E. L. Huttlin, G. Lavoie, S. P. Gygi, and P. P. Roux. 2014. 'Proteomic analysis of cap-dependent translation identifies LARP1 as a key regulator of 5'TOP mRNA translation', *Genes Dev*, 28: 357-71.
- Timofeev, O., O. Cizmecioglu, F. Settele, T. Kempf, and I. Hoffmann. 2010. 'Cdc25 phosphatases are required for timely assembly of CDK1-cyclin B at the G2/M transition', *J Biol Chem*, 285: 16978-90.
- Tominaga-Yamanaka, K., K. Abdelmohsen, J. L. Martindale, X. Yang, D. D. Taub, and M. Gorospe. 2012. 'NF90 coordinately represses the senescence-associated secretory phenotype', *Aging (Albany NY)*, 4: 695-708.
- Van Nostrand, E. L., G. A. Pratt, A. A. Shishkin, C. Gelboin-Burkhart, M. Y. Fang, B. Sundararaman, S. M. Blue, T. B. Nguyen, C. Surka, K. Elkins, R. Stanton, F. Rigo, M. Guttman, and G. W. Yeo. 2016. 'Robust transcriptome-wide discovery of RNA-binding protein binding sites with enhanced CLIP (eCLIP)', *Nat Methods*, 13: 508-14.
- Venkataraman, K., K. E. Guja, M. Garcia-Diaz, and A. W. Karzai. 2014. 'Non-stop mRNA decay: a special attribute of trans-translation mediated ribosome rescue', *Front Microbiol*, 5: 93.
- Vodermaier, H. C. 2004. 'APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle', *Curr Biol*, 14: R787-96.
- Volk, N., and N. Shomron. 2011. 'Versatility of MicroRNA biogenesis', *PLoS One*, 6: e19391.

- Vrakas, C. N., A. B. Herman, M. Ray, S. E. Kelemen, R. Scalia, and M. V. Autieri. 2019. 'RNA stability protein ILF3 mediates cytokine-induced angiogenesis', *FASEB J*, 33: 3304-16.
- Vumbaca, F., K. N. Phoenix, D. Rodriguez-Pinto, D. K. Han, and K. P. Claffey. 2008. 'Double-stranded RNA-binding protein regulates vascular endothelial growth factor mRNA stability, translation, and breast cancer angiogenesis', *Mol Cell Biol*, 28: 772-83.
- Wakiyama, M., H. Imataka, and N. Sonenberg. 2000. 'Interaction of eIF4G with poly(A)-binding protein stimulates translation and is critical for *Xenopus* oocyte maturation', *Curr Biol*, 10: 1147-50.
- Walczak, C. E., S. Cai, and A. Khodjakov. 2010. 'Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11: 91-102.
- Wan, C., C. Gong, L. Ji, X. Liu, Y. Wang, L. Wang, M. Shao, L. Yang, S. Fan, Y. Xiao, X. Wang, M. Li, G. Zhou, and Y. Zhang. 2015. 'NF45 overexpression is associated with poor prognosis and enhanced cell proliferation of pancreatic ductal adenocarcinoma', *Mol Cell Biochem*, 410: 25-35.
- Wang, P., W. Song, B. W. Mok, P. Zhao, K. Qin, A. Lai, G. J. Smith, J. Zhang, T. Lin, Y. Guan, and H. Chen. 2009. 'Nuclear factor 90 negatively regulates influenza virus replication by interacting with viral nucleoprotein', *J Virol*, 83: 7850-61.
- Wang, X., S. Bruderer, Z. Rafi, J. Xue, P. J. Milburn, A. Kramer, and P. J. Robinson. 1999. 'Phosphorylation of splicing factor SF1 on Ser20 by cGMP-dependent protein kinase regulates spliceosome assembly', *EMBO J*, 18: 4549-59.
- Wang, X., E. R. Simpson, and K. A. Brown. 2015. 'p53: Protection against Tumor Growth beyond Effects on Cell Cycle and Apoptosis', *Cancer Res*, 75: 5001-7.
- Wang, Z. F., M. L. Whitfield, T. C. Ingledue, 3rd, Z. Dominski, and W. F. Marzluff. 1996. 'The protein that binds the 3' end of histone mRNA: a novel RNA-binding protein required for histone pre-mRNA processing', *Genes Dev*, 10: 3028-40.
- Wang, Z. L., B. Li, Y. X. Luo, Q. Lin, S. R. Liu, X. Q. Zhang, H. Zhou, J. H. Yang, and L. H. Qu. 2018. 'Comprehensive Genomic Characterization of RNA-Binding Proteins across Human Cancers', *Cell Rep*, 22: 286-98.

- Watson, S. F., N. Bellora, and S. Macias. 2020. 'ILF3 contributes to the establishment of the antiviral type I interferon program', *Nucleic Acids Res*, 48: 116-29.
- Wen-Jian, Y., T. Song, T. Jun, X. Kai-Ying, W. Jian-Jun, and W. Si-Hua. 2019. 'NF45 promotes esophageal squamous carcinoma cell invasion by increasing Rac1 activity through 14-3-3epsilon protein', *Arch Biochem Biophys*, 663: 101-08.
- Wen, X., X. Huang, B. W. Mok, Y. Chen, M. Zheng, S. Y. Lau, P. Wang, W. Song, D. Y. Jin, K. Y. Yuen, and H. Chen. 2014. 'NF90 exerts antiviral activity through regulation of PKR phosphorylation and stress granules in infected cells', *J Immunol*, 192: 3753-64.
- Whitfield, M. L., L. X. Zheng, A. Baldwin, T. Ohta, M. M. Hurt, and W. F. Marzluff. 2000. 'Stem-loop binding protein, the protein that binds the 3' end of histone mRNA, is cell cycle regulated by both translational and posttranslational mechanisms', *Mol Cell Biol*, 20: 4188-98.
- Will, C. L., and R. Luhrmann. 2011. 'Spliceosome structure and function', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3.
- Winter, J., S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory, and S. Diederichs. 2009. 'Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation', *Nat Cell Biol*, 11: 228-34.
- Wirth, K. G., G. Wutz, N. R. Kudo, C. Desdouets, A. Zetterberg, S. Taghybeeglu, J. Seznec, G. M. Ducos, R. Ricci, N. Firnberg, J. M. Peters, and K. Nasmyth. 2006. 'Separase: a universal trigger for sister chromatid disjunction but not chromosome cycle progression', *J Cell Biol*, 172: 847-60.
- Wolfel, T., M. Hauer, J. Schneider, M. Serrano, C. Wolfel, E. Klehmann-Hieb, E. De Plaen, T. Hankeln, K. H. Meyer zum Buschenfelde, and D. Beach. 1995. 'A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma', *Science*, 269: 1281-4.
- Wolkowicz, U. M., and A. G. Cook. 2012. 'NF45 dimerizes with NF90, Zfr and SPNR via a conserved domain that has a nucleotidyltransferase fold', *Nucleic Acids Res*, 40: 9356-68.

- Woodward, L. A., J. W. Mabin, P. Gangras, and G. Singh. 2017. 'The exon junction complex: a lifelong guardian of mRNA fate', *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 8.
- Wu, B., S. Su, D. P. Patil, H. Liu, J. Gan, S. R. Jaffrey, and J. Ma. 2018. 'Molecular basis for the specific and multivariant recognitions of RNA substrates by human hnRNP A2/B1', *Nat Commun*, 9: 420.
- Wu, T. H., L. Shi, J. Adrian, M. Shi, R. V. Nair, M. P. Snyder, and P. N. Kao. 2018. 'NF90/ILF3 is a transcription factor that promotes proliferation over differentiation by hierarchical regulation in K562 erythroleukemia cells', *PLoS One*, 13: e0193126.
- Xu, Z., H. Huang, X. Li, C. Ji, Y. Liu, X. Liu, J. Zhu, Z. Wang, H. Zhang, and J. Shi. 2020. 'High expression of interleukin-enhancer binding factor 3 predicts poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma', *Oncol Lett*, 19: 2141-52.
- Xu, Z., F. Wang, F. Fan, Y. Gu, N. Shan, X. Meng, S. Cheng, Y. Liu, C. Wang, Y. Song, and R. Xu. 2015. 'Quantitative Proteomics Reveals That the Inhibition of Na(+)/K(+)-ATPase Activity Affects S-Phase Progression Leading to a Chromosome Segregation Disorder by Attenuating the Aurora A Function in Hepatocellular Carcinoma Cells', *J Proteome Res*, 14: 4594-602.
- Yamano, H. 2019. 'APC/C: current understanding and future perspectives', *F1000Res*, 8.
- Yin, Z. H., X. W. Jiang, W. B. Shi, Q. L. Gui, and D. F. Yu. 2017. 'Expression and Clinical Significance of ILF2 in Gastric Cancer', *Dis Markers*, 2017: 4387081.
- Yuan, Y. R., Y. Pei, J. B. Ma, V. Kuryavyi, M. Zhadina, G. Meister, H. Y. Chen, Z. Dauter, T. Tuschl, and D. J. Patel. 2005. 'Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage', *Mol Cell*, 19: 405-19.
- Yuan, Y., H. Shen, D. S. Franklin, D. T. Scadden, and T. Cheng. 2004. 'In vivo self-renewing divisions of haematopoietic stem cells are increased in the absence of the early G1-phase inhibitor, p18INK4C', *Nat Cell Biol*, 6: 436-42.
- Zeng, L., Q. Zhang, K. Yan, and M. M. Zhou. 2011. 'Structural insights into piRNA recognition by the human PIWI-like 1 PAZ domain', *Proteins*, 79: 2004-9.

- Zhang, L., and C. Wang. 2006. 'F-box protein Skp2: a novel transcriptional target of E2F', *Oncogene*, 25: 2615-27.
- Zhang, Q., L. Fan, F. Hou, A. Dong, Y. X. Wang, and Y. Tong. 2015. 'New Insights into the RNA-Binding and E3 Ubiquitin Ligase Activities of Roquins', *Sci Rep*, 5: 15660.
- Zhang, W., Z. Xiong, T. Wei, Q. Li, Y. Tan, L. Ling, and X. Feng. 2018. 'Nuclear factor 90 promotes angiogenesis by regulating HIF-1alpha/VEGF-A expression through the PI3K/Akt signaling pathway in human cervical cancer', *Cell Death Dis*, 9: 276.
- Zhang, X., V. Mar, W. Zhou, L. Harrington, and M. O. Robinson. 1999. 'Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells', *Genes Dev*, 13: 2388-99.
- Zhao, H., and H. Piwnicka-Worms. 2001. 'ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1', *Mol Cell Biol*, 21: 4129-39.
- Zhao, J. Y., J. Kuang, R. C. Adlakha, and P. N. Rao. 1989. 'Threonine phosphorylation is associated with mitosis in HeLa cells', *FEBS Lett*, 249: 389-95.
- Zhao, M., Y. Liu, J. Chang, J. Qi, R. Liu, Y. Hou, Y. Wang, X. Zhang, L. Qiao, and L. Ren. 2019. 'ILF2 cooperates with E2F1 to maintain mitochondrial homeostasis and promote small cell lung cancer progression', *Cancer Biol Med*, 16: 771-83.
- Zheng, L., Z. Dominski, X. C. Yang, P. Elms, C. S. Raska, C. H. Borchers, and W. F. Marzluff. 2003. 'Phosphorylation of stem-loop binding protein (SLBP) on two threonines triggers degradation of SLBP, the sole cell cycle-regulated factor required for regulation of histone mRNA processing, at the end of S phase', *Mol Cell Biol*, 23: 1590-601.
- Zhou, Q., Y. Zhu, X. Wei, J. Zhou, L. Chang, H. Sui, Y. Han, D. Piao, R. Sha, and Y. Bai. 2016. 'MiR-590-5p inhibits colorectal cancer angiogenesis and metastasis by regulating nuclear factor 90/vascular endothelial growth factor A axis', *Cell Death Dis*, 7: e2413.
- Zhu, H., and J. J. Yu. 2010. 'Gene expression patterns in the histopathological classification of epithelial ovarian cancer', *Exp Ther Med*, 1: 187-92.
- Zhuang, J., L. Shen, L. Yang, X. Huang, Q. Lu, Y. Cui, X. Zheng, X. Zhao, D. Zhang, R. Huang, H. Guo, and J. Yan. 2017. 'TGFbeta1 Promotes Gemcitabine Resistance through

Regulating the LncRNA-LET/NF90/miR-145 Signaling Axis in Bladder Cancer',
Theranostics, 7: 3053-67.