

Université de Montréal

La régulation de Staufen1 dans le cycle et la prolifération cellulaires

par

Yulemi Gonzalez Quesada

Département de Biochimie et Médecine Moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de Philosophae Doctor

(PhD)

en Biochimie

Janvier 2023

Université de Montréal
Département de Biochimie et Médecine Moléculaire, Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée

La régulation de Staufen1 dans le cycle et la prolifération cellulaires

Présentée par

Yulemi Gonzalez Quesada

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Gerardo Ferbeyre

Président-rapporteur

Luc DesGroseillers

Directeur de recherche

Daniel Sinnett

Membre du jury

Thomas Duchaine

Examineur externe

Stéphane Roy

Représentant du Doyen

Résumé

Staufen1 (STAU1) est une protéine de liaison à l'ARN essentielle dans les cellules non-transformées. Dans les cellules cancéreuses, le niveau d'expression de la protéine est critique et étroitement lié à des événements d'apoptose et des altérations dans la prolifération cellulaire. Le dsRBD2 de STAU1 lie des facteurs protéiques qui sont fondamentaux pour les fonctions de la protéine, telles que la liaison aux microtubules qui garantit sa localisation au fuseau mitotique et l'interaction avec les coactivateurs de l'E3 ubiquitine-ligase APC/C, ce qui garantit la dégradation partielle de STAU1 en mitose.

Nous avons cartographié un nouveau motif F³⁹PxPxxLxxxxL⁵⁰ (motif FPL) dans le dsRBD2 de STAU1. Ce motif est fondamental pour l'interaction de la protéine avec les co-activateurs de l'APC/C, CDC20 et CDH1, et sa dégradation subséquente. Nous avons ensuite identifié un total de 15 protéines impliquées dans le processus inflammatoire qui partagent cette séquence avec STAU1. Nous avons prouvé, par des essais de co-transfection et de dégradation, que MAP4K1, l'une des protéines qui partagent ce motif, est aussi dégradé via ce motif FPL. Cependant, le motif de MAP4K1 n'est pas la cible de l'APC/C. Des techniques de biotinylation des protéines à proximité de STAU1 nous ont permis d'identifier TRIM25, une E3 ubiquitine ligase impliquée dans la régulation immunitaire et l'inflammation, comme protéine impliquée dans la dégradation de STAU1 et de MAP4K1 via le motif FPL. Ceci suggère des rôles de STAU1 dans la régulation du processus inflammatoire, ce qui est consistant avec des études récentes qui associent STAU1 à ce processus. Nous considérons que le motif FPL pourrait être à la base de la coordination de la régulation des protéines impliquées dans l'inflammation et la régulation de la réponse immune.

Nos études sur l'effet anti-prolifératif de STAU1 lorsque surexprimé dans les cellules transformées ont identifié le domaine dsRBD2 de STAU1 comme responsable de ce phénotype. Des mutants qui miment les différents états de phosphorylation de la serine 20, située dans le domaine dsRBD2, sont à la base des changements dans la régulation de la traduction et la dégradation des ARNm liés à STAU1. Ces changements dans la régulation des ARNm par STAU1 sont associés aux altérations dans la prolifération des cellules transformées observées lors de la surexpression de STAU1. Nous avons aussi découvert que, après la transfection de STAU1, la cellule déclenche rapidement des événements d'apoptose, et que ces événements sont aussi dépendants de l'état de phosphorylation de la sérine 20 dans dsRBD2 de STAU1. Ces résultats suggèrent que STAU1 est un senseur qui contrôle la balance entre la survie et la prolifération cellulaire et que l'état de phosphorylation de son dsRBD2 est à la base de ce contrôle.

Nos résultats indiquent que le dsRBD2 de STAU1 est le domaine de régulation du niveau d'expression protéique et un modulateurs des rôles de la protéine comme facteur post-transcriptionnel. Nous pensons que cibler la régulation de STAU1 et ses fonctions situées dans son domaine dsRBD2, serait important dans l'étude des maladies qui impliquent des événements d'apoptose, d'inflammation et de prolifération cellulaire telles que le cancer.

Mots clés : Staufen1, régulation pos-transcriptionnel, apoptose, cycle cellulaire, prolifération cellulaire, SMD, inflammation, cancer, dégradation, E3 ubiquitine ligase

Abstract

Staufen1 (STAU1) is an RNA-binding protein essential in untransformed cells. In cancer cells, the level of expression of the STAU1 protein is critical and it has been closely linked to events of apoptosis and to cell proliferation impairments. STAU1's dsRBD2 binds protein factors that are fundamental for the protein's functions, such as microtubules components that ensure the protein localization to the mitotic spindle and its interaction with E3 ubiquitin-ligase APC/C coactivators, which guarantees the partial degradation of STAU1 during mitosis.

By mapping a novel F³⁹PxPxxLxxxxL⁵⁰ motif (FPL motif) in the dsRBD2 of STAU1, responsible of the interaction with the co-activators of APC/C, CDC20 and CDH1, and its subsequent degradation, we were able to identify a total of 15 proteins mostly involved in the inflammatory process that share this sequence with STAU1. We proved, by co-transfection and degradation assays that, MAP4K1, one of the proteins that shares this motif, is also degraded via this FPL motif. However, we demonstrated that this motif on MAP4K1 is not the target of APC/C. Biotinylation techniques of proteins near STAU1 allowed us to identify TRIM25, an E3 ubiquitin ligase involved in immune regulation and inflammation, as a protein involved in the degradation of STAU1 and MAP4K1 via the FPL motif. This suggests roles of STAU1 in the regulation of the inflammatory events, which is consistent with recent studies that associate STAU1 with this process. We consider that the FPL motif could be at the basis of the coordination of the regulation of proteins involved in inflammation and the regulation of the immune response.

Our studies on the anti-proliferative effect of STAU1 when overexpressed in transformed cells identified the domain dsRBD2 of STAU1 as responsible for this phenotype. Mutants

that mimic different phosphorylation states of serine 20, located in dsRBD2, underlie changes in the regulation of translation and degradation of STAU1-linked mRNAs. These STAU1-dependent changes in mRNA regulation are associated with the proliferation impairment of transformed cells that is observed upon overexpression of STAU1. We also discovered that, after STAU1 transfection, the cell rapidly triggers apoptotic events, and that these events are also dependent on the phosphorylation state of serine 20 in dsRBD2 of STAU1. These results suggest that STAU1 is a sensor that controls the balance between cell survival and cell proliferation and that the state of phosphorylation of its dsRBD2 is the basis of this control.

Our results indicate that the dsRBD2 of STAU1 is the regulatory domain of the level of protein expression and a modulator of the protein roles as a post-transcriptional factor. We believe that targeting the regulation of STAU1 and its functions located in its dsRBD2 domain, would be important in the study of diseases that involve apoptosis, inflammation and cell proliferation events such as cancer.

Keywords: Staufen1, post-transcriptional regulation, apoptosis, cell cycle, cell proliferation, SMD, inflammation, cancer, degradation, E3 ubiquitin ligase

Table de matières

Résumé.....	5
Abstract.....	7
Table de matières.....	9
Liste des tableaux	12
Liste des figures	13
Remerciements	19
1. Introduction.....	20
1.1 Généralités du cycle cellulaire	21
1.1.1 Esquisse du cycle cellulaire	21
1.2 La régulation du cycle cellulaire	28
1.2.1 Le contrôle du cycle cellulaire par les complexes Cyclines-Kinases	29
1.2.2 Régulation du cycle cellulaire par dégradation de protéines via les E3 ubiquitine ligases.....	31
1.3 Les complexes SCF et APC/C. Structure et caractéristiques	36
1.3.1 La SCF	36
1.3.2 L'APC/C	38
1.3.2.1 Ubiquitination de protéines ciblées	40
1.3.2.2 Les coactivateurs de l'APC/C.....	40
1.4 Facteurs post-transcriptionnels.....	44
1.4.1 Le domaine dsRBD	44
1.4.2 Le facteur post-transcriptionnel STAU.....	45
1.4.2.1 STAU chez la Drosophile	46
1.4.2.2 Les protéines STAU chez les mammifères	47
1.4.2.3 Les protéines STAU1 et STAU2	48
1.4.2.4 Les protéines STAU chez l'humain	49
1.5 STAU1	50
1.5.1 Aperçu de l'interaction entre STAU1 et les ARNm	51
1.5.2 Les ARNm cibles de STAU1	52
1.5.3 L'Interaction de STAU1 avec d'autres protéines	56
1.5.3.1 Facilitation de la traduction des ARNm	57
1.5.3.2 Facilitation de la dégradation des ARNm.....	58

1.5.3.3	Stabilisation de STAU1	59
1.5.3.4	Interaction avec des protéines virales	60
1.5.3.5	Entreposage des ARNm et localisation subcellulaire de STAU1	61
1.5.4	Régulation de STAU1.....	64
1.5.4.1	Régulation transcriptionnelle par E2F1	64
1.5.4.2	Régulation post-transcriptionnelle de STAU1	65
1.5.4.3	Régulation protéique.....	65
1.5.5	Dérégulation de STAU1 : conséquences	66
1.5.6	STAU1 dans les fonctions neuronales	67
1.5.7	STAU1 dans le développement neuro-musculaire	67
1.5.8	STAU1 dans la DM1.....	68
1.5.9	STAU1 dans le cycle cellulaire.....	70
1.5.10	STAU1 et le cancer.....	71
1.5.11	STAU1 dans le cycle des cellules transformées	73
1.6	Problématique et objectifs de la thèse	75
2.	Un motif de dégradation dans STAU1 définit une nouvelle famille de protéines impliquées dans l'inflammation	77
2.1	Mise en contexte de l'article 1.....	78
2.2	Contribution à l'article 1	80
2.3	Article 1.....	81
2.3.1	Abstract.....	82
2.3.2	Graphical Abstract.....	83
2.3.3	Introduction	84
2.3.4	Results	87
2.3.5	Discussion.....	103
2.3.6	Materials & Methods.....	111
2.3.7	Conclusions.....	117
2.3.8	Supplemental material.....	118
2.3.9	Acknowledgments	126
2.3.10	References.....	127
3.	Le phosphomimétisme sur la sérine 20 de STAU1 altère les fonctions posttranscriptionnelles de STAU1 et induit l'apoptose dans les cellules transformées humaines	133

3.1	Mise en contexte de l'article 2.....	134
3.2	Contribution à l'article 2	136
3.3	Article 2.....	137
3.3.1	Abstract	138
3.3.2	Introduction	139
3.3.3	Results	142
3.3.4	Discussion	160
3.3.5	Materials & Methods.....	166
3.3.6	Conclusions.....	171
3.3.7	Supplementary Materials.....	172
3.3.8	Acknowledgments	174
3.3.9	References	175
4.	Discussion générale	179
4.1	Un nouveau motif dans dsRBD2 est à la base de la dégradation de STAU1 par le système APC/C-protéasome 26S	180
4.2	MAP4K1, une protéine qui partage le motif FPL avec STAU1 n'est pas une cible de l'APC/C.....	181
4.3	Le motif FPL est partagé par des protéines pro- ou anti-inflammatoires ciblées par l'E3 ubiquitine ligase de la réponse immunitaire TRIM25.....	182
4.4	La mutation du motif FPL de STAU1 n'entraîne pas de répercussions sur la prolifération cellulaire.....	184
4.5	La surexpression de STAU1 dans des cellules transformées déclenche des événements d'apoptose, puis le ralentissement de la prolifération des cellules survivantes	185
4.6	L'expression du domaine dsRBD2 de STAU1 induit l'apoptose et affecte la prolifération des cellules transformées	186
4.7	La Ser20 du domaine dsRBD2 de STAU1 est à la base de l'apoptose et du ralentissement de la prolifération des cellules transformées	188
5.	Perspectives.....	192
6.	Conclusion.....	198
7.	Bibliographie.....	201

Liste des tableaux

Table 2-1. List of proteins with the F-P-x-P-x(2)-L-x(4)-L motif.	95
Table 2-2. List of E3 ubiquitin ligases in the proximity of STAU1 ⁵⁵ . Total spectrum count in different conditions.	100
Supplementary tables 2-S1-S6. High throughput studies results. The results can be found and downloaded at the external link:	123
Supplementary Table 2-S7. List of oligonucleotides used in this study.	123
Supplementary Table 3-S1. Selected biological process GO terms enriched in genes whose transcripts are bound by STAU1 ⁵⁵ , as identified in the following publications, can be downloaded at the external link:	172
Supplementary Table 3-S2. List of oligonucleotides used in this study (mutated nucleotides are highlighted in yellow).	172

Liste des figures

Figure 1-1. Le cycle cellulaire et ses phases.....	22
Figure 1-2. Étapes de la mitose avec exception de la cytokinèse.....	25
Figure 1-3. Représentation schématique des différents patrons d'ubiquitination.....	33
Figure 1-4. Représentation schématique du complexe SCF. Modifiée du [47].....	38
Figure 1-5. Structure de l'APC/C.....	39
Figure 1-6. Séquences comparées des trois isoformes connues de STAU1 chez l'humain.....	51
Figure 1-7. Les SBS de STAU1.....	53
Figure 2-1. RBD2 is sufficient to induce degradation of STAU1 ⁵⁵ by APC/C-UPS.....	88
Figure 2-2. The degradation motif is located within amino acids 38 and 51.....	90
Figure 2-3. Identification of the STAU1 degradation motif.....	94
Figure 2-4. MAP4K1 is degraded via the conserved degradation motif.....	96
Figure 2-5. CDC20 and CDH1 recognize the FPL-motif of STAU1 but not of MAP4K.....	99
Figure 2-6. TRIM25 is involved in STAU1 and MAP4K1 degradation via the FPL-motif.....	101
Figure 2-7. A family of proteins linked by the FPL-motif is involved in inflammation.....	106
Supplementary Figure S1. STAU1 ⁵⁵ is tagged by K11-ubiquitin chains.....	118
Supplementary Figure S2.....	122
Figure 3-1. STAU1 expression induces apoptosis in transformed cells.....	143
Figure 3-2. A molecular determinant that controls cell proliferation is present within amino acids 18 and 25.....	146
Figure 3-3. Serine 20 and threonine 21 controls cell proliferation and apoptosis.....	149
Figure 3-4. Expression of the phosphomimetic mutant S20D abrogates STAU1 ⁵⁵ -dependent translation and SMD.....	151
Figure 3-5. RBD2 expression impairs cell proliferation via serine 20.....	155
Figure 3-6. RBD2 expression impairs SMD via interference with endogenous STAU1 ⁵⁵ functions.....	157
Figure 3-7. Proposed mechanism of STAU1 ⁵⁵ -mediated cell proliferation impairment.....	164

Liste d'abréviations

3'UTR	<i>3' untranslated region</i>
5'UTR	<i>5' untranslated region</i>
ABCC11	<i>ATP-binding cassette C11</i>
ABCF1	<i>ATP binding cassette subfamily F member 1</i>
ADAR2	<i>Adenosine Deaminase RNA Specific 2</i>
ADGRG1	<i>Adhesion G-protein coupled receptor G1</i>
ADN	<i>Acide désoxyribonucléique</i>
APC/C	<i>Anaphase Promoting Complex/Cyclosome</i>
APC1	<i>Anaphase-promoting complex subunit 1</i>
APC10	<i>Anaphase-promoting complex subunit 10</i>
APC11	<i>Anaphase-promoting complex subunit 11</i>
APC2	<i>Anaphase-promoting complex subunit 2</i>
APC3	<i>Anaphase-promoting complex subunit 3</i>
APC5	<i>Anaphase-promoting complex subunit 5</i>
APC6	<i>Anaphase-promoting complex subunit 6</i>
APC7	<i>Anaphase-promoting complex subunit 7</i>
APC8	<i>Anaphase-promoting complex subunit 8</i>
APOBEC3	<i>Apolipoprotein B mRNA-editing complex 3</i>
ARF1	<i>ADP-ribosylation factor 1</i>
ARN	<i>Acide ribonucléique</i>
ARNi	<i>Acide ribonucléique d'interférence</i>
ARNm	<i>Acide ribonucléique messager</i>
ARNr	<i>Acide Ribonucléique ribosomique</i>
ATF6	<i>Activating transcription factor 6 alpha</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BioID	<i>proximity-dependent biotin identification</i>
BLNK	<i>B-cell linker protein</i>
Bub3	<i>Mitotic checkpoint protein BUB3</i>
BubR1	<i>BUB1-related protein 1</i>
C2C12	<i>Mouse myoblasts derived from C2 line</i>
CAM1	<i>cell adhesion molecule 1</i>
Cas 9	<i>Caspase 9</i>
Cdc16	<i>Cell division control protein 16</i>
CDC20	<i>Cell Division Cycle 20</i>
Cdc23	<i>Cell division control protein 23</i>
CDC25	<i>Cell division control protein 25</i>
Cdc7	<i>Cell division cycle 7</i>

Cdc7	<i>Cell division control protein 7</i>
CDH1	<i>CDC20 homolog 1</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinases</i>
CDKN1A	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i>
CDKN2B	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2B</i>
CKI	<i>Cyclin-dependent kinases Inhibitors</i>
CR1.3	<i>CRISPR STAU1 knockout cell line from HCT116</i>
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CRL5	<i>Protein CROWN ROOTLESS 5</i>
CUGBP	<i>CUG Binding Protein</i>
CUGBP	<i>CUG Binding Protein</i>
CUL7/fbxw8	<i>Cullin-7/F-Box And WD Repeat Domain Containing 8</i>
D-box	<i>Destruction box</i>
DM1	<i>Dystrophie Myotonique de Type 1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMPK1	<i>Myotonic dystrophy protein kinase</i>
DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i>
dsRBD	<i>double stranded RNA Binding Domain</i>
DTX4	<i>Protein deltex-4</i>
E2F	<i>Transcription factor family E2F</i>
E2F1	<i>Transcription factor E2F1</i>
eIF2 α	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2A</i>
EJC	<i>Exon Junction Complex</i>
E-LTP	<i>Early Long Term Potentiation</i>
EPOV	<i>Ebola virus</i>
eRF1	<i>Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1</i>
eRF3	<i>Eukaryotic peptide chain release factor subunit 3</i>
FBP	<i>F-Box Protein</i>
FM	<i>Fuseau Mitotique</i>
FPL motif	<i>F³⁹PxPxxLxxxxL⁵⁰ motif</i>
GAP43	<i>Growth-associated protein 43</i>
GFP	<i>Green Fluorescence Protein</i>
GO	<i>Gene Ontology, Pubmed</i>
GPR83	<i>G-protein coupled receptor 83</i>
HCT116	<i>human colorectal carcinoma cell line 116</i>
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i>
HECT	<i>Homologous E6AP Carboxyl Terminus</i>
HEK293	<i>Human Embryonic kidney 293</i>
HEK293T	<i>Human Embryonic kidney 293 transfected</i>
HES-1	<i>Hes family bHLH transcription factor 1</i>
hTERT-RPE1	<i>hTERT-immortalized retinal pigment epithelial cells</i>

IBDV	<i>Infectious bursal disease</i>
IFIT3	<i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3</i>
IGF2BP1	<i>Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1</i>
INK4	<i>family of cyclin-dependent kinase inhibitors INK4</i>
IR	<i>isoleucine-arginine</i>
IRCM	Institut de Recherche Cliniques de Montréal
IRE1	<i>Inositol-requiring protein 1</i>
IRES	<i>Internal Ribosomal Entry Site</i>
IRIC	Institut de recherche en immunologie et en cancérologie
KEN-box	<i>K-E-N-x-x-x-D/N motif</i>
KLF2	<i>Krueppel-like factor 2</i>
L-LTP	<i>Late-long term potentiation</i>
lncARN	long non-coding ARN
LTP	<i>Long Term Potentiation</i>
Mad2	<i>Mitotic arrest deficient protein 2</i>
Mad3	<i>Mitotic arrest deficient protein 3</i>
MAP1B	<i>Microtubule Associated Protein 1B</i>
MAP4K1	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 1</i>
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral-signaling protein</i>
MBNL1	<i>Muscleblind-like protein 1</i>
MCM2	<i>Minichromosome maintenance protein 2 homolog</i>
MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated protein 5</i>
MG132	<i>Proteasome inhibitor MG132</i>
mGluR-LTD	<i>Metabotropic Glutamate Receptors-Long Term Depression</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
mSOD	<i>mouse Cell surface superoxide dismutase</i>
NC	<i>Nucleocapsid Domain</i>
NEDD8	<i>Neddylin, Ubiquitin-like protein Nedd8</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
NLS	<i>Nucleus localisation signal</i>
NMD	<i>Nonsense-Mediated Decay</i>
NMDA	<i>N-methyl-D-Aspartate</i>
OMD	<i>Osteomodulin</i>
p15	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor p15</i>
p16	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor p16</i>
p18	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor p18</i>
p21	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor p21</i>
p27	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor p27</i>
PAX3	<i>Paired box protein Pax-3</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

PERK	<i>Proline-rich receptor-like protein kinase</i>
PERK-CHOP	<i>PERK-C/EBP homologous protein</i>
PKR	<i>Protein kinase R</i>
PNK	<i>Polynucleotide kinase</i>
PP1	<i>Protein phosphatase 1</i>
PP2A	<i>Protein phosphatase 2A</i>
Ras	<i>Rat sarcoma</i>
RB	<i>Retinoblastoma protein</i>
RBR	<i>Retinoblastoma-related protein 1</i>
Rbx1	<i>RING-box protein 1</i>
RER	<i>Réticulum Endoplasmique Rugueux</i>
RIG-1	<i>Retinoic acid-inducible gene 1 protein</i>
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>
Rluc	<i>Renilla Luciferase</i>
rt-qPCR	<i>Quantitative reverse transcription PCR</i>
SAC	<i>Spindle Assembly Checkpoint</i>
SBS	<i>Staufen-Binding-Site</i>
SCF	<i>SKP1–Cullin–F-box Protein</i>
shRNA	<i>short hairpin Ribonucleic Acid</i>
siRNA	<i>short interference Ribonucleic Acid</i>
SKP1	<i>S-phase kinase-associated protein 1</i>
SLP76	<i>Src homology 2 domain-containing leukocyte protein of 76 kDa</i>
SMD	<i>Staufen-mediated decay</i>
SOX-2	<i>SRY-Box Transcription Factor 2</i>
SPATS2	<i>Spermatogenesis Associated Serine Rich 2</i>
SSM	<i>Staufen Swapping Motif</i>
SYK	<i>Spleen Associated Tyrosine Kinase</i>
TBD	<i>Tubulin binding domain</i>
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TDP-43	<i>transactive response DNA binding protein 43</i>
TINCR	<i>Terminal differentiation-induced non-coding RNA</i>
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TPR	<i>domaines de répétitions tétratricopeptidiques</i>
TRAF3	<i>TNF receptor-associated factor 3</i>
TRAF6	<i>TNF receptor-associated factor 6</i>
TRBP2	<i>TAR (HIV) RNA-Binding Protein 2</i>
TRIM25	<i>Tripartite Motif Containing 25</i>
TRIP12	<i>Thyroid Hormone Receptor Interacting Protein 12</i>
TurboID	<i>Advanced Version of BioID</i>
UB2S	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2S</i>
UBCH10	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C</i>

UBCH5	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D1</i>
UBE2F	<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2 F</i>
UPF1	<i>up-frameshift protein 1</i>
UPF2	<i>up-frameshift protein 2</i>
UPF3	<i>up-frameshift protein 3</i>
UPS	<i>Ubiquitin Proteasome System</i>
VCAM1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
Vif	<i>Viral infectivity factor</i>
VIH	<i>Virus d'immunodeficiencie humaine</i>
VIH-1	<i>Virus d'immunodeficiencie humaine type 1</i>
VP35	<i>Viral Protein 35</i>
XlrpA	<i>Xenopus RNA-binding protein XlrpA</i>
YFP	<i>Yellow Fluorescent Protein</i>
ZNF598	<i>zinc finger protein 598</i>

Remerciements

Merci à tous et à toutes qui ont été là pour moi pendant cette grosse étape de ma vie, qui m'ont soutenu et qui m'ont écouté.

Je remercie ma mère pour être toujours là. Je remercie Luc pour ne pas lâcher et me soutenir jusqu'à la dernière minute. Merci à tous les membres du Département de Biochimie, des étudiants et des travailleurs.

Merci à tous et toutes qui prennent le temps pour lire ce papyrus.

En fin,

Merci

1. Introduction

1.1 Généralités du cycle cellulaire

1.1.1 Esquisse du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est défini comme le processus par lequel deux cellules filles sont produites à partir d'une cellule initiale, nommée cellule mère. Le cycle cellulaire peut être symétrique, si les deux cellules filles sont identiques à la cellule d'origine, ou asymétrique, si des facteurs spécifiques déterminent la différenciation ou la spécialisation d'une des cellules filles tandis que la deuxième cellule est similaire à la cellule mère. La division asymétrique est plus fréquente dans la phase embryonnaire, mais elle existe aussi dans la plupart des tissus où les cellules souches permettent la différenciation cellulaire selon les besoins de l'organisme [1].

Le cycle cellulaire est composé de deux phases fondamentales: 1) l'interphase, au cours de laquelle la cellule divise son matériel génétique et se prépare pour sa division et 2) la mitose, dans laquelle la cellule garantit la répartition du matériel génétique, préalablement dupliqué, pour permettre la création des cellules indépendantes et autosuffisantes. Cette phase se termine par la partition de la cellule mère en deux nouvelles cellules [2]. La Figure 1-1 montre la représentation schématique généralisée du cycle cellulaire.

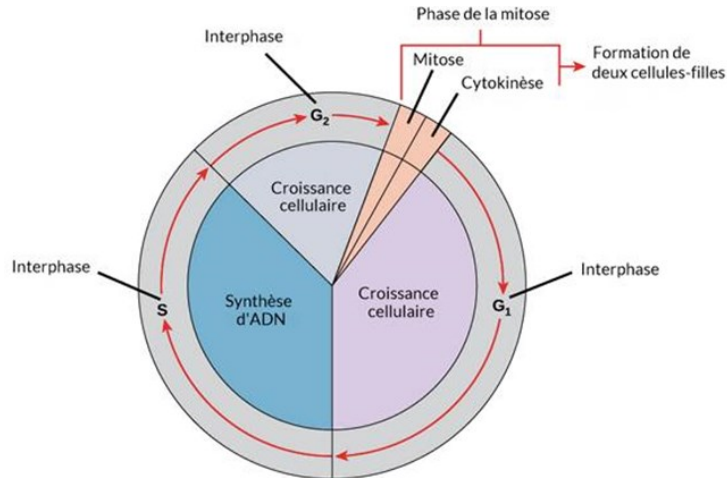


Figure 1-1. Le cycle cellulaire et ses phases. G₀ est l'état de repos de la cellule, sans croissance ou division cellulaire. L'interphase contient les phases G₁ ou de croissance, la phase S ou de réplication de l'ADN et la phase G₂, de préparation pour la mitose. La mitose (M) montre quatre phases de division, mais quelques auteurs considèrent une cinquième phase nommée prométaphase comme prélude à la métaphase, et la cytokinèse. Image pris de <https://fr.khanacademy.org/>.

L'interphase

L'interphase comporte trois étapes, soient : 1- la préparation de la cellule à la synthèse de l'ADN (phase G₁), 2- la duplication ou réplication de l'ADN (phase S) et préparation pour la mitose et 3- la vérification de la réplication et la préparation à la mitose (phase G₂) [3].

La Phase G₁

La phase G₁ (ou Gap₁) est définie comme une phase intermédiaire qui se prolonge de la fin de la mitose jusqu'au commencement de la phase S ou phase de réplication de l'ADN. Au cours de la phase G₁, la cellule effectue sa croissance, intègre les signaux

mitogènes ou anti-mitogènes et se prépare à effectuer correctement la phase S. Si la cellule ne réunit pas les conditions nécessaires pour avancer à la phase S, la cellule peut entrer dans une étape stationnaire pendant quelques heures ou jours, nommée phase G0 [3].

Le contrôle de la phase G1

La phase G1 progresse de façon réversible jusqu'au point de restriction R. Celui-ci est défini comme le point de G1 à partir duquel les cellules peuvent proliférer de façon indépendante des stimuli extérieurs [4]. La voie CDK-RB-E2F intègre les signaux externes et internes dans le contrôle de la progression jusqu'au point R et à la transition G1/S. Dans la voie CDK-Rb-E2F, des CDK (*Cyclin-dependent kinases*) inhibent Rb par phosphorylation, ce qui promeut la transcription dépendante de E2F et la progression du cycle. La compréhension de cette voie a été fondamentale pour l'étude et le traitement de certains cancers dans lesquels le point de contrôle est altéré ou inhibé suite à la perte de Rb ou à l'hyper-activation des CDK [5]. Des inhibiteurs de CDK4/6, par exemple, sont utilisés pour contrôler le contournement du point R dans certains types de cancer [6, 7].

Bien que la voie CDK-Rb-E2F soit la plus connue dans le contrôle de la transition G1/S, d'autres mécanismes sont également importants pour celui-ci. La protéine 1 de liaison à l'ARNm IGF2 (IGF2BP1), par exemple, est un facteur post-transcriptionnel non catalytique qui induit la transition G1/S en stabilisant des ARNm qui codent des régulateurs positifs de la voie tels que E2F1 [8, 9]. Son rôle a été étudié dans le contexte du cancer, mais il reste encore à élucider l'étendue de son implication dans le contexte du cycle cellulaire dans des cellules normales [8].

Phase S ou phase de réplication

La caractéristique principale de la phase S du cycle cellulaire est la réplication de l'ADN de la cellule. L'ADN, qui se trouve surenroulé autour des octomères d'histones, doit être ouvert pour permettre la synthèse des nouveaux brins. Une fois répliqué, l'ADN revient à sa conformation surenroulée, donc la duplication des histones se passe en parallèle à celle de l'ADN. Les ARNm utilisés pour la traduction des histones sont dégradés après la réplication [10].

La finalisation de la duplication de l'ADN avant le passage de la cellule à la phase G2 est fondamentale pour garantir la stabilité de l'information génétique [2, 3]. Cependant, la caractérisation d'un point de contrôle pour cette phase a été équivoque. En 2018, il a été proposé que la voie ATR agit comme point de contrôle de la phase S [11]. Cette voie serait activée en présence des dommages à l'ADN, en permettant le ralentissement de la phase S via une modification de la voie CDC25-CDK jusqu'à la correction des erreurs et la terminaison de la phase [11].

Phase G2

La phase G2 (ou Gap 2) est la phase finale de l'interphase ou phase pré-mitotique. Cette phase est considérée comme une phase préparatoire où la cellule contient le double de l'information génétique, augmente sa masse cellulaire et synthétise les éléments nécessaires à la mitose. Dans la phase G2, la cellule vérifie la fidélité de la réplication de l'ADN et d'autres éléments intracellulaires importants, et détecte des signaux qui lui permettent de réviser une dernière fois son niveau de préparation pour avancer vers l'étape de division [3].

La mitose

Généralités et phases de la mitose

La mitose s'étend de la deuxième vérification de la réplication de l'ADN jusqu'à la séparation de la cellule en deux cellules filles [2, 3]. La mitose se divise en cinq étapes fondamentales: prophase, prométaphase, métaphase, anaphase, télophase. Bien que chaque sous-étape de la mitose soit complexe, la mitose est un processus plutôt rapide et efficace [12]. Les caractéristiques fondamentales de chaque phase sont représentées brièvement ci-dessous (Figure 1-2) :

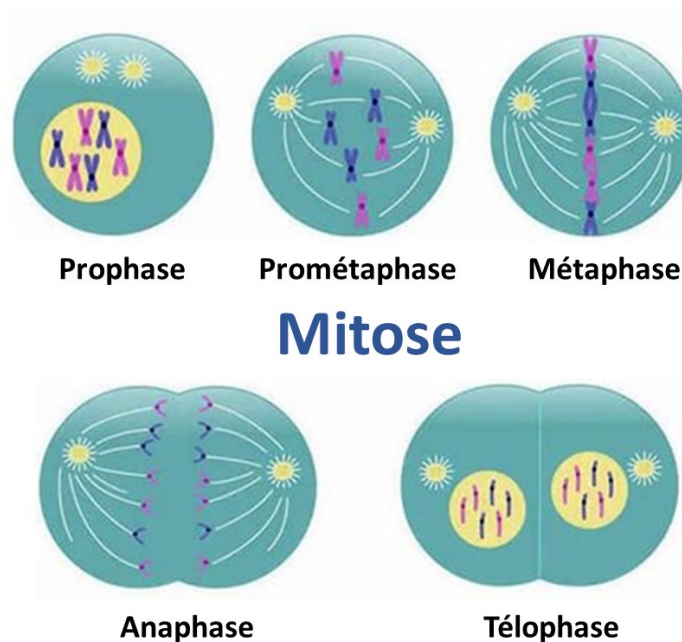


Figure 1-2. Étapes de la mitose avec exception de la cytokinèse. Représentation schématique de la cellule en cinq étapes de la mitose avec les différentes dispositions du cytoplasme (vert), du noyau (jeune foncé), des chromatides (bleu et mauve), des centrosomes (jeune clair) et des microtubules (lignes blanches). Adaptée de www.aquaportail.com.

Prophase : L'ADN se condense et les chromosomes deviennent visibles. L'enveloppe nucléaire se désagrège et les microtubules commencent à se former entre les deux centrosomes qui se déplacent vers les pôles opposés de la cellule [2, 3].

Prométaphase : La prométaphase est marquée par la dissociation de l'enveloppe nucléaire, ce qui libère les chromatides sœurs du noyau. Le centromère, qui sert de point d'ancrage entre les deux chromatides sœurs, devient entouré par une nouvelle structure protéique nommée kinétochore. Des microtubules de kinétochore s'étendent des pôles opposés de la cellule (centrosomes) et se fixent aux kinétochores [13, 14]. Durant cette étape, se forment également deux autres types de microtubules : des microtubules polaires qui se développent à partir du centrosome et qui s'étalent au centre de la cellule pour rejoindre d'autres microtubules polaires provenant du centrosome du pôle opposé et des microtubules astraux qui s'étendent du centrosome vers la membrane cytoplasmique pour l'ancrage [14].

Métaphase : Durant la métaphase, les chromosomes s'alignent de façon équidistante des pôles du fuseau. Cette disposition est nommée plaque métaphasique. Chacune des chromatides sœurs est attachée à des microtubules différents vers des pôles opposés [2, 3].

Anaphase : Le centromère de chaque chromosome est coupé en deux durant l'anaphase et les chromatides se dirigent vers les pôles des cellules via les microtubules. De plus, la cellule commence à s'étirer grâce à l'allongement des fibres du fuseau mitotique et les organelles commencent à se réorganiser pour se préparer à la division cellulaire [2, 3].

Télophase : Durant la télophase, les chromatides, maintenant nommées chromosomes filles, arrivent aux pôles opposés de la cellule. Les microtubules qui attachent les kinétochores se désagrègent et l'enveloppe nucléaire se reforme autour des chromosomes filles. Durant cette phase, les fibres du fuseau mitotique continuent à écarter les pôles de la cellule et finalement le fuseau est désintégré [2, 3].

Le point de contrôle dans la mitose

Le point de restriction le plus pertinent dans la mitose se trouve dans la transition de la métaphase vers l'anaphase [7, 15]. Durant la métaphase, la disposition des chromosomes sur la plaque métaphasique est un point sensible de la division cellulaire. Des défauts à cette étape du cycle mènent à des conséquences catastrophiques pour les cellules filles, telles que l'aneuploïdie et la mort cellulaire [16]. Pour empêcher la poursuite du cycle cellulaire dans ces circonstances, des altérations dans la disposition et la tension des microtubules aux kinétochores déclenchent l'activation du point de contrôle de l'inter-mitose, ce qui détermine majoritairement la durée de la mitose [17].

Les acteurs principaux du point de contrôle de la mitose ou SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*) sont les protéines BubR1, Bub3, Mad2 et CDC20 [17, 18]. Tant que les kinétochores ne sont pas attachés aux microtubules, ces protéines forment un complexe qui empêche le recrutement de CDC20 par l'APC/C (*Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*) [19], une E3 ligase impliquée dans la régulation par ubiquitination/dégradation de plusieurs régulateurs du cycle cellulaire. Si l'APC/C demeure inactive, la sécurine ne peut être polyubiquitinée et subséquentement dégradée par le protéasome 26S [19-21]. La sécurine reste alors attachée à la séparase, ce qui empêche la dégradation de la cohésine, une protéine qui garde les chromatides sœurs

ensembles. La transition métaphase/anaphase reste ainsi en attente jusqu'à la libération de CDC20 pour que le complexe APC/C-CDC20 devienne actif, ce qui déclenche la séparation des chromatides sœurs et le passage subséquent à l'anaphase [2, 3, 18, 22, 23].

Des mécanismes de contrôle spécifiques qui seront décrits plus loin garantissent que cette phase soit complétée avant d'avancer dans le cycle vers l'anaphase.

La Cytocinèse

Ceci est l'étape finale de la division cellulaire et elle est caractérisée par la formation de l'anneau d'actine et sa contraction dans le centre de la cellule qui permet finalement à la cellule de se diviser en deux cellules filles identiques [3, 24].

Le cycle cellulaire est donc composé d'une série d'événements synchronisés et nécessaires pour que chacune des cellules filles résultant du processus porte la même information génétique et les mêmes caractéristiques [3]. Après la division, les cellules recommencent la phase G1. Les cellules filles héritent de la capacité de division des cellules mères de retourner au cycle cellulaire selon les besoins de l'organisme [12].

1.2 La régulation du cycle cellulaire

Toute erreur dans le cadre du cycle cellulaire pourrait avoir un effet létal pour la cellule ou pourrait induire des altérations qui se traduisent par la défaillance de la cellule et le développement de maladies comme le cancer [25]. Il existe, par conséquent, un contrôle fin de chacune des étapes du cycle de façon à garantir le contrôle indépendant de chaque phase et d'empêcher le passage à la phase subséquente s'il existe une erreur quelconque [26].

Les protéines qui participent au cycle cellulaire sont régulées par différents mécanismes afin de garantir leur fonction au moment et à l'endroit précis dans le cycle. Les protéines régulatrices du cycle cellulaire sont synthétisées ou activées de façon transitoire [27]. Au moins un des quatre types de régulation suivants garantit l'activité temporelle de ces protéines: la phosphorylation-déphosphorylation, la présence d'inhibiteurs, la localisation des protéines dans la cellule et la dégradation spatio-temporelle des protéines [28].

1.2.1 Le contrôle du cycle cellulaire par les complexes Cyclines-Kinases

Les principaux régulateurs du cycle cellulaire sont les CDK [28]. Bien qu'il y ait plusieurs CDK et que leurs fonctions soient diverses, il y en a principalement quatre qui participent directement au contrôle du cycle cellulaire: CDK4 et CDK6 qui sont actives en phase G1 [26], CDK2 qui participe à la phase S et CDK1 qui est active à la fin de G2 et durant la mitose [7, 29].

Les CDK doivent former des hétérodimères avec des cyclines pour devenir actives. Dans ce cas-ci, les niveaux de cyclines sont finement régulés pendant que les CDK restent plus abondantes au cours de la mitose. Quatre types de régulation garantissent l'activité temporelle des hétérodimères cyclines/CDK: la phosphorylation-déphosphorylation, la présence d'inhibiteurs, la localisation de la protéine dans la cellule et la dégradation à travers le complexe ubiquitine/ligase [29].

Le cycle cellulaire commence à partir de signaux mitogènes qui activent la phase G1 du cycle [1]. Comme conséquence, la cellule active une cascade métabolique qui nécessite la transcription et la traduction de la cycline D. Les hétérodimères actifs cycline D/CDK4

et cycline D/CDK6 sont impliqués en phase G1 [30]. Ces complexes phosphorylent les suppresseurs de tumeurs qui inhibent le facteur de transcription E2F. E2F devient donc partiellement actif pour augmenter la transcription de gènes dont des protéines permettent à la cellule de dépasser le point de restriction G1 [31].

L'ARNm de la cycline E est l'un des transcrits produits grâce à l'activation de E2F. Le complexe cycline E/CDK2 permet la transition entre les phases G1 et S en phosphorylant une deuxième fois les inhibiteurs de E2F, ce qui active la transcription de gènes nécessaires pour ce passage [32]. Finalement, la cycline E/CDK2 phosphoryle une protéine inhibitrice du cycle, p27 pour promouvoir son ubiquitination et sa dégradation via le système ubiquitine/protéasome 26S, ce qui permet l'avancement du cycle [33]. L'activité du complexe cycline E/CDK2 favorise aussi l'accumulation de l'ARN et de la protéine Cdc7, ce qui permet l'activation de MCM2 et l'assemblage du complexe de pré-réplication MCM 2-7. Ceci est nécessaire pour le déroulement de la phase S et la réplication de l'ADN [34].

Durant l'interphase, en plus de la synthèse des cyclines D et E, l'activité des CDK est aussi dirigée par des inhibiteurs des complexes cyclines/CDK nommés globalement CKI (*Cyclin-dependent kinases Inhibitors*) [35]. Ces inhibiteurs lient directement les CDK et empêchent leur liaison aux cyclines qui permettent leur activation. Plusieurs de ces inhibiteurs sont régulés au niveau transcriptionnel par la protéine suppresseur de tumeurs p53. Le premier complexe CKI composé par les protéines INK4, p15, p16 et p18 empêche la formation du complexe cycline D/CDK 4/6 et un deuxième complexe CKI composé par p21, p27 et p57 inhibe la formation du complexe cycline E/CDK2 [35].

La cycline A est ensuite exprimée à la fin de la phase G1. Elle joint CDK2 et CDK1, en activant des substrats pour la réplication, la réparation et la vérification du nouveau brin d'ADN. Le complexe cycline A/CDK1 contrôle l'entrée de la cellule en mitose et demeure actif jusqu'à l'entrée en prométaphase [7, 32]. Au cours de la prophase, le complexe cycline A/CDK1 contribue à la condensation de la chromatine et la condensation de l'ADN. L'activation du complexe cycline B/CDK1 joue un rôle plus important dans la transition prophase/métaphase, un autre point de contrôle de la mitose qui surveille la condensation des chromosomes, la rupture de l'enveloppe nucléaire et l'assemblage du fuseau mitotique [7, 18]. Les cyclines A et B sont dégradées au cours de la métaphase par le système ubiquitine/protéasome 26S, plus spécifiquement suite à leur ubiquitination par l'E3 ligase APC/C [36]. Ceci garde les CDK inactives lorsque la cellule atteint les étapes finales du cycle et lorsque les cellules filles passent à la phase G1. L'inactivation des CDK est indispensable pour l'assemblage des origines pré-réplcatives et le commencement de la synthèse d'ADN [18].

La régulation du cycle cellulaire par CDK constitue un exemple bien décrit de l'expression transitoire des protéines au cours de la mitose [28]. D'autres systèmes régulateurs sont responsables d'assurer les niveaux appropriés de ces protéines de façon spatio-temporelle. Dans le chapitre suivant, je vous présente la contribution des complexes qui permettent l'élimination de ces protéines une fois que leurs fonctions sont accomplies au cours de la mitose [7, 18, 28].

1.2.2 Régulation du cycle cellulaire par dégradation de protéines via les E3 ubiquitine ligases

La signalisation par ubiquitination

La dégradation des complexes cycline-CDK, soit pour permettre l'activation d'autres CDK ou pour les éliminer totalement de la cellule, est fondamentale pour la progression du cycle cellulaire [28, 35]. Le mécanisme qui permet la disparition ou l'inactivation temporaire des complexes cyclines/CDK consiste à cibler ces protéines vers le protéasome 26S pour les dégrader. Celui-ci reconnaît les protéines polyubiquitinées par des complexes ubiquitine ligases qui se trouvent partout dans la cellule [29, 36, 37].

Le mécanisme de marquage des substrats à dégrader utilise l'ubiquitine. L'ubiquitination constitue une modification post-traductionnelle importante et plus complexe que la phosphorylation [38]. Plus de 3% des gènes du génome des eucaryotes sont impliqués dans le système d'ubiquitination, soit de façon directe, ou indirectement, en participant notamment dans sa régulation [39, 40]. Le processus d'ubiquitination est un système de signalisation mené par l'ajout d'une ou plusieurs ubiquitines. L'ubiquitine est une petite molécule de 8.6 kDa de structure globulaire qui se retrouve libre dans le cytosol de la cellule ou liée à elle-même ou à d'autres protéines. La liaison s'effectue via des résidus lysine par une liaison amide [40].

La conjugaison de l'ubiquitine aux protéines peut être unique (mono) ou multiple (poly) [40]. Le nombre de résidus d'ubiquitines dans une protéine ainsi que la position de la lysine dans la chaîne de poly-ubiquitines changent de façon drastique le rôle de l'ubiquitination, ce qui rend le processus complexe et engendre de multiples réponses cellulaires [40]. Ceci constitue un mécanisme polyvalent de la cellule dans lequel un même élément, soit l'ubiquitine, provoque une panoplie de destins différents pour les

protéines cibles [38, 39]. La mono ubiquitination, par exemple, est en général un signal pour diriger les protéines cibles dans des compartiments cellulaires spécifiques. La mono-ubiquitination peut être unique ou multiple, et la poly-ubiquitination peut être linéaire ou ramifiée. La position de la lysine choisie pour créer la chaîne d'ubiquitines peut aussi varier. Tous ces facteurs déterminent le type de signalisation cellulaire, tel qu'illustré dans la figure 1-3 [40].

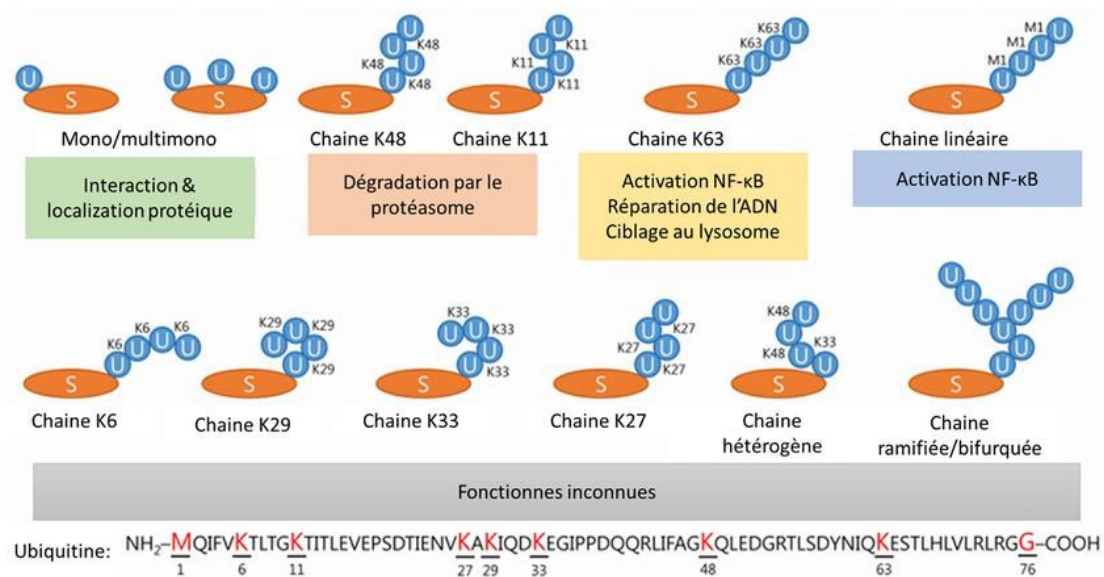


Figure 1-3. Représentation schématique des différents patrons d'ubiquitination. Les patrons d'ubiquitination changent selon la position et arrangements des ubiquitines (bleu) sur les substrats (orange) ainsi que le mécanisme(s) qui déclenche le signal spécifique d'ubiquitination. En bas, la séquence peptidique de l'ubiquitine. Les possibles résidus cibles d'ubiquitination sont marqués en rouge et agrandis. Figure modifiée de [39].

En général la poly-ubiquitination est associée à la transduction des signaux qui participent à la régulation du cycle cellulaire, la transcription, la réparation de l'ADN, la localisation des protéines et à la dégradation des cibles par le protéasome [41].

Les chaînes de poly-ubiquitines les plus représentatives et les plus étudiées dans les cellules de mammifères sont les chaînes K11, K48 et K63 [38, 42]. Il a été établi que la chaîne K48 constitue le signal de préférence pour la dégradation des protéines par le protéasome chez les levures et le minimum d'ubiquitines nécessaire pour établir le signal de dégradation est de quatre molécules [42]. Des chaînes plus longues bénéficient d'un temps plus long d'interaction de la protéine cible avec le protéasome. Les chaînes K11 et K63, de leur côté, sont des modifications préférées pour la transduction des signaux impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et la régulation de l'activité enzymatique [41].

Le rôle des enzymes E dans l'activation et la conjugaison de l'ubiquitine

Avant de lier la protéine, l'ubiquitine a besoin d'être activée, conjuguée et en interaction avec la protéine ciblée comme substrat. L'ubiquitine subit ces processus à l'aide des enzymes ubiquitine ligases E, soient E1, E2 et E3 pour chaque processus, respectivement [43].

L'enzyme E1 est unique dans l'organisme. Cependant il existe plusieurs enzymes E2 ou de conjugaison et d'enzymes E3, responsables de la sélection des cibles [44]. L'enzyme activatrice d'ubiquitination E1 recrute et active l'ubiquitine par un mécanisme dépendant de l'ATP [45]. Ensuite, l'ubiquitine forme une autre liaison thioester quand elle est

transférée à l'une des enzymes de conjugaison d'ubiquitine E2. Finalement, l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine se lie au substrat en formant un lien isopeptidique grâce à une ubiquitine-protéine ligase ou E3 ou bien à travers la propre ubiquitine E2. Plusieurs ubiquitines sont associées pour former une chaîne de poly-ubiquitines [37, 43].

Les E3 ligases sont les enzymes les plus hétérogènes dans la voie de l'ubiquitination. Il existe plus de 600 E3 ligases chez l'humain [44]. Le rôle principal et la raison de cette hétérogénéité sont que les E3 ligases sont responsables de la sélection et de la spécificité du substrat. Les E3 ligases sont classifiées dans trois grands groupes selon la présence de domaines caractéristiques et selon le mécanisme de transfert de l'ubiquitine au substrat [46]. Les E3 ligases HECT sont nommées à partir de leur domaine HECT (*Homologous E6AP Carboxyl Terminus*) localisé à l'extrémité C-terminale de l'enzyme [44]. La partie N-terminale du domaine charge l'enzyme E2 tandis que le domaine C-terminal contient une cystéine catalytique sur laquelle l'ubiquitine est transférée avant de passer au substrat. Le deuxième groupe est constitué des E3 ligases RBR qui contiennent deux domaines de type RING (*Really Interesting New Gene*) séparés par une séquence nommée en anglais *in-between-RING domain* (B) [44]. Dans ce type d'E3 ligases, le premier domaine RING charge l'enzyme E2 et le deuxième domaine RING contient la cystéine catalytique. Les E3 ligases HECT et RBR utilisent le même mécanisme de transfert de l'ubiquitine vers le substrat en utilisant la cystéine catalytique comme intermédiaire. Les E3 ligases de type RING forment le troisième grand groupe d'E3 ligases et elles sont les plus abondantes dans la cellule [44]. Elles sont caractérisées par la présence du domaine dépendant de zinc RING ou le domaine U-box qui a une conformation similaire au domaine RING mais qui ne contient pas du zinc. Ces domaines

sont responsables du recrutement de l'enzyme E2 et de la stimulation du transfert de l'ubiquitine. Les E3 ligases de type RING médient le transfert direct de l'ubiquitine vers le substrat. Elles fonctionnent comme un échafaudage qui permet le rapprochement et l'orientation de l'enzyme E2 conjuguée à l'ubiquitine et le substrat. Certaines E3 ligases avec un domaine RING peuvent fonctionner comme dimères, ce qui leur permet de charger deux enzymes E2, une pour chaque monomère. Les E3 ligases de type RING peuvent être beaucoup plus complexes, en contenant plusieurs sous-unités et d'autres domaines comme le domaine Cullin en formant des complexes E3 ligases de type Cullin-RING [46]. Les complexes SCF (*SKP1–Cullin–F-box Protein*) et APC/C sont les E3 ubiquitine ligases de type RING les plus représentatives dans la régulation du cycle cellulaire [21, 47, 48].

1.3 Les complexes SCF et APC/C. Structure et caractéristiques

1.3.1 La SCF

Comme caractéristique classique des E3 ligases de type RING, la structure de SCF ressemble à une plate-forme, à la base de laquelle se trouve une protéine de type Cullin (Cullin-1) (Figure 1-4) [47]. Les extrémités de Cullin-1 lient différentes protéines. D'un côté, la protéine Rbx1 qui contient un domaine RING caractéristique de l'E3 ligase, sert à lier les enzymes E2 conjuguées à l'ubiquitine et prêtes pour le transfert de cette dernière. À l'autre extrémité de Cullin-1 se lie la protéine SKP1, une protéine adaptatrice essentielle pour la reconnaissance des protéines de type F-Box (FBP) qui amènent les substrats au complexe pour ubiquitination [49].

Le génome humain encode 69 protéines de type FBP [50]. Ces protéines lient de façon indépendante des protéines qui, une fois agrégées, sont amenées au complexe SFC. Alors, les protéines FBP contribuent à la spécificité des substrats du complexe SFC [47]. Chaque FBP reconnaît plusieurs substrats à la suite de modifications post-traductionnelles qui constituent le signal de dégradation des cibles, telles que la phosphorylation ou la glycosylation. Une fois liée au substrat, la protéine FBP lie SKP1, ce qui rapproche le substrat à l'enzyme E2 pour son ubiquitination et dégradation par le protéasome 26S [21, 47, 51].

Au cours du cycle cellulaire, le niveau du complexe SFC est constant [52]. En revanche, l'affinité des protéines FBP aux substrats est régulée par la phosphorylation des substrats par des protéines régulatrices du cycle, les cyclines/ CDK [51, 52].

Le SCF cible une panoplie de protéines impliquées dans le métabolisme, la prolifération cellulaire, la transduction de signaux, entre autres [21]. Durant le cycle cellulaire, les protéines du complexe SCF ciblent et participent à la dégradation de la cycline E et des protéines Aurora A et B, ce qui est fondamental pour le passage de la phase G1 vers la phase S, et au début de la mitose [47]. Les substrats de l'APC/C, en revanche, sont des protéines restreintes au cycle cellulaire. Cette structure se trouve dans le noyau des cellules en interphase et dans le cytoplasme, lors de la mitose [53].

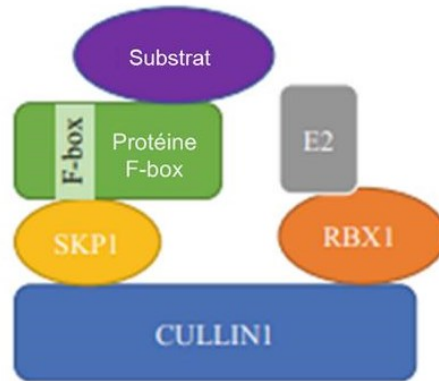


Figure 1-4. Représentation schématique du complexe SCF. Modifiée du [47].

1.3.2 L'APC/C

L'APC/C est un complexe protéique de 1,5 MDa, composé de 15 à 17 sous-unités (Figure 1-5) [54]. En fonctionnant comme la base du complexe APC/C, APC1 s'associe de façon indépendante à deux sous-complexes [55]. Le premier sous-complexe est le cœur catalytique de la protéine et il est formé par les sous-unités APC2, qui présente un domaine de type Cullin [56], et l'APC11, qui contient le domaine RING [57]. L'APC/C lie de façon transitoire deux enzymes E2: UBCH5 et UBCH10. UB2S contribue à l'allongement de la chaîne d'ubiquitine créée par UBCH5 ou UBCH10 [58]. L'autre sous-complexe qui donne la spécificité au substrat, est formé par des sous-unités avec domaines de répétitions tétratricopeptidiques (TPR) APC3/Cdc7, APC6/Cdc16, APC8/Cdc23, APC5 et APC7 [59]. La reconnaissance du substrat du lobule TPR passe par les domaines WD40 des coactivateurs CDC20/CDH1 et la sous-unité APC10 [60], qui interagissent avec les résidus isoleucine-arginine (IR) du TPR placés dans le C-terminal de l'APC3 [59].

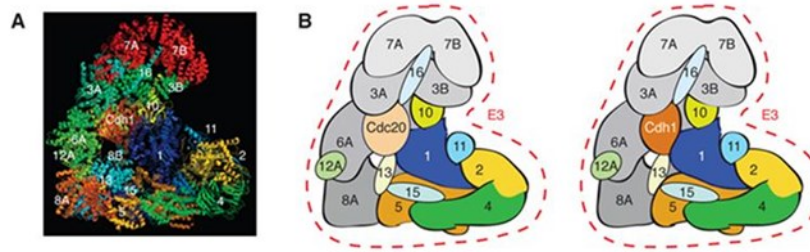


Figure 1-5. Structure de l'APC/C. A) Cette image a été obtenue de [48] qui l'a générée à partir du dossier 4UI9 (Protein Data Bank). Les numéros indiquent les représentations des sous-unités de l'APC/C. B) APC/CCDC20 et APC/CCDH1. CDC20 active l'APC/C durant la métaphase et l'anaphase pour la dégradation des substrats cycline B et sécurine, entre autres, puis CDH1 remplace CDC20 comme coactivateur pour la dégradation des substrats de l'APC/C à la fin de la mitose et en G1. Image empruntée de [48].

L'APC/C constitue le principal enzyme dans la voie de signalisation de protéines pour la dégradation de protéines dans le cycle cellulaire [48]. On pourrait se demander si un seul complexe est capable de cibler toutes les protéines qui doivent être dégradées à différents moments de la mitose. L'APC/C est en effet capable de lier différents substrats à des moments différents, en assurant que chacun d'eux soit dégradé au moment précis [61]. En prenant comme exemple les complexes cycline/CDK, des études ont montré que l'APC/C participe à la dégradation de la cycline A en phase S, mais il ne cible la cycline B qu'à l'entrée de la cellule en métaphase [62, 63]. Des mécanismes spécifiques d'ubiquitination et la présence de protéines qui lient de façon transitoire l'APC/C, sont responsables de la spécificité spatio-temporelle de l'APC/C sur ses substrats [64].

1.3.2.1 Ubiquitination de protéines ciblées

Chez les humains, le substrat cible est ubiquitiné sur les lysines 11, 48 ou 63 [38, 42], mais préférentiellement sur la lysine 11 [65]. Jusqu'à présent, la raison de cette préférence est inconnue, mais plusieurs auteurs pensent que les substrats marqués sur la lysine 11 pourraient être reconnus comme cibles de l'APC/C par un mécanisme de régulation qui implique des enzymes de dé-ubiquitination. Ces substrats cibles en lysine 11 peuvent subir des phénomènes d'ubiquitination-dé-ubiquitination, ce qui permettrait de les garder actifs plus longtemps dans le cycle cellulaire [66], effet qui n'arrive pas dans l'ubiquitination des lysines 48 ou 63 [38]. Cette hypothèse propose que la position de la lysine cible détermine le destin du substrat et explique les différences temporelles de la dégradation des substrats ciblés par le même complexe d'ubiquitination et reconnus par le protéasome 26S pour sa dégradation [67].

1.3.2.2 Les coactivateurs de l'APC/C

Pour être fonctionnel et recruter ses substrats, l'APC/C doit lier l'un ou l'autre de ses coactivateurs, CDC20 et CDH1 [68, 69]. Ces protéines joignent l'APC/C de façon stœchiométrique et temporaire. Des motifs C-box et une queue de résidus isoleucine-arginine (IR) présents sur les deux coactivateurs semblent être responsables de la liaison à l'APC/C. Des études récentes proposent que l'union des coactivateurs à ce complexe se produit via la sous-unité APC10, et que la liaison du substrat au coactivateur amène un changement de conformation qui rend le complexe actif [63].

Les coactivateurs de l'APC/C, CDC20 et CDH1, présentent des motifs de répétitions Trp-Asp (nommées WD) très conservés. Les motifs WD lient des substrats spécifiques [70]. Le motif WD de CDC20 lie des substrats avec un D-box (Destruction Box), une séquence consensus R-x-x-L-x-x-x-N/D/E [29]. CDH1 présente une haute affinité pour des substrats qui présentent le motif D-box ou KEN-box (K-E-N-x-x-x-D/N) [71, 72]. Quelques études montrent la possibilité que la phosphorylation en zones adjacentes du D-box puisse empêcher totalement ou partiellement la reconnaissance du substrat par l'APC/C, ce qui expliquerait les différences temporelles dans la dégradation de certains substrats [73].

Le coactivateur CDC20 est transcrit et traduit en phases S et G2 [74]. L'activation de CDK1 en mitose permet l'activation de l'APC/C en augmentant son affinité pour CDC20 [75]. Cependant la phosphorylation de CDC20 par CDK1/cycline B l'empêche de lier l'APC/C [76]. Alors, la régulation de la phosphorylation de CDC20 semble être fondamentale pour l'activation du complexe [77, 78]. Il semble que les phosphatases PP2A et PP1 soient impliquées dans la déphosphorylation de CDC20, mais à date, il n'a pu être établi une relation entre l'action de ces phosphatases sur CDC20 et son affinité pour l'APC/C [79].

Le premier substrat connu de CDC20-APC/C est la cycline A en prométaphase. CDC20-APC/C cible d'autres substrats en métaphase, comme la cycline B et la sécurine, pour permettre la transition à la phase suivante [29]. Une erreur quelconque en métaphase active le point de contrôle en mitose ou SAC. Des protéines du complexe de contrôle, Mad2, BubR1 et Mad3 ciblent CDC20 et se placent aussi au cœur de l'APC/C en

empêchant son activation [17]. La stabilité des niveaux de cycline B et d'autres protéines résultant de l'inactivité de l'APC/C empêche la cellule de transiter vers l'anaphase jusqu'à ce que l'erreur soit résolue [80].

Une fois que l'activité des CDK tombe en raison de sa régulation par dégradation, l'APC/C est déphosphorée et incapable de rester associée à CDC20 [19]. Alors, CDC20 est ciblée pour ubiquitination par le complexe CDC20-APC/C et par le complexe CDH1-APC/C, plus tard en mitose, une fois que ce dernier est actif [81].

La transition de CDC20 à CDH1 est indépendante de l'état de phosphorylation de l'APC/C; cependant, la déphosphorylation de CDH1 est nécessaire [61, 82]. Dans les premières étapes de la mitose, CDH1 est phosphorylé et incapable de lier l'APC/C. Une fois que les niveaux de CDK ont baissé par l'action de CDC20-APC/C, CDH1 est déphosphoré et forme le complexe CDH1-APC/C [61]. CDH1-APC/C et CDC20-APC/C partagent quelques substrats comme la cycline B et CDC20 [70, 81]. Une fois que CDC20 est dégradé et le complexe CDH1-APC/C est majoritaire, le complexe cible des protéines associées à la formation du fuseau mitotique et à l'attachement des chromosomes au fuseau, ainsi que des régulateurs de la cytokinèse et des activateurs indirects des CDK. Ceci permet à la cellule de garder de bas niveaux de CDK pour une prochaine entrée en mitose [83].

L'inactivation de CDH1-APC/C en fin de G1 permet l'accumulation de protéines nécessaires pour la réplication de l'ADN en première phase du nouveau cycle cellulaire [84]. Plusieurs mécanismes qui contribuent à la séparation du complexe ont été proposés, mais la conséquence finale c'est que l'APC/C est inactive pendant la phase S

et G2, ce qui contribue à l'accumulation des substrats pour la nouvelle ronde de division [85].

L'APC/C est le complexe de signalisation de la dégradation protéique par excellence du cycle cellulaire [61]. Ce système dégrade des protéines qui doivent être éliminées pour permettre le passage à la phase suivante du cycle cellulaire [85]. Mais des événements comme la mitose ont besoin aussi d'une stricte régulation de la transcription et de la traduction des protéines en chaque phase de la division [86]. Des régulateurs transcriptionnels [87] et post-transcriptionnels [88] seront nécessaires pour le contrôle de l'expression transitoire de protéines, le transport des ARNm vers les zones locales de traduction et l'expression, la dégradation de certains ARN, ainsi que pour garantir que ces macromolécules soient bien réparties entre les deux cellules filles au moment de la cytokinèse. Pour compléter le cercle, l'APC/C s'occupe de la dégradation spatio-temporelle de ces régulateurs pour garantir l'efficacité et la fidélité du cycle [61].

Staufen1 (STAU1) est un régulateur post-transcriptionnel [89]. Plusieurs évidences pointent vers un rôle de cette protéine dans le cycle cellulaire à cause de son rôle régulateur sur plusieurs ARNm dont les protéines sont directement impliquées dans le cycle. STAU1 est la cible de l'APC/C suivant son interaction avec les coactivateurs CDC20 et CDH1 [90]. STAU1 est polyubiquitiné par l'APC/C en mitose, ce qui mène à sa dégradation partielle par le protéasome 26S. Des altérations dans le niveau protéique de STAU1 entraînent différentes conséquences sur la prolifération cellulaire dépendamment du type cellulaire [90]. Tandis que l'augmentation du niveau protéique de STAU1 n'affecte pas le phénotype des cellules normales, sa diminution freine les transitions G1/S et G2/M

du cycle cellulaire et la déplétion totale de la protéine semble létale pour ce type de cellules [91]. Par contraste, dans les cellules transformées, la diminution/déplétion de STAU1 n'affecte pas le cycle cellulaire alors que la surexpression ralentit la prolifération cellulaire [90, 91]. Ceci indique que les fonctions ou la régulation de STAU1 sont différentes selon le type cellulaire en faisant de la protéine un bon candidat pour l'étude de ses rôles dans des cellules normales vs cancéreuses [90, 91].

1.4 Facteurs post-transcriptionnels

Les facteurs post-transcriptionnels ont pour rôle canonique le contrôle du processus de maturation nécessaire pour la traduction des ARNm [92]. Ces facteurs post-transcriptionnels contiennent des domaines spécifiques pour lier les ARNm, ce qui leur permet de moduler leur destin via un contrôle spatio-temporel [93]. Ces mécanismes de contrôle, tels que la traduction, l'entreposage, la localisation, l'épissage alternatif ou la dégradation d'ARNm spécifiques, entre autres, garantissent l'adaptation de la cellule aux conditions spécifiques le plus rapidement possible. Les protéines impliquées dans ce processus sont souvent capables de s'associer aux ARNm via des domaines de liaison à l'ARNm double brin ou dsRBD (*double stranded RNA Binding Domain*) [93, 94].

1.4.1 Le domaine dsRBD

Les dsRBD sont des domaines de 65 à 70 acides aminés. Ils sont présents, en général répétés plus d'une fois, dans plusieurs protéines impliquées dans presque tous les évènements liés au métabolisme des ARNm [95].

Le domaine dsRBD présente une structure conservée de forme α - β - β - β - α [93]. L'interaction avec l'ARNm requiert cinq à six résidus du domaine dsRBD [96]. L'étude par

cristallographie du domaine dsRBD lié à l'ARN a permis d'observer que le sillon mineur de l'ARN interagit avec la boucle située entre les deux premiers feuilletts β du domaine dsRBD et que le sillon majeur interagit à la fois avec la boucle formée par le dernier feuillet β et la dernière hélice α [96]. Bien que les résidus qui interagissent directement avec l'ARNm soient conservés entre les espèces, la séquence de l'ARNm ne semble pas conservée. Le double brin d'ARN qui est lié aux dsRBD peut-être formé de façon intra- ou intermoléculaire avec une taille minimale de 9 à 12 pb [94, 95, 97].

Dans la catégorie des protéines de liaison à l'ARNm double brin, une protéine peut contenir plusieurs dsRBD [93]. En plus des dsRBD fonctionnels, ces protéines peuvent également contenir des dsRBD incomplets, soit des dsRBD qui ne conservent que la partie C-terminale du domaine [95]. Il a été proposé que ces domaines incomplets fonctionnent comme des domaines d'échafaudage pour le recrutement d'autres protéines importantes dans le destin des ARNm liés, ou pour son auto-régulation [95, 97]. Cependant, des études récentes ont montré que ces dsRBD incomplets peuvent aussi lier les ARNm *in vivo* et que ces domaines participent de façon essentielle à la reconnaissance des ARNm [98]. Les différents rôles des dsRBD fonctionnels et dsRBD incomplets n'ont pas été complètement élucidés.

1.4.2 Le facteur post-transcriptionnel STAU

Staufen (STAU) est une protéine conservée évolutivement et étudiée pour la première fois chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) [94]. Elle a été identifiée parmi la panoplie de gènes maternels impliqués dans le développement de la mouche. Chez la drosophile, l'expression de STAU est fondamentale pour la localisation des ARNm

d'origine maternelle [99]. Sa présence est en effet vitale pour le développement de l'embryon, vu que sa déplétion mène à des défauts embryonnaires qui ne sont pas compatibles avec la vie [100]. La déplétion de STAU chez la mouche adulte provoque des problèmes liés à la mémoire et au système nerveux [101, 102].

1.4.2.1 STAU chez la Drosophile

La formation de cellules spécialisées est fondamentale durant l'embryogenèse [99]. Pour ce faire, les cellules précurseurs ont besoin de mécanismes qui permettent la distribution asymétrique des protéines de façon spatio-temporelle. Dans le cas de la drosophile, un exemple de ce mécanisme est la distribution des ARNm *bicoid* et *oskar* aux pôles antérieur et postérieur, respectivement, ce qui détermine l'axe antéro-postérieur primaire de l'embryon. Dans ces deux cas, la protéine responsable du déplacement et de la localisation de ces ARNm est STAU [100, 101].

Après la fertilisation, STAU transporte l'ARNm *bicoid* de façon dépendante aux microtubules au pôle antérieur, ce qui ultimement mènera à la formation de la tête et du thorax [99, 103]. Plus tard, STAU permet le déplacement de l'ARNm *oskar* vers le pôle postérieur, ce qui permettra la formation de l'abdomen [103].

Le facteur post-transcriptionnel STAU est composé de cinq dsRBD chez la drosophile. Les domaines dsRBD1, dsRBD3 et dsRBD4 lient les ARNm in vitro, tandis que les domaines incomplets dsRBD2 et dsRBD5 semblent jouer un rôle de support dans les fonctions principales de la protéine [100, 103]. Dans le cas, par exemple, du transport de l'ARNm de la protéine *oskar*, il est observé qu'une insertion dans le domaine partiel dsRBD2 est responsable du transport de la protéine sur les microtubules, possiblement

via une interaction directe entre STAU et la tubuline [104]. De même, le domaine partiel dsRBD5 permet la dérégulation de la traduction de l'ARNm *oskar* une fois arrivé à destination, vraisemblablement via une interaction avec des facteurs d'initiation de la traduction [105], ce qui a fait ressortir l'importance des interactions protéine-protéine dans les fonctions post-transcriptionnelles de STAU.

Plus tard, dans le développement de la drosophile, STAU est localisé de façon asymétrique dans les neuroblastes et les cellules épithéliales. La protéine Miranda sert de guide à la localisation de STAU en interagissant avec le domaine dsRBD5 pendant les divisions cellulaires [102]. STAU, à son tour, localise de façon spécifique l'ARNm de la protéine Prospero qui sera hérité par l'une des cellules filles, ce qui sera déterminant pour le destin des cellules mères ganglionnaires [106]. De cette façon, STAU, grâce à ses domaines dsRBD2 et dsRBD5, utilise les réseaux de microtubules et d'actine, respectivement, pour transporter les ARNm à des endroits spécifiques de la cellule [105].

De plus, dans le système nerveux, STAU, en présence du répresseur traductionnel Pumilio, recrute des ARNm dans des granules polaires et réprime leur expression jusqu'à ce que des événements de dépolarisation des neurones permettent le transport et la traduction des produits géniques nécessaires à la formation de la mémoire synaptique [107].

1.4.2.2 Les protéines STAU chez les mammifères

Chez les mammifères, ils existent deux protéines homologues de STAU, soit STAU1 et Staufen2 (STAU2) [108, 109]. Bien que la protéine STAU de la drosophile contienne cinq dsRBD [94], STAU1 et STAU2 chez les mammifères n'en contiennent que quatre [109,

110]. Les dsRBD de STAU1 sont similaires aux dsRBD 2 à 5 de STAU [109] tandis que les dsRBD de STAU2 sont similaires aux dsRBD 1 à 4 de son homologue chez la drosophile [108]. Le pourcentage d'identité de séquence entre STAU1 et STAU2 est de 51% [111]. Ceci indique que ces paralogues chez les mammifères pourraient avoir des rôles moléculaires similaires mais non-identiques et que les fonctions physiologiques pourraient différer.

1.4.2.3 Les protéines STAU1 et STAU2

STAU1 et STAU2 sont exprimés dans le règne animal et notamment chez tous les mammifères [109, 112]. Chacune de ces protéines lie des ARN double-brin et fonctionne comme un facteur post-transcriptionnel [111]. Cependant, la sous-population des ARNm liées par chacune de ces deux protéines est divergente [111, 113]. STAU1 et STAU2 sont des protéines ubiquitaires bien que STAU2 ait une prépondérance pour le système nerveux et le cœur [112]. Au niveau cellulaire, les deux protéines sont majoritairement cytoplasmiques, mais ils contiennent des motifs de localisation au noyau (NLS) qui leur permettent le passage au noyau [113, 114].

STAU1 et STAU2 jouent un rôle fondamental au niveau neuronal dans le transport des ARNm vers les dendrites [115]. STAU2 est une protéine primordiale pour la survie et la migration cellulaire dans le développement du poisson zébré [116] et dans la régulation de la taille de l'œil chez le poulet en développement. Dans ce dernier cas, STAU2 régule de façon directe le destin de deux ARNm, *HES-1* et *SOX-2*, impliqués dans le développement de l'œil et leur dérégulation due à l'absence de STAU2 induit la microphthalmie [117]. STAU1 est aussi présent dans les oocytes du poisson zébré et du

xénope où son expression est fondamentale pour le transport de certains ARNm, dont la *Cycline B1*, vers les pôles animal ou végétal, respectivement [116, 118]. Chez la souris, l'expression de STAU1 est fondamentale pour la morphogenèse des épines dendritiques et le transport des complexes ribonucléoprotéiques vers les dendrites [119]. Dans les neurones de l'hippocampe, STAU1 participe au transport et à la traduction locale des ARNm, ce qui permet l'établissement de nouvelles synapses. De fait, la présence de STAU1 est fondamentale pour plusieurs formes de plasticité synaptique telles que l'établissement de la mémoire à long terme ou L-LTP (*Late-long term potentiation*) [120] et pour la croissance et la maturation des épines dendritiques [121]. Contrairement à STAU1, STAU2 n'est pas requis pour L-LTP. Nonobstant, STAU2, mais non STAU1, est nécessaire pour la localisation de l'ARNm *Map1b* aux dendrites, un transcrite requis pour l'établissement de la dépression à long terme (mGluR-LTD) [122].

1.4.2.4 Les protéines STAU chez l'humain

Chez l'humain, le gène de STAU1 est retrouvé au site 20q13 du chromosome 20 [109] alors que celui de STAU2 est retrouvé sur le chromosome 8 au site 8q13 [108]. Les deux protéines, STAU1 et STAU2, expriment trois et quatre isoformes majoritaires, respectivement. Pour STAU2, les masses moléculaires des isoformes sont de 62 kDa, 59 kDa, 56 kDa et 52 kDa [112]. Pour STAU1, la plus grande isoforme a une masse moléculaire de 63 kDa (STAU1⁶³) alors que les deux autres isoformes ont une masse moléculaire de 55 kDa (STAU1⁵⁵ et STAU1ⁱ) [110]. La différence entre les isoformes de 63 et 55 kDa est représentée à la Figure 1-6 et se résume à la présence d'une extension de 81 acides aminés à l'extrémité N-terminale de la protéine de 63 kDa par rapport à la protéine de 55 kDa. Les isoformes STAU1⁵⁵ et STAU1ⁱ diffèrent suite à un épissage

alternatif qui insère une séquence de six acides aminés (SFPLKQ) dans le dsRBD3 de STAU1ⁱ, ce qui lui enlève la capacité de lier les ARNm [123]. L'isoforme STAU1⁵⁵ a été cloné et ciblé dans plusieurs études dans le but de déterminer les rôles moléculaires et physiologiques de la protéine à des fins de recherches fondamentales et potentiellement cliniques [90, 91, 114, 124-128].

1.5 STAU1

STAU1⁵⁵ présente un total de cinq domaines : quatre dsRBD nommés dsRBD2, 3, 4 et 5 par homologie avec STAU de drosophile et un domaine de liaison à la tubuline, TBD (*Tubulin binding domain*) [109]. Le TBD se retrouve entre les résidus 282 et 373 de STAU1⁵⁵, soit entre les domaines dsRBD4 et dsRBD5 [110]. Le nom du domaine TBD dérive de l'homologie avec le domaine de liaison aux microtubules de la protéine MAP1B (*Microtubule Associated Protein 1B*), avec 66% de similarité [110]. La protéine STAU2 contient aussi un TBD avec une identité de séquence de 18% par rapport à celui de STAU1 [128].

STAU1_HUMAN	1	MSQVQVQVQNPSAALSGSQILNKNQSLLSQPLMSIPSTTSSLPSENAGRPIQNSALPSAS	60
STAU1_HUMAN	1	-----	0
STAU1_HUMAN	1	-----	0
STAU1_HUMAN	61	ITSTSAAAESITPTVELNALCMKLGKKPMYKFVDPYSRMQSTYNYNMRGGAYPFRYFYFF	120
STAU1_HUMAN	1	-----MKLGKKPMYKFVDPYSRMQSTYNYNMRGGAYPFRYFYFF	39
STAU1_HUMAN	1	-----MKLGKKPMYKFVDPYSRMQSTYNYNMRGGAYPFRYFYFF	39

STAU1_HUMAN	121	FVFPFLLYQVELSVGGQQFNGKQKTRQAAKHDAAAKALRILQNEPLFERLEVNGRESEEN	180
STAU1_HUMAN	40	FVFPFLLYQVELSVGGQQFNGKQKTRQAAKHDAAAKALRILQNEPLFERLEVNGRESEEN	99
STAU1_HUMAN	40	FVFPFLLYQVELSVGGQQFNGKQKTRQAAKHDAAAKALRILQNEPLFERLEVNGRESEEN	99

STAU1_HUMAN	181	LNKSEISQVFEIALKRNLVNF-----VARESGPPHMKNFVTKVSVGEFVGEQEGKSK	234
STAU1_HUMAN	100	LNKSEISQVFEIALKRNLVNF-----VARESGPPHMKNFVTKVSVGEFVGEQEGKSK	153
STAU1_HUMAN	100	LNKSEISQVFEIALKRNLVNFESFLLKQVARESGPPHMKNFVTKVSVGEFVGEQEGKSK	159

STAU1_HUMAN	235	KISKKNAAIAVLEELKKLPPLPAVERVKPRIKKKTKPIVKPQTSPEYQGINPISRLAQI	294
STAU1_HUMAN	154	KISKKNAAIAVLEELKKLPPLPAVERVKPRIKKKTKPIVKPQTSPEYQGINPISRLAQI	213
STAU1_HUMAN	160	KISKKNAAIAVLEELKKLPPLPAVERVKPRIKKKTKPIVKPQTSPEYQGINPISRLAQI	219

STAU1_HUMAN	295	QQAkkeKEFEYTLTERGLPRRREFVMQVKGHNHTAEGTGTNKKVAKRNAENMLEILGF	354
STAU1_HUMAN	214	QQAkkeKEFEYTLTERGLPRRREFVMQVKGHNHTAEGTGTNKKVAKRNAENMLEILGF	273
STAU1_HUMAN	220	QQAkkeKEFEYTLTERGLPRRREFVMQVKGHNHTAEGTGTNKKVAKRNAENMLEILGF	279

STAU1_HUMAN	355	KVPOAQPTKPKALKSEKTPIKKPGDGRKVTFFEPGSGDENGTSNKEDEFRMPYLSHQQLP	414
STAU1_HUMAN	274	KVPOAQPTKPKALKSEKTPIKKPGDGRKVTFFEPGSGDENGTSNKEDEFRMPYLSHQQLP	333
STAU1_HUMAN	280	KVPOAQPTKPKALKSEKTPIKKPGDGRKVTFFEPGSGDENGTSNKEDEFRMPYLSHQQLP	339

STAU1_HUMAN	415	AGILPMVPEVAQAVGVSQGHHTKDFTRAAPNPAKATVTAMIARELLYGGTSFTAETILKN	474
STAU1_HUMAN	334	AGILPMVPEVAQAVGVSQGHHTKDFTRAAPNPAKATVTAMIARELLYGGTSFTAETILKN	393
STAU1_HUMAN	340	AGILPMVPEVAQAVGVSQGHHTKDFTRAAPNPAKATVTAMIARELLYGGTSFTAETILKN	399

STAU1_HUMAN	475	NISSGHVPHGPLTRPSEQLDYLSRVQGFQVEYKDFPKNNKNEFVSLINCSSQPPLISHGI	534
STAU1_HUMAN	394	NISSGHVPHGPLTRPSEQLDYLSRVQGFQVEYKDFPKNNKNEFVSLINCSSQPPLISHGI	453
STAU1_HUMAN	400	NISSGHVPHGPLTRPSEQLDYLSRVQGFQVEYKDFPKNNKNEFVSLINCSSQPPLISHGI	459

STAU1_HUMAN	535	GKDVESCHDMAALNLIKLLSELDDQOSTEMPRTGNGPMSVCGRC	577
STAU1_HUMAN	454	GKDVESCHDMAALNLIKLLSELDDQOSTEMPRTGNGPMSVCGRC	496
STAU1_HUMAN	460	GKDVESCHDMAALNLIKLLSELDDQOSTEMPRTGNGPMSVCGRC	502

Figure 1-6. Séquences comparées des trois isoformes connues de STAU1 chez l'humain. La première séquence représente STAU1⁶³, la deuxième STAU1⁵⁵ et la troisième STAU1ⁱ. Uniprot.org

1.5.1 Aperçu de l'interaction entre STAU1 et les ARNm

Bien que STAU1 ait quatre domaines de liaison à l'ARN double brin, seuls les dsRBD3 et dsRBD4 permettent l'ancrage à l'ARN [110]. Le domaine dsRBD3 montre une affinité plus élevée pour les ARNm que les autres dsRBD de la protéine et il semble être le domaine responsable de cette liaison [105]. La déplétion du domaine dsRBD3 de STAU1

est suffisant pour empêcher la protéine d'accomplir ses fonctions liées à la liaison des ARNm; le domaine dsRBD3 est le déterminant pour que STAU1 fonctionne comme facteur post-transcriptionnel de l'expression génique [105]. Le domaine dsRBD4 lie aussi l'ARNm, mais sa contribution est beaucoup moins importante que celle du dsRBD3, du moins *in vitro* [110]. Plusieurs études montrent qu'il existe plusieurs différences entre les dsRBD par rapport à leur affinité pour lier les ARNm. Les domaines qui lient moins bien les ARNm pourraient collaborer avec les dsRBD plus puissants. Le domaine dsRBD4 est placé dans cette catégorie puisque sa capacité à lier l'ARN varie *in vitro* et *in vivo* [129].

1.5.2 Les ARNm cibles de STAU1

Bien qu'identiques à 51%, STAU1 et STAU2 lient des sous-population d'ARN majoritairement différentes [111]. La similitude de la séquence peptidique pourrait justifier que la liaison des deux protéines STAU à l'ARN dépende de la présence d'une structure double-brin spécifique sur l'ARN connue comme SBS (*Staufen-Binding-Site*) [130]. Cette structure double brin peut être intramoléculaire, formée par une tige de 12 à 19 paires de bases complémentaires. Cette structure peut être aussi formée par des séquences Alu inversées. Des séquences Alu double brin peuvent également être formées sur l'ARNm par des interactions intermoléculaires, soit par la liaison d'un long ARN non-codant contenant un élément Alu ou par des séquences Alu complémentaires sur un ARNm différent [128, 131] (Figure 1-7). Les protéines STAU1 et STAU2 lient beaucoup plus spécifiquement les ARN *in vivo* qu'*in vitro* ce qui suggère la présence d'autres mécanismes ou de déterminants impliqués au-delà de l'association physique entre les molécules qui expliqueraient les différences par rapport à leur ARN cibles [132].

l'interaction *in vitro*, elles sont des déterminants importants pour l'interaction de STAU1 avec cet ARNm *in vivo* [129].

La séquence et la structure des ARNm sont essentielles pour leur interaction avec STAU1 et la position des SBS dans l'ARN est une des clés qui détermine la forme de régulation exercée sur ces derniers [129]. Les SBS peuvent être retrouvés dans l'extrémité 5', la zone codante ou le 3'UTR des ARNm. L'interaction de STAU1 avec des SBS localisés dans l'extrémité 5' des ARNm facilite l'initiation de la traduction [89]. Certaines structures complexes dans le 5'UTR des ARNm constituent une cible de STAU1. Ceci est le cas de la séquence TAR des ARNm du VIH-1 [89, 133]. La séquence TAR est présente dans plusieurs transcrits du virus. Elle forme une structure secondaire complexe qui consiste en une tige double brin avec un renflement, ce qui inhibe la traduction en rendant l'ARNm inaccessible aux facteurs d'initiation de la traduction [89]. Des essais dans les lysats de réticulocytes de lapin et dans des cellules humaines HEK293 ont montré que l'expression de STAU1 induit une augmentation de la traduction du reporteur qui contient une séquence TAR dans le 5'UTR [89]. De plus, il a été récemment découvert que STAU1 agit comme un régulateur de la régulation d'ARN avec une structure de type IRES (Internal Ribosomal Entry Site) et permet leur traduction CAP-indépendante, dans la traduction de l'ARN viral du VIH-1 [133]. Il a été postulé que STAU1 facilite l'approche des polysomes aux transcrits qu'elle lie par son 5'UTR ce qui résulte en une augmentation de l'initiation de la traduction [89].

L'association de STAU1 à des SBS situés dans l'extrémité 3'UTR des ARNm a été plutôt associée à la dégradation des ARNm qui sont liés [134]. Ce mécanisme de dégradation spécialisé et dépendant de STAU1 a été nommé SMD (*Staufen-mediated decay*) [135].

Le SMD a été caractérisé par l'étude de l'association de STAU1 à un ARNm cible, ARF1 [136]. *ARF1* code pour une protéine G liée à Ras qui régule le trafic membranaire et la structure des organelles [137]. Au laboratoire du Dr. DesGroseillers, l'ARNm ARF1 a été identifié comme une cible naturelle de STAU1 par deux méthodes de détection différentes [134]. Plus tard, ce groupe a déterminé que la structure minimale de l'ARNm Arf1 qui est ciblée par le dsRBD3 de STAU1 consiste en une tige de 19 pb, entre les nucléotides 75-93 et 212-194 de son 3'UTR. Cette tige est conservée chez *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus* et *Mus musculus* [138].

Le 3' UTR de l'ARNm ARF1 a été utilisé pour l'analyse du fonctionnement du SMD et pour déterminer la signature des ARNm cibles de STAU1 [138]. Très récemment, en 2020 un groupe de chercheurs a trouvé pour la première fois la reconnaissance spécifique des dsRBD3 et dsRBD4 à une base guanine dans l'hélice mineur du SBS de l'ARNm ARF1, ce qui montre des caractéristiques de séquence dans la reconnaissance de STAU1 aux ARNm cibles [136].

Bien que le SMD soit le mécanisme général qui est déclenché une fois que les ARNm lient la protéine par le 3'UTR [139], STAU1 se lie aussi à des séquences du 3'UTR et région codante avec différentes conséquences [128, 132]. Il a été montré que les ARN avec une grande proportion de bases GC dans ces régions sont associés à des niveaux élevés de STAU1 qui conduisent à de plus grandes densités de ribosomes. Ceci suggère

un rôle général pour STAU1 dans la modulation de la traduction via une facilitation de l'élongation [132]. La taille de la tige dans la région codante semble être un facteur important et proportionnel au niveau de traduction de l'ARNm [140] et sa structure détermine la liaison forte de STAU1 à des régions codantes et au 3' UTR. Ceci mène en général à une augmentation de l'association de l'ARN aux polysomes. Il a été suggéré que quand l'effet contraire est observé, les possibles responsables seraient des séquences riches en bases AU dans les 3' UTR des isoformes alternatives qui pourraient recruter des protéines antagonistes ou déstabiliser les structures de l'ARN [141].

1.5.3 L'Interaction de STAU1 avec d'autres protéines

Pour bien remplir son rôle dans le contrôle post-transcriptionnel, il est clair que STAU1 ne peut pas simplement lier une sous-population d'ARNm mais qu'il doit aussi établir des interactions spécifiques avec des cofacteurs [90, 91, 125, 130].

Il existe deux sortes d'interaction de STAU1 avec d'autres protéines qui sont importantes pour permettre à la protéine d'exercer son rôle comme facteur post-transcriptionnel, soit des interactions directes ou des interactions indirectes. Les interactions directes constituent les interactions physiques que STAU1 établit avec d'autres protéines indépendamment de son association avec des ARNm cibles. L'une de ces interactions résulte en la formation d'homodimères entre deux molécules de STAU1 ou d'hétérodimères entre STAU1 et STAU2, ce qui permet alors la liaison aux ARNm cibles [126]. D'un autre côté, les interactions indirectes sont des associations entre STAU1 et d'autres protéines pour lesquelles les ARNm fonctionnent comme des molécules d'échafaudage [111, 142]. Ce type d'association se retrouve dans les complexes

ribonucléoprotéiques riches en STAU1 liée aux ARNm et à d'autres protéines [111]. Dans tous les cas, ces interactions sont déterminantes pour permettre la modulation des différents destins des ARNm qui sont ciblés par STAU1 [111].

Il est observé que les interactions protéine-protéine de STAU1 sont des déterminants de la diversité des rôles physiologiques entre STAU1 et d'autres protéines de liaison à l'ARN double brin, telles que PKR [143], TDP-43 [144], UPF1 et STAU2 [130]. L'interaction de STAU1 avec d'autres protéines permet sa propre régulation dans des conditions spécifiques [130].

1.5.3.1 Facilitation de la traduction des ARNm

Il a été déjà mentionné que l'interaction de STAU1 avec l'extrémité 5' des ARNm facilite leur traduction et que dans le contexte du VIH, STAU1 agit comme un régulateur positif de la traduction CAP-indépendante [110, 133]. Ceci montre que les interactions protéine-protéine interviennent directement dans la capacité de STAU1 à fonctionner comme facteur post-transcriptionnel.

D'autre part, il semble que le transport des ARNm liés à STAU1 vers le RER (*Réticulum Endoplasmique Rugueux*) implique une interaction transitoire de la protéine avec les microtubules [114]. Le domaine TBD de STAU1 qui interagit *in vitro* avec la tubuline semblerait le domaine qui contient le motif de liaison pour permettre ce transport [110]. Les domaines TBD/RBD4 de STAU1, sont de leur côté, responsables de l'interaction de STAU1 avec les sous-unités ribosomiques 40S et 60S pour augmenter la traduction des ARN liés à la protéine. La présence du domaine dsRBD3 est aussi essentielle pour l'association de STAU1 aux ribosomes et la traduction des ARNm associés [89]. Des

études de spectrométrie de masse montrent aussi une interaction entre STAU1 et des cofacteurs qui pourrait faciliter la traduction des ARNm cibles [127].

1.5.3.2 Facilitation de la dégradation des ARNm

Le SMD a été établi comme le mécanisme de dégradation des ARNm liés à STAU1 par un SBS situé dans leur extrémité 3'UTR [139]. Ce mécanisme est dépendant des interactions protéine-protéine de STAU1 et compétitionne avec l'une des machineries cellulaires de contrôle de la qualité de l'ARN, soit le NMD (*Nonsense-Mediated Decay*) [139]. A la différence du SMD, où les ARNm cibles sont ceux liés par STAU1, le NMD est un mécanisme général qui cible les ARNm qui contiennent des codons de terminaison qui provoquent une terminaison de traduction prématurée. Dans la NMD, une fois que ces codons sont reconnus par une machinerie multiprotéique nommée le complexe de jonction d'exons ou EJC (*Exon Junction Complex*), la protéine UPF3 recrute la protéine périmoléculaire UPF2. Si après le premier passage par le ribosome, l'EJC n'est pas libéré de l'ARNm, UPF2 lie la protéine UPF1, qui est probablement dans un complexe avec des facteurs de terminaison de la traduction tels que eRF1 et eRF3. Ceci expose l'ARNm cible à des endonucléases et produit sa dégradation [128, 145].

Le SMD, décrit par Kim et collaborateurs en 2005, a été élucidé suite à la découverte de l'interaction directe entre STAU1 et la protéine impliquée dans le NMD, UPF1 [134]. Quand le SMD est favorisé, UPF1 se lie directement à un motif localisé entre les domaines TBD et dsRBD5 de STAU1 et recrute les facteurs requis pour la dégradation des ARNm liés à STAU1 [128, 135]. Le SBS de l'ARN ARF1 a été utilisé comme modèle pour établir le mécanisme de dégradation par SMD, mais d'autres ARNm cibles du SMD,

comme *SERPINE1* et *GAP43*, qui lient STAU par un SBS dans le 3'UTR ont été découverts [130]. Dans certaines voies de différenciation cellulaire, telles que la myogenèse, une compétition a été observée entre le SMD et le NMD pour le recrutement de protéines communes pour la dégradation des ARNm [139]. Il a été aussi montré que STAU2 participe à ce mécanisme et que, au contraire de STAU1, son interaction avec UPF1 est indépendante de la présence d'ARN [130]. D'autre part, même si l'association de STAU2 avec UPF1 semble plus forte que celle de STAU1, la diminution du niveau protéique de STAU1 ou de STAU2 affectent le SMD dans la même mesure, ce qui suggère que la contribution des deux paralogues de STAU dans le SMD est similaire [128, 130].

1.5.3.3 Stabilisation de STAU1

L'auto-association protéique est un mécanisme connu d'auto-régulation. Particulièrement, les protéines de liaison à l'ARN double brin telles que PKR [146], TRBP2, XlrpA [147], ADAR2 [148], et Rnt1p [149] utilisent ce mécanisme. Ceci est aussi le cas de la protéine STAU1 [150]. Des essais à deux hybrides chez la levure montrent que le domaine dsRBD5 de STAU1 interagit avec l'extrémité N-terminale de la protéine (dsRBD2). Cette interaction est indépendante de l'ARN [150]. Il a été proposé que l'association dsRBD2-dsRBD5 permet la formation de complexes multimériques par des interactions homo et hétérophiliques entre les dsRBD et que le dsRBD5 pourrait être important pour réguler certaines fonctions liées à la structure de STAU1 [150]. Les détails de ce mécanisme de régulation ne sont pas encore connus mais le mécanisme pourrait être comparable à celui observé pour la protéine Rnt1p chez la levure où il existe une interaction entre les domaines dsRBDs des extrémités N- et du C-terminale [151]. À date,

il a été postulé que les interactions intra- et inter-moléculaires de STAU1 pourraient compétitionner pour permettre un équilibre entre la structure et les fonctions de la protéine et que les dsRBD impliqués dans cette interaction affecteraient la stabilité de l'interaction du dsRBD3 avec les ARNm [150].

L'activation fonctionnelle de plusieurs protéines de liaison à l'ARNm requièrent son auto-association ou l'association avec d'autres protéines avec des fonctions similaires. STAU1 a aussi la capacité de s'auto-associer et de former des homodimères [126]. De plus il est aussi observé que la protéine peut former des hétérodimères avec son paralogue STAU2. La région impliquée dans l'interaction, nommée SSM (*Staufen Swapping Motif*), se retrouve entre le domaine dsRBD5 et TBD et interagit avec le dsRBD5 de la deuxième protéine impliquée dans l'interaction [126]. Cette auto-association semble donner une stabilité au complexe STAU1- ARNm double brin [128] et il est nécessaire pour le mécanisme SMD [128].

1.5.3.4 Interaction avec des protéines virales

Il est connu que, lors d'une infection virale, la machinerie de traduction cellulaire est recrutée par les virus pour la traduction de ses protéines virales, ce qui contribue au processus infectieux. STAU1 est une des protéines de liaison à l'ARN qui est souvent recrutée pour faciliter l'infection virale [152, 153]. Dans des études pour décortiquer les mécanismes des infections par des virus tels que le VIH, l'HCV, l'EBOV et l'influenza A, la déplétion de STAU1 diminue le taux d'infection virale [152, 154, 155]. Dans le cas de l'influenza A, STAU1 n'est pas fondamental pour la traduction des ARN viraux mais joue un rôle dans la formation de nouvelles particules virales dans les étapes finales de

l'infection dont la morphogenèse virale [156]. Ceci indique que, au-delà de son rôle comme protéine de liaison aux ARNm, les interactions protéiques de STAU1 avec des complexes ribonucléoprotéiques viraux sont essentielles pour l'infection virale [152].

STAU1 lie le génome viral du VIH et de l'EBOV et son association aux ribosomes semble requise pour garantir la traduction de protéines virales [154, 155]. Dans l'infection par VIH, le dsRBD2 de STAU1 interagit avec Pr^{55Gag}, le précurseur des protéines structurales du VIH-1 et régule sa multimérisation, possiblement par le recrutement des facteurs importants pour l'assemblage viral [155]. Dans ce contexte, STAU1 empêche aussi la phosphorylation du facteur de traduction eIF2 α , la protéine est aussi requise pour dissocier les granules de stress et à travers son interaction directe avec le domaine NC de la protéine de VIH Gag, STAU1 favorise la formation des nouveaux complexes de ribonucléoprotéines pour promouvoir l'encapsulation de l'ARN et l'assemblage viral [153].

Dans l'infection par l'EBOV, STAU1 interagit avec deux composantes majeures, VP35 et NP. Les résidus importants pour l'interaction ont été caractérisés pour VP35 et il a été montré que l'interaction est indépendante de l'ARN [154].

1.5.3.5 Entreposage des ARNm et localisation subcellulaire de STAU1

Les interactions de STAU1 avec d'autres protéines, soit de façon directe ou à travers les ARNm cibles, permettent à STAU1 d'avoir des localisations subcellulaires spécifiques [109, 153]. Tel est le cas de la présence de STAU1 dans des granules complexes localisés dans les dendrites. Il a été postulé que le but de ces complexes est l'entreposage de transcrits pour leur libération spécifique aux événements synaptiques nécessaires [157]. En plus de l'ARNm et de protéines de liaison comme STAU1, ces

complexes dendritiques contiennent entre autres des sous-unités de ribosomes et leur mouvement est dépendant de la présence des microtubules [125]. Il est intéressant de noter que ces deux complexes moléculaires, ribosomes et microtubules, interagissent de façon directe avec STAU1 [158].

STAU1 est colocalisé dans les complexes ribonucléiques au réticulum endoplasmique rugueux. Il semblerait que le RER crée la machinerie moléculaire qui médie et régule le transport des polyribosomes tout au long des microtubules et des filaments d'actine pour la traduction locale des ARNm [159]. L'isolement et la caractérisation des granules de transport des ARN montrent que la déplétion de STAU1 empêche la distribution des ARNm dans les dendrites [160].

La formation des granules de stress est une réponse transitoire pour l'entreposage et la protection des ARNm quand la cellule subit des conditions de stress oxydatif ou de stress du RER qui mènent à l'activation de bloqueurs de la traduction [124]. STAU1 se trouve parmi les protéines qui régule la formation des granules de stress. Cependant la protéine n'est pas l'une de ces composantes essentielles. Au contraire, l'absence de STAU1 facilite la formation des granules de stress et sa fonction antagoniste a été cartographiée à l'extrémité C-terminale, dans un domaine qui chevauche celui qui permet l'interaction avec les polysomes [153]. En effet, il semble que l'interaction de STAU1 avec les polysomes les stabilise lors d'un stress ou d'une infection telle que l'HIV [153]. Alors, il a été suggéré que STAU1 est impliquée dans la reprise de la traduction de la cellule à la fin du stress en stabilisant les polysomes et en dissolvant les granules de stress [161].

STAU1 change aussi de localisation au cours du cycle cellulaire à partir de ses interactions protéine-protéine [125]. Il a été proposé que ce changement est fondamental pour la protection et la distribution des ARNm lors du cycle. Au cours du cycle cellulaire, STAU1 semble être l'une des protéines impliquées dans l'entreposage et la répression de l'expression de certains ARNm dans des complexes ribonucléoprotéiques et des modifications post-traductionnelles pourraient être des signaux qui modulent les fonctions de STAU1 [90, 91]. Un possible mécanisme qui déclenche le signal d'entreposage des ARNm liés à STAU1 pourrait être lié à l'action de la PP1 [162]. Une interaction directe entre PP1 et un motif conservé de STAU1 (R-K-V-T-F) situé dans son domaine TBD a été documentée. La séquence est aussi retrouvée à l'intérieur de plusieurs autres protéines qui interagissent avec cette phosphatase. Vu que STAU1 ne module pas l'activité phosphatase de la protéine *in vitro*, il semblerait que PP1 soit un élément natif des particules de STAU1 et que les fonctions de STAU1 dans la cellule seraient régulées par des phénomènes de phosphorylation [162].

Une autre évidence qui supporte l'hypothèse que STAU1 distribue les ARNm lors du cycle cellulaire est le fait que l'analyse par GO (*Gene Ontology*, Pubmed) des ARNm qui sont liés à STAU1 montre que 8% de ceux-ci codent pour des protéines impliquées dans le cycle [90]. De plus, en sachant que des interactions protéine-protéine permettent à STAU1 de lier les sous-unités des ribosomes et de se transporter sur le réseau de microtubules, STAU1 pourrait participer à la localisation des ARNm et contribuer à la synthèse locale de protéines du cycle cellulaire [90].

Le dsRBD2 de STAU de la drosophile contient une boucle d'insertion riche en acides aminés aromatiques et en prolines qui coupe le domaine en deux portions, ce qui empêche la liaison de la protéine aux ARNm. Si la boucle d'insertion est délétée, la protéine STAU regagne sa capacité de lier l'ARNm *oskar* mais perd la capacité de lier les microtubules [105]. Chez l'humain, cette boucle est localisée entre les résidus 27 et 43 du côté N-terminal de STAU1 et des études récentes montrent que ces résidus confèrent à la protéine la capacité de lier le fuseau mitotique (FM) pendant la mitose [125]. La localisation de STAU1 au FM, la liaison de STAU1 à une sous-population spécifique d'ARNm et d'ARNr précurseurs et la distribution égalitaire de la protéine dans les deux cellules filles, suggèrent que STAU1 garantit la ségrégation des ARN dans les deux cellules filles pour permettre la traduction rapide des protéines nécessaires dans la cellule *de novo* [125].

1.5.4 Régulation de STAU1

1.5.4.1 Régulation transcriptionnelle par E2F1

STAU1 est un régulateur positif du cycle cellulaire impliqué dans les transitions G1/S et G2/M [90]. Des études de haut débit sur les ARN liés à STAU1 montrent que le niveau d'expression d'au moins 35 transcrits directement liés à la régulation du cycle cellulaire changent lors d'une diminution ou déplétion de la protéine. Ceci identifie STAU1 comme protéine essentielle pour la survie des cellules normales. Parmi les transcrits régulés par STAU1 se trouve le facteur transcriptionnel E2F1 [91]. E2F1 est essentiel pour la transition G1/S du cycle cellulaire et son ARNm contient un SBS dans l'extrémité 3'UTR. Des essais luciférase avec le SBS d'E2F1 montrent que STAU1 favorise la traduction de la protéine E2F1. La protéine E2F1, à son tour, régule la transcription de STAU1 de façon

positive. Ceci établit une boucle de régulation positive par laquelle la protéine E2F1 participe à la transcription de l'ARNm STAU1 et la protéine STAU1 favorise l'expression protéique de l'ARNm d'E2F1 [91].

1.5.4.2 Régulation post-transcriptionnelle de STAU1

Dans des conditions de stress, la traduction classique de la cellule est inhibée et la traduction indépendante de la coiffe est favorisée. Pour cela, certaines protéines sont activées dont les kinases PERK, ATF6 et IRE1 qui sont des senseurs transmembranaires nécessaires pour l'activation de la réponse protéique dédiée à restaurer le fonctionnement du RER [163]. L'ARNm de STAU1 contient une structure IRES dans le 5'UTR qui est activée sous des conditions de stress du RER ou par hypoxie [124]. L'activation de l'IRES de STAU1 pour sa traduction est dépendante de la protéine kinase PERK, qui a comme substrat majeur le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α , ce qui empêche la traduction CAP-dépendante. Le mécanisme n'a pas été encore complètement élucidé, mais il est possible que STAU1 soit un gène de réponse au stress qui continue à être traduit d'une façon CAP-indépendante sous des conditions d'hypoxie pour favoriser la récupération cellulaire à la suite d'un stress [124].

1.5.4.3 Régulation protéique

En plus de la régulation de STAU1 par sa localisation dans les complexes spécifiques et sur le FM au cours de la mitose via ses interactions avec d'autres protéines, un autre type de régulation fine au niveau protéique a été découvert lors du cycle cellulaire. Boulay et collaborateurs en 2014 ont suivi le niveau d'expression de STAU1 tout au long du cycle cellulaire et ils ont découvert que le niveau de la protéine est stable lors du cycle jusqu'à ce qu'il baisse drastiquement à la fin de la mitose ou l'entrée de G1 [90]. Le niveau de

l'ARNm de STAU1 reste cependant stable. La variation de son niveau protéique est la conséquence de sa dégradation protéique via le système Ubiquitine-Protéasome 26S. STAU1 co-immunoprécipite avec les deux coactivateurs de l'APC/C, CDC20 et CDH1 et la surexpression de ces coactivateurs mène à une diminution de la protéine [90].

Bien que STAU1 contienne dans le dsRBD5 une séquence consensus de reconnaissance par les coactivateurs de l'APC/C, nommée D-box [72], l'association de la protéine avec CDC20 et CDH1 a été cartographiée dans le dsRBD2 [90]. La délétion du dsRBD2 de STAU1 empêche sa dégradation en mitose. Retrouver le motif minimal de dégradation de STAU1 dépendant du dsRBD2 pourrait permettre de décortiquer l'extension de son rôle dans le fonctionnement de la protéine lors du cycle cellulaire [90].

1.5.5 Dérégulation de STAU1 : conséquences

Au cours des années, des études ont donné une grande importance à la régulation post-transcriptionnel comme forme de régulation fine et rapide du protéome de la cellule [164]. Les protéines de liaison à l'ARN sont les acteurs principaux dans cette forme de régulation. Leur liaison à plusieurs ARNm dont les protéines dérivées ont des fonctions parfois opposées mène à des phénotypes spécifiques dépendants de la régulation fine du niveau d'expression génique de ces sous-populations de transcrits [164]. La dérégulation de l'expression de ces protéines est la cause de maladies multi systémiques et cette dérégulation impacte de façon négative la pathophysiologie générée par la maladie [165].

1.5.6 STAU1 dans les fonctions neuronales

L'établissement de la mémoire à long terme (LTP) est composé d'au moins deux étapes [166]. L'étape précoce (E-LTP, *Early Long Term Potentiation*) qui dure environ une heure et qui est indépendante de la synthèse de protéines et l'étape tardive (L-LTP) pendant laquelle une synthèse maintenue de protéines est fondamentale. La L-LTP est établie grâce à la présence de protéines de liaison à l'ARN, dont STAU1, qui garantit le transport et la traduction local des ARN dans les nouveaux sites de synapses [167]. Des essais de déplétion partielle de STAU1 par ARNi, ont prouvé que la présence de STAU1 est fondamentale dans l'établissement de la L-LTP dans les neurones de l'hippocampe et son absence n'affecte pas l'E-LTP [167]. Dans ces cellules et de façon indépendante à son rôle dans la L-LTP, STAU1 est aussi essentielle pour le maintien des épines dendritiques matures et de l'activité synaptique dans les cellules pyramidales CA1 de l'hippocampe grâce à la régulation du transport des ARNm impliqués dans les altérations morphologiques de ces cellules à long terme, et ce, via un mécanisme médié par les récepteurs NMDA (*N-methyl-D-Aspartate*) [122, 167].

1.5.7 STAU1 dans le développement neuro-musculaire

D'un autre côté, STAU1 joue aussi un rôle fondamental dans la myogenèse [168] par le contrôle du SMD [139]. La différenciation des myoblastes C2C12 en myotubes est caractérisée par une augmentation du SMD et une diminution du NMD. STAU1 (protéine du SMD) partage le site de liaison d'UPF1 avec UPF2 (protéine du NMD), ce qui provoque une compétition entre ces deux mécanismes. Lorsque le niveau protéique de STAU1 favorise l'interaction avec UPF1, le SMD est enclenché et facilite la dégradation du transcrit PAX3 (paired-box 3), un inhibiteur de la différenciation musculaire. Le

déclenchement du SMD entraîne, une diminution de la voie compétitive NMD, et permet la stabilisation de l'ARN de la myogénine, une cible du NMD. La traduction de la myogénine est fondamentale pour la myogenèse [139, 169].

Si le niveau de STAU1 est élevé lors de la différenciation cellulaire, son expression dans le muscle squelettique post-natal est basse et sa dérégulation entraîne des conséquences pathologiques [170]. Un modèle de souris généré à l'Université d'Ottawa montre que la surexpression de STAU1 cause une myopathie caractérisée par des défauts morphologiques et fonctionnels. En plus des anomalies dans des voies de signalisation et l'expression de gènes associés à l'atrophie, le laboratoire du Dr. Jasmin a découvert que l'expression de PTEN est médiée par STAU1, ce qui identifie STAU1 comme un gène potentiellement associé à l'atrophie et comme un biomarqueur potentiel pour des désordres neuromusculaires [170].

Dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de la sclérose latérale amyotrophique, la présence des mutations mSOD1(G93A) et TDP-43(A315T) a été associée à des défauts d'association entre STAU1, la PP1-bêta, et la dynéine, et leur colocalisation avec des marqueurs synaptiques. Ceci suggère que l'interaction de la dynéine avec STAU1 régule la localisation de l'ARNm tout au long de l'axone et que les altérations de ce processus pourraient être corrélées à la perturbation des synapses dans le contexte de la maladie [171].

1.5.8 STAU1 dans la DM1

Les maladies les plus étudiées par rapport à la dérégulation des protéines de liaison à l'ARN sont les désordres neuromusculaires. La Dystrophie Myotonique de type 1 (DM1)

ou Dystrophie de Steinert est causée par une augmentation des répétitions dans la région 3'UTR du transcrit CUGBP (CUG Binding Protein) qui code pour la protéine DMPK1 impliquée dans la régulation de plusieurs événements post-transcriptionnels tels que l'épissage alternatif et la traduction et la stabilité des ARNm. Dans cette maladie, la dérégulation d'autres protéines de liaison à l'ARNm, telles que le régulateur d'épissage MBNL1 et STAU1 est également observée [172].

Il a été montré que, dans le muscle squelettique du modèle de souris et chez les patients atteints de DM1, la protéine de STAU1 est surexprimée [173]. La formation de granules de stress dans les myoblastes, comme réponse à l'accumulation de CUGBP, est inhibée par l'augmentation du niveau de STAU1 [174]. De plus, ces études ont confirmé que, grâce à son NLS et son dsRBD3, STAU1 s'accumule au noyau pour interagir avec l'ARNm CUGBP et faciliter son export nucléaire et sa traduction. Les auteurs ont proposé que la surexpression de STAU1 dans DM1 constitue une réponse adaptative à la pathologie pour permettre, via STAU1, de restituer l'épissage alternatif des ARNm des récepteurs de l'insuline altérés dans la maladie [173].

Une analyse plus approfondie des protéines de liaison à l'ARNm dans la DM1 a permis de détecter que les effets combinés de la réduction du niveau du facteur d'épissage MBNL1, l'augmentation accrue de CUGBP et l'accroissement modérée de STAU1 résultent en la diminution de l'inclusion de l'exon 11 de l'ARNm INSR, ce qui est un effet protecteur de la pathologie. Cependant, l'étude à haut débit des ARNm qui sont altérés par STAU1 dans la pathologie montre que, bien qu'il existe des effets régulateurs des transcrits pour la protection contre la maladie, d'autres régulations post-

transcriptionnelles de STAU1 génèrent des produits préjudicieux au DM1. Cette étude est considérée comme un exemple de comment le changement du protéome à partir d'une pathologie implique des changements dans les effets physiologiques de la protéine. De plus, il est important de considérer le rôle collaboratif de plusieurs protéines de liaison à l'ARNm pour moduler leur destin et le phénotype final dans des conditions spécifiques [175].

1.5.9 STAU1 dans le cycle cellulaire

La dérégulation du niveau protéique de STAU1 entraîne des répercussions dans le cycle cellulaire [90, 91]. Dans des cellules non-transformées, la surexpression de STAU1 ne montre pas des phénotypes détectables sur le cycle cellulaire ou la prolifération cellulaire tandis que sa déplétion semble être létale. Certaines bases de données suggèrent que STAU1 serait une protéine essentielle [176], ce qui expliquerait le non-succès de créer des lignées cellulaires déplétées de STAU1 par le système CRISPR Cas9. La diminution accrue de STAU1 par ARNsi ou ARNsh montre un ralentissement de la prolifération cellulaire générale [90] résultant des défauts dans les transitions G1/S et G2/M [91]. Des études récentes de notre laboratoire ont montré un mécanisme de rétroaction positive entre STAU1 et E2F1. E2F1 est un facteur de transcription qui a pour cible plusieurs gènes qui codent pour des protéines impliquées dans le passage G1/S et la réplication de l'ADN telles que la cycline E [177]. STAU1 lie l'ARNm E2F1 sur le 3'UTR du transcrit et facilite sa traduction. A son tour, le facteur E2F1 induit la transcription de l'ARNm de STAU1. Alors une diminution de STAU1 génère une boucle dans laquelle la protéine E2F1 est diminuée ainsi que les transcrits régulés par cette dernière dont l'ARNm de la protéine STAU1 [91]. Le lien entre la diminution de STAU1 et le ralentissement de la

transition G2/M observé par Cytométrie de flux est moins clair [91]. STAU1 régule de façon positive l'expression de plusieurs gènes pro-prolifératifs. Sa diminution pourrait donc induire l'inhibition de protéines engagées dans différents points de contrôle de la mitose. De plus, l'association partielle de STAU1 au FM dès la prométaphase jusqu'à l'anaphase pourrait être un point de surveillance dans la progression de la mitose [125]. Il a été postulé que la distribution de STAU1 aux microtubules garantit la distribution des ARNm dans les cellules filles; il serait alors normal que la cellule ait développé des mécanismes de contrôle qui induisent un ralentissement de la mitose lors de l'absence de STAU1 sur le FM [91].

1.5.10 STAU1 et le cancer

Récemment, plusieurs recherches ont lié STAU1 à des rôles critiques dans la progression de différents types de cancer. Les études de Xu en 2015 [178] et en 2017 [179] et de Damas en 2016 [180] lient la dérégulation de deux lncARN (long non-coding ARN) à une modulation du SMD et à la progression de deux différents types de cancer, respectivement. Les lncARN sont des ARN fonctionnels de plus de 200 nucléotides [181]. Plusieurs évidences soutiennent que les lncARN jouent de nombreux rôles dans la régulation de l'expression génique au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et traductionnel, ce qui leur confère des fonctions déterminantes dans la carcinogenèse et la progression tumorale [181]. Dans le cancer colorectal, il a été montré que l'ARN lnc SNHG5 est surexprimé. SNHG5 stabilise des transcrits qui sont naturellement dégradés via le mécanisme dépendant de STAU1, SMD [182]. L'augmentation du niveau de SNHG5 masque les sites d'association de STAU1 sur les transcrits et prévient donc leur dégradation par SMD, ce qui induit la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose

[180]. Par exemple, l'ARNm SPATS2 est une cible de SNHG5 et du SMD. La fonction de SPATS2 est inconnue mais sa diminution induit l'apoptose [180]. Les chercheurs ont confirmé que l'ARNm SPATS2 est déstabilisé par la déplétion de SNHG5 ou l'augmentation de STAU1. Ceci mène à une diminution générale du processus cancérigène, ce qui confirme le rôle antiprolifératif de STAU1 dans ce type de cancer [180]. Dans le cancer gastrique, un lien entre la protéine STAU1 et l'ARN Inc TINCR a été montré [178]. TINCR est surexprimé dans ce type de cancer et sa surexpression contribue à l'oncogénèse et à la progression cancérigène. L'interaction de TINCR avec STAU1 active le mécanisme SMD et facilite la dégradation de l'ARNm KLF2, un gène suppresseur de tumeur qui est un facteur de transcription de deux inhibiteurs de kinases dépendantes de cycline, CDKN1A/p21 et CDKN2B/p15, ce qui affecte la prolifération et l'apoptose des cellules du cancer gastrique [178]. De plus, le facteur de transcription E2F1, qui forme une boucle de rétroaction positive avec STAU1 dans le cycle cellulaire, est aussi surexprimé dans les cellules du cancer gastrique et médie la transcription de TINCR, ce qui mène de façon ultime à la stabilisation des CDK et à la progression du cancer [179]. Dans ces deux cas, STAU1 exerce un effet antiprolifératif dans les cellules cancéreuses à travers de son mécanisme SMD et la dérégulation du SMD induit la tumorigénèse [178, 179].

Finalement, en 2017, le niveau de STAU1 a été pour la première fois directement lié à la progression du cancer. Crawford Parks et collaborateurs ont étudié le rhabdomyosarcome [170], dans lequel le niveau de STAU1 est augmenté. Sa surexpression affecte la myogénèse, un rôle connu de STAU1 via la régulation de l'expression de c-myc et de la myogénine, entre autres transcrits [168]. En utilisant deux

sous-types de rhabdomyosarcome, soit le rhabdomyosarcome embryonnaire et le rhabdomyosarcome alvéolaire, les auteurs ont constaté que la régulation par STAU1 a des rôles différents [169]. Dans le rhabdomyosarcome embryonnaire, la déplétion de STAU1 diminue la prolifération et la migration tumorale à la suite de la diminution du niveau protéique de c-myc, un oncogène dont le transcrit est régulé par STAU1. Dans le rhabdomyosarcome alvéolaire, seulement la migration cellulaire est inhibée par suite d'une déplétion de STAU1, ce qui mène à l'augmentation de l'apoptose cellulaire [170]. Pour comprendre cette divergence, il faut noter que STAU1 régule la fonction des ARNm cibles de manières différentes. Dans la myogenèse, STAU1 contrôle la différenciation cellulaire par le mécanisme SMD [169], ce qui mène à la dégradation de plusieurs transcrits. En même temps, STAU1 lie l'ARNm c-myc sur le 5'UTR et facilite sa traduction [168]. Alors le rôle de STAU1 est dépendant du type cellulaire et du transcriptome actif dans la cellule. Dans le rhabdomyosarcome, STAU1 se comporte comme un oncogène, bien que dans d'autres types de cancer, comme mentionné précédemment, STAU1 semble jouer le rôle d'inhibiteur de la prolifération tumorale [178-180].

1.5.11 STAU1 dans le cycle des cellules transformées

Contrairement à ce qui a été observé dans les cellules non-transformées, la diminution du niveau protéique de STAU1 dans les cellules transformées ne semble pas porter conséquence à la progression du cycle cellulaire [90]. En effet, des lignées cellulaires de cellules transformées HCT116 et HEK293 ont été créées par la déplétion totale de STAU1 via le système CRISPR Cas9 sans répercussion sur le cycle ou la prolifération cellulaire [125, 141]. Il est possible que dans cette lignée cellulaire les voies mécanistiques dans lesquels participe STAU1 ne soient plus essentielles une fois les

cellules transformées et/ou que lors d'une diminution de STAU1 d'autres protéines de liaison à l'ARNm compensent de façon partielle les rôles de la protéine.

En revanche, la surexpression de STAU1 dans des cellules transformées provoque un ralentissement de la prolifération cellulaire [90]. Cette fois ci, on observe le ralentissement de la mitose et du passage de la cellule à la phase G1. Ce rôle antiprolifératif de la surexpression de STAU1 a été cartographié au dsRBD2 [90]. Les différents phénotypes en présence de l'altération protéique de STAU1 entre les cellules transformées et non transformées pourraient être expliqués sur la base des changements dans le protéome ou le transcriptome de chaque type cellulaire. Dans le cancer, l'expression génique des facteurs pro-prolifératifs est favorisée et les points de contrôle du cycle cellulaire sont majoritairement abolis [183]. Le rôle de STAU1 comme facteur post-transcriptionnel pourrait changer, non seulement selon la disponibilité des ARNm cibles, mais aussi en fonction de changements dans le niveau d'expression de protéines qui régulent ou qui agissent comme cofacteurs dans les fonctions de STAU1. Le fait d'avoir cartographié l'effet antiprolifératif de la surexpression de STAU1 à la mitose au dsRBD2 [90], un domaine qui ne lie pas directement les ARNm, ajoute comme variante la possibilité que l'excès de STAU1 joue d'autres rôles non-canoniques comme le recrutement de facteurs protéiques [91, 155] qui récupèrent, au moins partiellement les points de contrôle de la mitose. Vu que le dsRBD2 est responsable de plusieurs fonctions de STAU1 (dégradation en mitose, association au FM, dimérisation, effet antiprolifératif, etc), il serait intéressant d'identifier les motifs minimaux responsables de chacune de ces fonctions pour pouvoir établir un lien entre les différents rôles et l'effet antiprolifératif de l'excès de STAU1 dans des cellules transformées.

1.6 Problématique et objectifs de la thèse

STAU1 est un facteur post-transcriptionnel qui lie une sous-population d'ARNm pour moduler leur destin. STAU1 est une protéine multifonctionnelle, et selon le type de liaison aux ARNm, la protéine contrôle leur traduction, leur transport, leur épissage alternatif et leur dégradation [111].

Bien que STAU1 soit présente dans les neurones où son rôle est essentiel pour la synaptogenèse [167] entre autres fonctions, STAU1 est aussi présente dans des cellules en division [90]. L'étude du rôle et de la régulation de STAU1 lors du cycle cellulaire fait ressortir la relation directe de cette protéine avec plusieurs joueurs fondamentaux dans ce processus [90, 91, 125]. De plus, 8% des ARN régulés par STAU1 codent pour des protéines directement impliquées dans le cycle cellulaire [90], ce qui suggère un rôle important de la protéine dans ce mécanisme. Au niveau de la régulation protéique, STAU1 est partialement dégradé en mitose par le système UPS et plus spécifiquement suite à l'interaction avec les coactivateurs de l'APC/C, une E3 ligase spécifique du cycle cellulaire, ce qui suggère que le contrôle de son expression protéique est fondamental pour le bon déroulement du cycle [90]. Des études précédentes dans notre laboratoire montrent que la présence du domaine dsRBD2 de STAU1 est essentielle pour la dégradation de la protéine à travers le système UPS en mitose, bien que ce domaine ne contienne pas de motifs classiques d'interaction avec les coactivateurs de l'APC/C. De plus, le dsRBD2 de STAU1 est aussi fondamental pour l'effet antiprolifératif que la protéine exerce quand elle est surexprimée dans les cellules transformées [90]. Nous postulons comme hypothèse de cette recherche que le dsRBD2 de STAU1 contient le

motif minimal responsable de la régulation du niveau d'expression protéique de STAU1 ainsi que les déterminants responsables de son effet antiprolifératif dans des cellules cancéreuses et qui font de ce domaine un modulateur du rôle canonique de la protéine comme facteur post-transcriptionnel. Pour tester notre hypothèse, nous nous proposons 1) de cartographier le motif minimal dans le dsRBD2 de STAU1 responsable de sa dégradation via le système APC/C, 2) d'identifier les déterminants dans le dsRBD2 de STAU1 impliqués dans l'effet antiprolifératif de la protéine dans des cellules transformées et 3) de déterminer le rôle de ces déterminants dans l'activité post-transcriptionnel de STAU1, notamment sur la traduction et/ou la dégradation des ARN dépendantes de la protéine.

2. Un motif de dégradation dans STAU1 définit une nouvelle famille de protéines impliquées dans l'inflammation

2.1 Mise en contexte de l'article 1

Le présent article découle de la publication de notre laboratoire sur la régulation de la protéine STAU1 dans le cycle cellulaire. Dans cet article, Dr. Karine Boulay et collaborateurs ont découvert que STAU1 est présent tout au long du cycle cellulaire mais que la protéine est partiellement dégradée en mitose [90]. Des chaînes de polyubiquitines observées sur STAU1 suggèrent que la dégradation de la protéine s'effectue par le système ubiquitine-protéasome (UPS). Les auteurs ont déterminé que STAU1 est la cible de l'APC/C, et que les deux co-activateurs de l'APC/C, CDC20 et CDH1, ciblent STAU1 pour sa dégradation au protéasome 26S. Dans la recherche du motif d'interaction de STAU1 avec ces protéines, il a été noté que STAU1 présente une séquence D-box entre les domaines TBD et dsRBD5, qui correspond à une séquence consensus d'interaction avec CDC20 et CDH1 [82]. Cependant, la mutation de cette séquence n'empêche pas la dégradation de la protéine par l'UPS. Pour déterminer le domaine de STAU1 qui porte le motif d'intérêt, des études de dégradation ont été fait avec des mutants de délétion de chaque domaine de STAU1. Ceci a permis de déterminer qu'un motif dans le dsRBD2 de STAU1 est responsable de la dégradation de la protéine [90].

Les résultats obtenus par la Dr. Karine Boulay et collaborateurs en 2014 suggèrent que le dsRBD2 de STAU1 contient un motif minimal de dégradation de la protéine et que cette dégradation passe par la polyubiquitination dérivée de l'interaction de ce domaine avec les co-activateurs de l'APC/C. L'absence d'une séquence consensus cible de CDC20 et CDH1 dans le dsRBD2, suggère la présence d'un nouveau motif de dégradation dans la protéine STAU1 pas encore décrit dans la littérature scientifique. De plus, le fait que la délétion d'autres domaines de STAU1 n'affecte pas la dégradation de la protéine suggère

que ce nouveau motif serait suffisant pour la dégradation de STAU1. Dans l'article 1, nous montrons qu'une chimère entre dsRBD2 et une protéine non-ciblée à l'UPS porte des chaînes de polyubiquitines et est dégradée par le protéasome. Ceci confirme que dsRBD2 contient le motif minimal de dégradation de la protéine. Des délétions progressives dans ce domaine nous ont permis de rétrécir la séquence qui contient le motif de dégradation. Des études de dégradation par inhibition du protéasome sur des mutants par balayage par alanine sur cette séquence nous ont mené à la découverte du motif FPL comme minimal de dégradation de STAU1 (F³⁹PxPxxLxxxxL⁵⁰). Une mutation dans ce motif empêche la dégradation de STAU1 par l'APC/C. De façon intéressante, ce motif est retrouvé dans la séquence de 15 autres protéines, majoritairement impliquées dans la réponse du système immunitaire. Nous avons montré qu'une d'entre elles, MAP4K1, est dégradée par le protéasome dépendamment du motif FPL. Nous avons ensuite identifié TRIM25, une E3 ubiquitine ligase associée directement au processus inflammatoire, comme protéine impliquée dans la dégradation de STAU1 et MAP4K1 dépendamment du motif FPL. Ceci suggère un nouveau rôle de STAU1 dans ce processus cellulaire, et ouvre les portes à son étude.

2.2 Contribution à l'article 1

J'ai utilisé le plasmide STAU1⁵⁵-HA₃ en pCDNA3-RSV et le mutant STAU1^{Δ88}-HA₃ en pcDNA3-RSV ainsi que le vecteur YFP-Topaz du laboratoire du Dr Luc DesGroseillers pour faire les expériences pertinentes et à partir de ces plasmides j'ai créé les subséquents clones pour le reste des expériences. J'ai fait les expériences de culture cellulaire, de transfection ou co-transfections, les traitements avec des drogues, les buvardages de type western et l'analyse de donnés. J'ai réalisé les immunoprécipitations et purification de protéines pour la préparation des échantillons protéiques pour envoyer à spectrométrie de masse à la plateforme de spectrométrie de l'IRIC (Institut de recherche en immunologie et en oncologie) ou de l'IRCM (Institut de recherches cliniques de Montréal). Luc DesGroseillers a participé avec moi à la conception expérimentale, à la rédaction et correction du manuscrit et à la création et correction des tables et figures.

2.3 Article 1

A degradation motif in STAU1 defines a novel family of proteins involved in inflammation

Yulemi Gonzalez Quesada and Luc DesGroseillers*

Affiliations : Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine, Université de Montréal, 2900 Édouard Montpetit, Montréal, QC, H3T 1J4, Canada.

*** To whom correspondence should be addressed:**

Dr Luc DesGroseillers, Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine, Université de Montréal, 2900 Édouard Montpetit Montréal, QC, Canada. H3T 1J4. Phone : 514-343-5802. Fax: 514-343-2210. Email: luc.desgroseillers@umontreal.ca

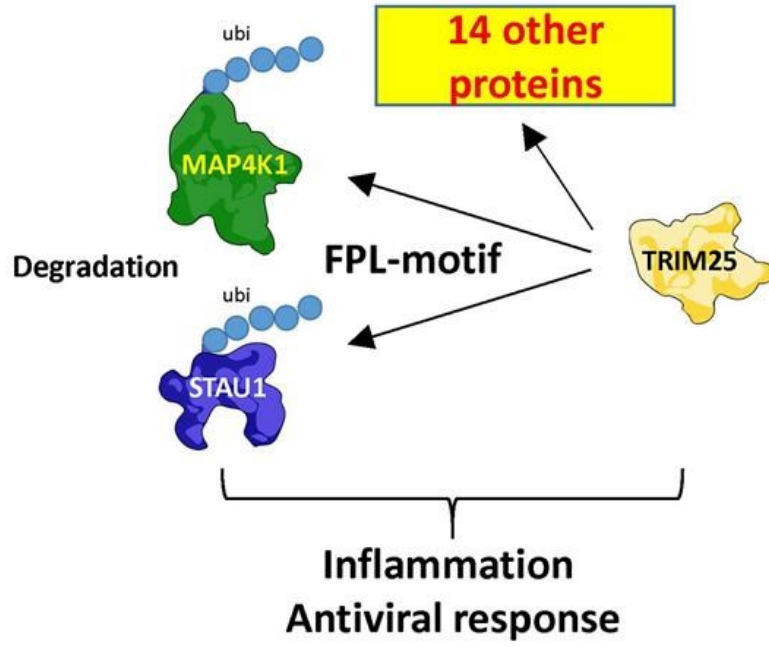
Keywords: Staufen1, inflammation, protein degradation, E3-ubiquitin ligase, TRIM25, degran

Academic Editor: Sarath Chandra. Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 11588.
<https://doi.org/10.3390/ijms231911588>. Received: 17 August 2022 / Accepted: 26 September 2022 / Published: 30 September 2022

2.3.1 Abstract

Cancer development is regulated by inflammation. Staufen1 (STAU1) is an RNA-binding protein whose expression level is critical in cancer cells as it is related to cell proliferation or cell death. STAU1 protein levels are downregulated during mitosis due to its degradation by the E3 ubiquitin ligase anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C). In this paper, we map the molecular determinant involved in STAU1 degradation to amino acids 38–50, and by alanine scanning, we shorten the motif to F³⁹PxPxxLxxxxL⁵⁰ (FPL-motif). Mutation of the FPL-motif prevents STAU1 degradation by APC/C. Interestingly, a search in databases reveals that the FPL-motif is shared by 15 additional proteins, most of them being involved in inflammation. We show that one of these proteins, MAP4K1, is indeed degraded via the FPL-motif; however, it is not a target of APC/C. Using proximity labeling with STAU1, we identify TRIM25, an E3 ubiquitin ligase involved in the innate immune response and interferon production, as responsible for STAU1 and MAP4K1 degradation, dependent on the FPL-motif. These results are consistent with previous studies that linked STAU1 to cancer-induced inflammation and identified a novel degradation motif that likely coordinates a novel family of proteins involved in inflammation.

2.3.2 Graphical Abstract



2.3.3 Introduction

Most recent studies reveal a connection between inflammation and cancer [1]. Indeed, tumor-promoting inflammation is a characteristic of cancer [2]. Reciprocal interactions between cancer cells and inflammatory cells create an inflammatory tumor environment that predisposes to tumor progression, metastases, and recurrence. Both cancer and inflammation are complex processes, and the discovery of new inflammation-related pathways in relation to cancer may lead to important advances in the development of therapies against cancer.

The success of cell functions is dependent on the control of protein levels through a coordinate process that balances translation and degradation [3]. Dysregulation of this equilibrium has disastrous consequences on cell homeostasis [4]. Protein degradation is mostly mediated by the ubiquitin–proteasome system (UPS) [5]. In this process, ubiquitin is transferred to target proteins via a three-enzyme process that relies on the activating enzyme (E1), ubiquitin-conjugating enzyme (E2), and ubiquitin ligase (E3). Monoubiquitinated, polymonoubiquitinated, and polyubiquitinated proteins can then be processed by the 20S, 26S, or 30S proteasomes for degradation [6–8]. Polyubiquitinated proteins targeted for degradation contain polyubiquitin chains in which ubiquitin monomers are covalently added on lysine 48 (K48-linked) or lysine 11 (K11-linked). However, other types of polyubiquitination have alternative consequences on proteins. For example, K63-linked polyubiquitin chains do not tag proteins for degradation but rather form a platform for new protein interactions and activation [9]. The ubiquitin system plays important roles in the control of multiple processes, including cell proliferation, signal transduction, transcriptional and translational regulation, cell death, and immune

response [5]. It is required for the activation of inflammatory pathways and for their attenuation to prevent tissue damage [10]. E3 ubiquitin ligases are thus considered as targets for inflammatory diseases [11].

Humans have an estimated 700 E3 ubiquitin ligases [12] that specifically ensure the last step of ubiquitination on target proteins. They usually recognize a short amino acid sequence consensus motif, known as degron, on target proteins. Target proteins can contain multiple degrons. However, only few E3 ligases have known degron motifs [13], hampering our capability to identify families of target proteins that are coordinately regulated by protein degradation in response to changing physiological environments. The E3 ubiquitin ligase anaphase-promoting complex/ cyclosome (APC/C) controls cell cycle events through the degradation of selected proteins [12,14]. Two coactivators, cell division cycle 20 (CDC20) and fizzy and cell division cycle 20 related 1 (CDH1), allow APC/C to target a large range of proteins and to control several steps of the cell cycle [15]. Via its coactivators, APC/C can recognize several consensus degrons [16], the most characterized ones being the D-box [17] and KEN-box [18] motifs. One of the targeted proteins is the RNA-binding protein Staufen1 (STAU1) [19]. STAU1 is a double stranded RNA (dsRNA)-binding protein that is expressed as two different isoforms of 55 and 63 kDa [20,21], the 55 kDa isoform being the most highly expressed. STAU1⁶³ is identical to STAU1⁵⁵ but carries an 81-amino-acid extension at its N-terminal extremity. STAU1⁵⁵ contains four dsRNA-binding domains (RBD), two of them, RBD3 and RBD4, being able to bind dsRNA in vitro [20–22]. Accordingly, STAU1⁵⁵ is a post-transcriptional regulator that controls the fate of bound RNAs, from localization, transport, translation, and alternative splicing to degradation [23–28]. STAU1⁵⁵ expression is essential in

untransformed cells as it facilitates checkpoint transition [29]. STAU1⁵⁵ is involved in multiple pathways that control development, differentiation, stress granule regulation, synaptic plasticity and long-term potentiation, apoptosis, cell proliferation, RNA virus replication, and immune response to virus infection [23,30–33]. It is also clearly linked to cancer development, cell migration, metastasis, and tumor angiogenesis [23]. In cancer cells, STAU1⁵⁵ overexpression impairs cell proliferation and induces apoptosis [19,33]. Interestingly, recent studies link STAU1⁵⁵ to proinflammatory processes [32,34].

STAU1⁵⁵ protein levels vary during the cell cycle, being high in S/G2 and decreasing during mitosis as a result of protein degradation via APC/C [19]. Interestingly, STAU1⁵⁵ association with CDC20 or CDH1 depends on a molecular determinant located in the first 88 N-terminal amino acids, a domain known as RBD2 [19]. In this paper, we report the characterization of the STAU1⁵⁵ degradation motif targeted by the APC/C (FPxPxxLxxxxLFPL motif) and show that it is shared by 15 additional proteins. Strikingly, 11 of them are linked to inflammation. We further show that the E3 ubiquitin ligase TRIM25 recognizes the motif for protein degradation. This protein is involved in the innate immune response and in interferon production following viral infection. These results suggest that STAU1⁵⁵ and other proteins with the same degradation motif can be regulated by TRIM25 in a context of inflammation to trigger and/or attenuate the immune response.

2.3.4 Results

RBD2 Is Sufficient to Confer Protein Degradation Capacity

STAU1⁵⁵ was reported to be a substrate of the E3 ubiquitin ligase APC/C and, thus, to be polyubiquitinated and degraded during mitosis [19]. The motif responsible for STAU1⁵⁵ degradation likely resides within RBD2 since its deletion prevents STAU1⁵⁵ interaction with CDH1 and CDC20, two coactivators of APC/C, and its degradation by the proteasome [19]. To determine whether RBD2 is sufficient to confer protein degradation, the first 88 amino acids of STAU1⁵⁵ (RBD2) were fused to YFP, a protein that is normally not degraded by the 26S proteasome. Then, we compared the levels of RBD2-YFP with that of STAU1⁵⁵-YFP and STAU1^{Δ88}-YFP (Figure 2-1A) in the presence or absence of the proteasome inhibitor MG132 88-YFP (Figure 2-1A) in the presence or absence of the proteasome inhibitor MG132 (Figure 2-1B). As expected [19], STAU1⁵⁵-YFP was stabilized in the presence of MG132, while STAU1^{Δ88}-YFP was not. Similarly, RBD2-YFP was stabilized following proteasome inhibition, while YFP was not, indicating that the first 88 amino acids of STAU1⁵⁵ are necessary and sufficient to confer protein degradation capacity.

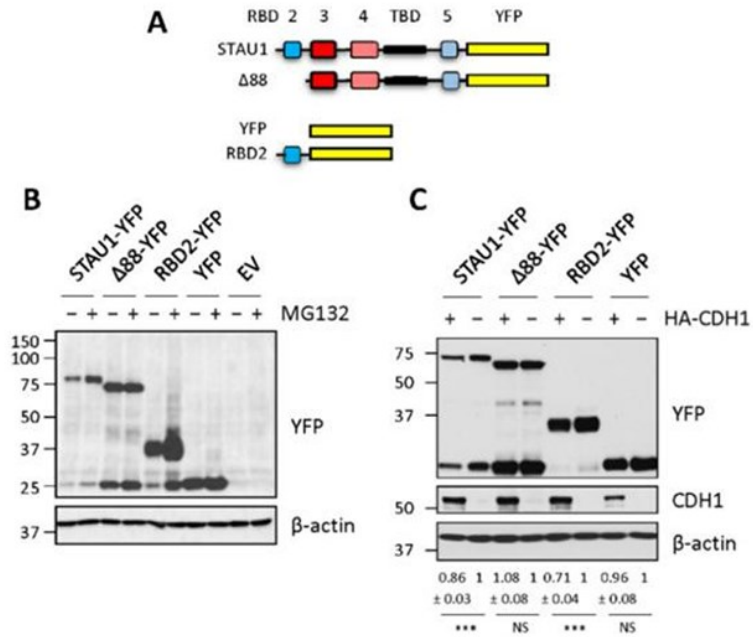


Figure 2-1. RBD2 is sufficient to induce degradation of STAU1⁵⁵ by APC/C-UPS. (A) Schematic representation of STAU1⁵⁵-YFP and the deletion mutants. STAU1, STAU1⁵⁵; Δ88, STAU1⁵⁵ lacking the first N-terminal 88 amino acids; RBD2, RNA-binding domain 2 corresponding to the first N-terminal 88 amino acids of STAU1⁵⁵; YFP, yellow fluorescent protein. Red boxes, RNA-binding domains (RBD); blue boxes, regions with RNA-binding consensus sequence but lacking RNA binding activity in vitro; yellow boxes, YFP; black boxes, tubulin-binding domain (TBD). (B) HEK293T cells expressing STAU1⁵⁵-YFP, deletion mutants, YFP, or an empty vector (EV) were grown in the presence (+) or absence (-) of the proteasome inhibitor MG132 for 8 h. Protein extracts were analyzed by Western blotting. (C) HEK293T cells were cotransfected with plasmids coding for HA-CDH1 (+) or an empty vector (-) and plasmids coding for STAU1⁵⁵-YFP, STAU1^{Δ88}-YFP (Δ88-YFP), RBD2-YFP, or YFP. Degradation of the proteins in the presence (+) or absence (-) of HA-CDH1 was observed by Western blotting. Western blots using anti-

CDH1 antibody confirm the expression of HA-CDH1. The blots are representative of three independently performed experiments that gave similar results. The ratio of the amounts of the expressed proteins to that of actin in the absence or presence of HA-CDH1 was calculated, and the ratio in the absence of HA-CDH1 was arbitrarily fixed to 1. The numbers represent the means \pm standard deviation of the relative amounts of the proteins in three independently performed experiments. ***, p-value \leq 0.001 (Student t-test). NS, not significant.

To determine whether RBD2 is sufficient to be recognized by CDH1, plasmids coding for HA-CDH1 and either STAU1⁵⁵-YFP, STAU1 ^{Δ 88}-YFP, RBD2-YFP, or YFP were cotransfected in HEK293T cells, and the amount of the proteins quantified by Western blotting (Figure 2-1C). STAU1⁵⁵-YFP and RBD2-YFP levels decreased when expressed in the presence of HA-CDH1, whereas STAU1 ^{Δ 88}-YFP and YFP levels were stable. All these results confirm that RBD2 contains a motif responsible for STAU1⁵⁵ degradation.

Amino Acids 38 to 51 Are Involved in STAU1⁵⁵ Stabilization and Interaction with the APC/C Coactivator CDH1

To define the amino acid sequence involved in STAU1⁵⁵ interaction with CDH1 and in STAU1⁵⁵ degradation, progressive deletions were introduced at the N-terminal end of STAU1⁵⁵ (Figure 2-2A). These mutants were expressed in HEK293T cells in the presence or absence of MG132, and their levels of expression quantified by Western blotting (Figure 2-2B).

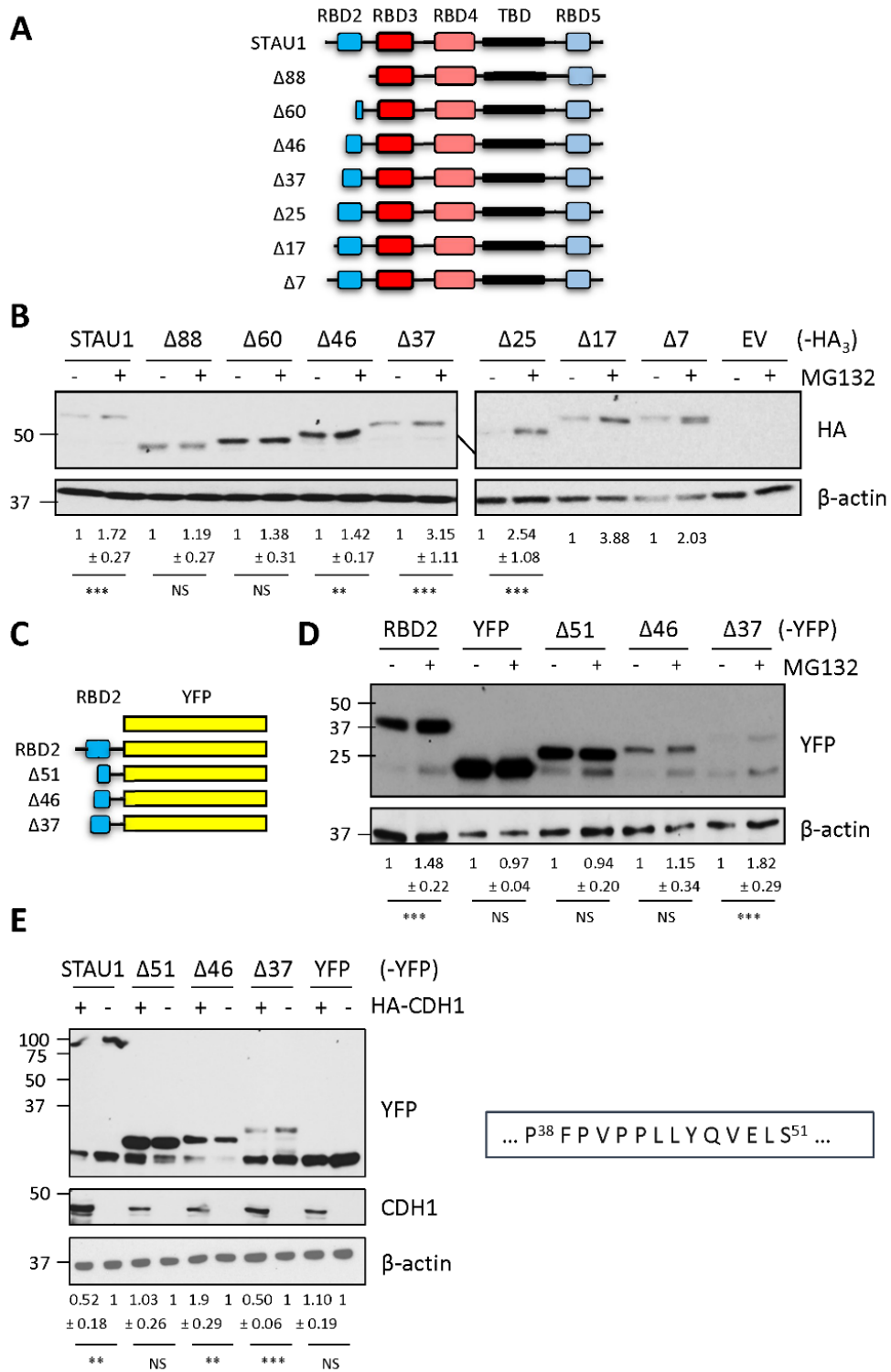


Figure 2-2. The degradation motif is located within amino acids 38 and 51. (A) Schematic representation of STAU1⁵⁵ and mutants with progressive deletions of the first N-terminal

88 amino acids (see legend in Figure 2-1). (B) Plasmids coding for STAU1⁵⁵-HA₃ or deletion mutants were transfected in HEK293T cells. After 24 h, cells were treated with 20 μ M MG132 for 8 h (+). Protein extracts were analyzed by Western blotting using anti-HA antibody. (C) Schematic representation of RBD2 and the deletion mutants fused to YFP. (D) HEK293T cells were transfected with plasmids coding for RBD2-YFP or the deletion mutants and treated, 24 h later, with 20 μ M MG132 for 8 h (+). Protein extracts were analyzed by Western blotting using. (E) HEK293T cells were cotransfected with plasmids coding for HA-CDH1 or an empty vector and plasmids coding for STAU1⁵⁵-YFP, RBD2-YFP deletion mutants, or YFP. Degradation of the proteins in the presence (+) or absence (-) of HA-CDH1 was observed by Western blotting. Western blots using anti-HA antibody confirm the expression of HA-CDH1. The box on the right shows the minimal amino acid sequence responsible for STAU1⁵⁵ degradation. The numbers below the gels represent the means +/- standard deviation of the relative amounts of the proteins in three independently performed experiments. The ratio of the amount of the proteins to that of actin in the absence (-) of MG132 (B, D) or HA-CDH1 (E) was arbitrarily fixed to 1. ***, p-value \leq 0.001. **, p-value \leq 0.01 (Student t-test). NS, not significant.

STAU1⁵⁵-HA₃ and STAU1 ^{Δ 88}-HA₃ were used as positive and negative controls, respectively. Deletion of the first 88 or 60 amino acids prevented STAU1⁵⁵ stabilization upon MG132 treatment, indicating that residues 60 to 88 do not contain the degradation motif. In contrast, proteins with deletions of 7, 17, 25, or 37 amino acids were stabilized in cells treated with MG132 compared with cells treated with DMSO, indicating the presence of a degradation motif between amino acids 38 and 60. A mutant with a deletion

of 46 amino acids showed variable, although weak, stabilization, suggesting that the deletion may overlap the degradation motif (Figure 2-2B).

These results were confirmed in the context of RBD2. Deletions of 37, 46, and 51 amino acids were generated at the N-terminal end of RBD2-YFP (Figure 2-2C), and the resulting proteins were expressed in HEK293T cells in the presence or absence of MG132 (Figure 2-2D). A mutant lacking the first 37 amino acids was stabilized in the presence of MG132, as observed with mutants of the full-length protein. In contrast, the deletion of the first 46 or 51 residues of RBD2 did not cause a significant stabilization of the mutant proteins in the presence of MG132 suggesting that the degradation motif can be narrowed down to amino acids 38–51 of STAU1⁵⁵. Plasmids coding for the mutant RBD2 proteins were also co-transfected with a plasmid coding for HA-CDH1 (Figure 2-2E). The expression levels of mutants with the deletion of 37 amino acids decreased in the presence of CDH1, similar to the decrease in the full-length STAU1⁵⁵ protein. In contrast, the deletion of 51 amino acids prevented protein stabilization.

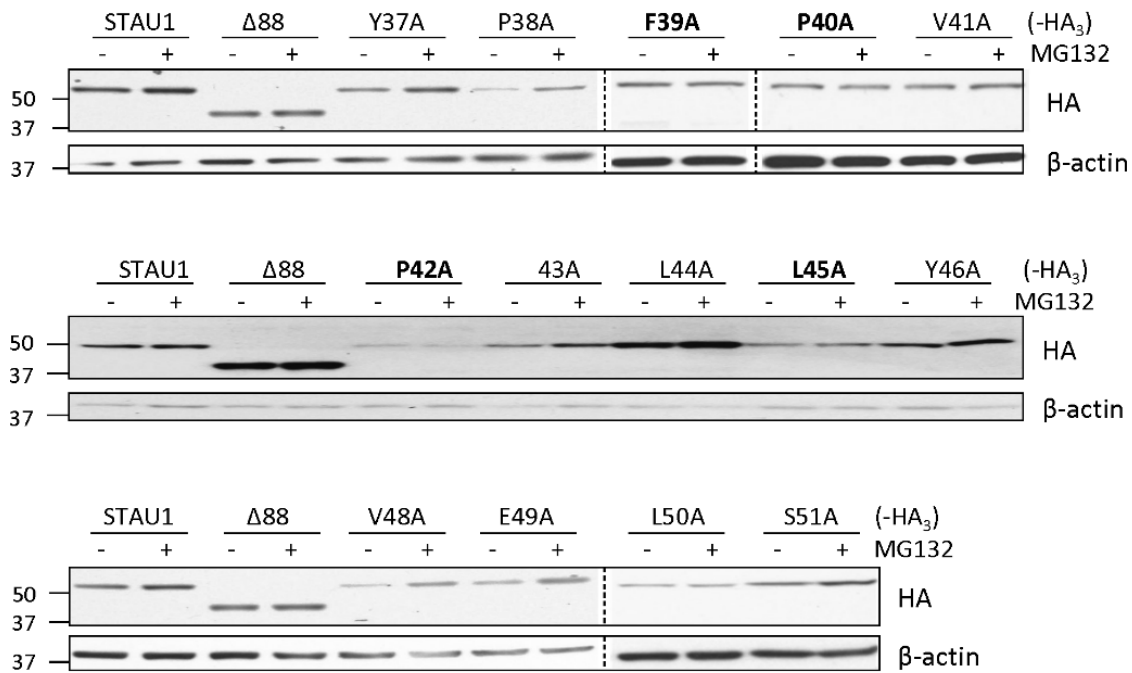
Amino Acids 38 to 60 Are Involved in Ubiquitin K11-Dependent Ubiquitination

Substrates to be degraded following ubiquitination by the APC/C coactivator CDH1 are enriched in ubiquitin K11 chains. Therefore, the K11-dependent ubiquitination of STAU1⁵⁵ proteins and mutants were tested by Western blotting following the co-expression of GFP-ubi or GFP-ubi-K11R (Supplementary Figure S1). In the presence of GFP ubi, STAU1⁵⁵-HA₃ and STAU1^{Δ37}-HA₃ were polyubiquitinated, STAU1^{Δ46}-HA₃ was only lightly ubiquitinated, while STAU1^{Δ88}-HA₃ and STAU1^{Δ60}-HA₃ were not (Supplementary Figure S1A), consistent with their degradation profiles (Figure 2-2B). In contrast, when co-transfected with a plasmid coding for ubiquitin K11R, polyubiquitination was highly

reduced on all proteins (Supplementary Figure S1B). This result supports previous data that STAU1⁵⁵ degradation depends on the APC/C coactivator CDH1. Interestingly, the incomplete loss of STAU1⁵⁵ polyubiquitination when using ubi-K11R suggests that STAU1⁵⁵ also carries CDH1-dependent ubi-K48 chains or that it can be targeted by other E3 ubiquitin ligases.

Alanine Scanning of Amino Acids 37–51 Identifies a Novel Motif of Protein Degradation

To define the degradation motif in RBD2, we generated STAU1⁵⁵ mutants using the alanine substitution of each amino acid between 37 and 51. We tested the levels of expression of each mutant, in the presence or absence of MG132, by Western blotting (Figure 2-3). Results indicated that five specific amino acids are involved in STAU1⁵⁵ degradation. The degradation motif of STAU1⁵⁵ was identified as F³⁹P-x-P-x(2)-L-x(4)-L, named FPL-motif, where the contribution of each residue seems to be equally important since the alteration of any of them abrogates the stability of the protein.



... Y³⁷ P F P V P P L L Y Q V E L S⁵¹ ...

F P x P x x L x x x x L

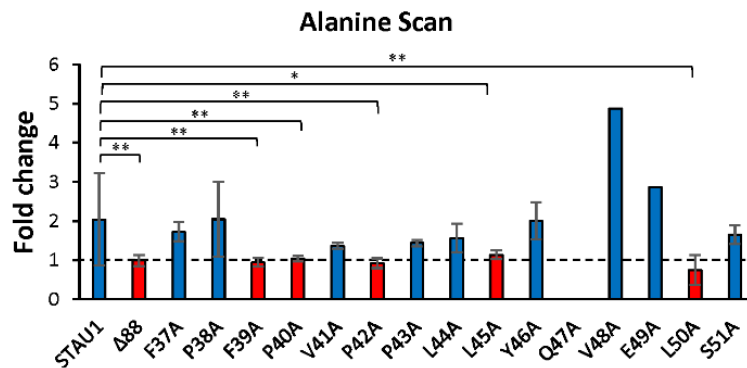


Figure 2-3. Identification of the STAU1 degradation motif. HEK293T cells were transfected with plasmids coding for STAU1⁵⁵-HA₃ or mutants in the putative degradation motif and treated, 24 h later, with 20 μM MG132 for 8 h (+). Protein extracts were analyzed by western blotting using anti-HA antibody. The graph represents the means ± standard deviation of the relative amounts of the proteins in three independently performed

experiments. The ratio of the amount of STAU1 and STAU1 mutants on that of actin in the absence (-) of MG132 was arbitrary fixed to 1. **, p-value \leq 0.01. *, p-value \leq 0.05 (Student t-test). The box below the gels highlights the amino acids required for STAU1 degradation by UPS.

Table 2-1. List of proteins with the F-P-x-P-x(2)-L-x(4)-L motif.

Gene Symbol	Gene Title	Links to Inflammation	Inflammatory Process	E3 Ubi Ligases	Number of Ubi Sites ^a	SSV ^b
ABCC11	ATP-binding cassette subfamily C member 11	[35]	Pro-			
ABCF1	ATP-binding cassette subfamily F member 1	[36]	Anti-	TRAF6, cIAP1/2 [36]	36	2.04
ADGRG1	Adhesion G protein-coupled receptor G1	[37]	Anti-		2	
CTAGE4	CTAGE family, member 4	[38]			1	
CTAGE8	CTAGE family, member 8				1	
CTAGE9	CTAGE family, member 9				1	
GPR83	G protein-coupled receptor 83	[39]	Anti-			
KBTBD13	Kelch repeat and BTB domain-containing protein 13				1	
LINGO4	Leucine-rich repeat and immunoglobulin-like domain-containing Nogo receptor-interacting protein 4					
MAP4K1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 1	[40]	Anti-	CUL7/Fbxw8 [41]	7	1.74
MCHR2	Melanin-concentrating hormone receptor 2	[42]	Pro-			
OMD	Osteomodulin	[43]	Anti-			1.76
PRRC1	Proline-rich coiled-coil 1				3	1.129
STAU1	Staufen double-stranded RNA-binding protein 1	[32]	Pro-/anti-	APC/C [19]	14	
UBE2F	Ubiquitin-conjugating enzyme E2F	[44]	Pro-	CUL3, PARK2 [45]	6	
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1	[46]	Pro-		2	2.56

^a Number of ubiquitination sites as reported (BioGRID), <https://thebiogrid.org/> (accessed on 17 August 2022);

^b SSV: score standardized value (genes associated with inflammation) [47], https://maayanlab.cloud/Harmonizome/gene_set/Inflammation/CTD+Gene-Disease+Associations.

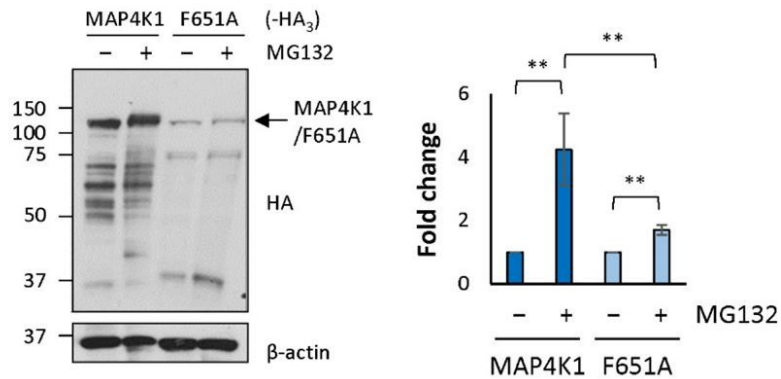


Figure 2-4. MAP4K1 is degraded via the conserved degradation motif. HEK293T cells were transfected with plasmids coding for MAP4K1-HA₃ or MAP4K1^{F651A}-HA₃ (F651A) and, 24 h later, treated with the proteasome inhibitor MG132 for 8 h (+). Protein extracts were analyzed by western blotting using anti-HA antibody. The graph on the right represents the means \pm standard deviation of the relative amounts of the proteins in three independently performed experiments. The ratio of the amount of MAP4K1-HA₃ and MAP4K1^{F651A}-HA₃ on that of actin in the absence (-) of MG132 was fixed to 1. **, p-value ≤ 0.01 (Student t-test).

STAU1⁵⁵ Degradation Motif Defines a Family of Proteins Involved in Inflammation

To determine whether the novel degradation motif of STAU1⁵⁵ can be found in other proteins, we screened the PROSITE database with the motif sequence and identified 15 additional proteins with a similar motif (Table 2-1). None of them were RNA-binding proteins or linked to cell cycle regulation. However, 12 out of the 16 proteins were previously linked to inflammation and/or immune response.

The Degradation Motif Is Involved in the Degradation of MAP4K1 by the UPS

To determine whether the degradation motif found in STAU1⁵⁵ is also functional for the control of the steady-state levels of other proteins that carry the same motif, we first expressed MAP4K1-HA₃ in HEK293T cells in the presence or absence of MG132 and quantified its level of expression by Western blotting (Figure 2-4). In the presence of MG132, a 4.24 +/- 1.14-fold increase was observed, indicating that MAP4K1-HA₃ is normally degraded by the UPS. Then, a point mutation (F651A) was introduced in the putative degradation motif to determine whether the FPL-motif is relevant for MAP4K1 protein degradation. The F651A mutant showed only a modest level of stabilization (1.70 +/- 0.15) (Figure 2-4), revealing that the motif is relevant for the degradation of the protein. These results straighten the possibility that the FPL-motif defines a family of proteins involved in inflammatory processes.

CDH1 and CDC20 Recognize the STAU1⁵⁵ FPL-Motif but Are Not Involved in MAP4K1 Degradation

To determine whether APC/C degrades STAU1⁵⁵ via the FPL-motif, plasmids coding for STAU1⁵⁵-HA₃ and STAU1^{F39A}-HA₃ were co-transfected with plasmids coding for HA-CDH1 or HA-CDC20 in HEK293T cells. As expected, STAU1⁵⁵-HA₃ was destabilized by HA-CDH1 and HA-CDC20 (Figure 2-5A). In contrast, STAU1^{F39A}-HA₃ was not (Figure 2-5A), indicating that APC/C-mediated STAU1⁵⁵ degradation requires the FPL-motif. To determine whether APC/C also recognizes the FPL-motif in MAP4K1, we cotransfected plasmids coding for MAP4K1-HA₃ or MAP4K1^{F651A}-HA₃ with or without plasmids coding for either HA-CDH1 or HA-CDC20 in HEK293 cells and determined their levels of expression (Figure 2-5B). Unexpectedly, the amounts of MAP4K1-HA₃ or its mutant were not affected by HA-CDH1 or HA-CDC20 expression, indicating that these proteins are not

involved in MAP4K1 degradation. This result also indicates that other E3 ubiquitin ligases are involved in the control of MAP4K1 expression.

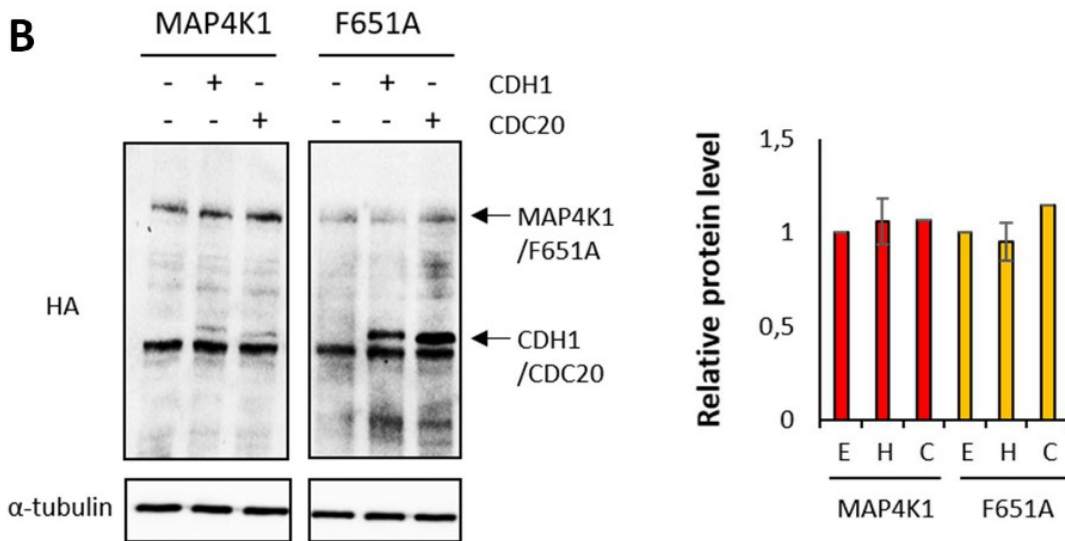
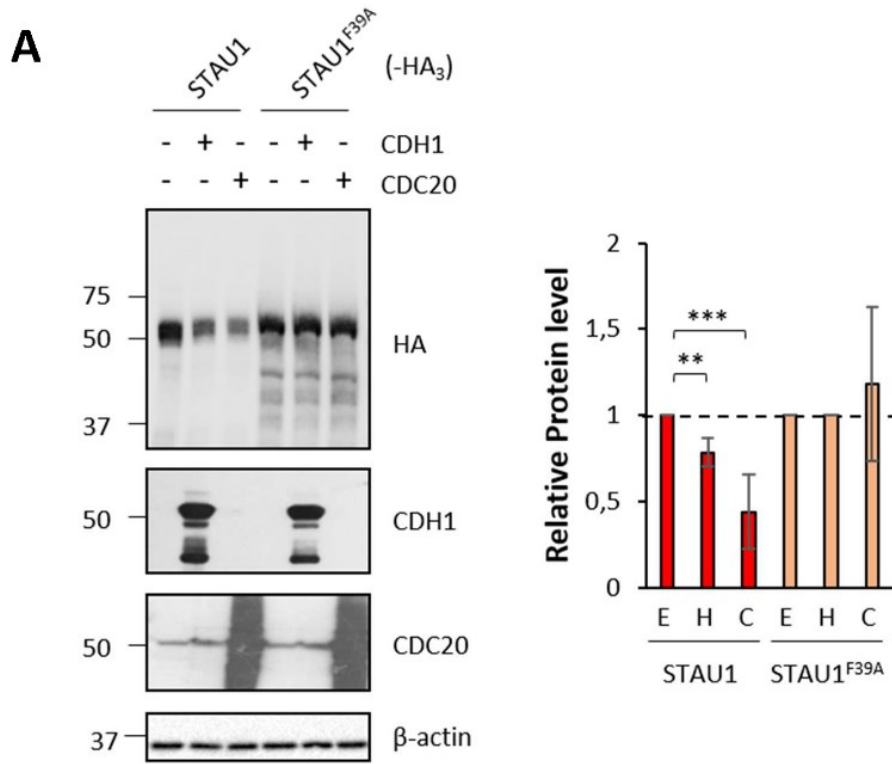


Figure 2-5. CDC20 and CDH1 recognize the FPL-motif of STAU1 but not of MAP4K1. HEK293T cells were co-transfected with plasmids coding for STAU1-HA₃, STAU1^{F39A}-HA₃ (A), MAP4K1-HA₃ or MAP4K1^{F651A}-HA₃ (B) and plasmids coding for CDC20 or CDH1. Protein extracts were analyzed by western blotting using anti-HA antibody. The graph on the right represents the means \pm standard deviation of the relative amounts of the proteins in three independently performed experiments. The ratio of the amount of the proteins on that of actin (A) or tubulin (B) in the absence of co-transfected proteins was fixed to 1. ***, p-value \leq 0.001. **, p-value \leq 0.01 (Student t-test). NS, not significant. E, empty vector; H, CDH1; C, CDC20.

BioID2/TurboID Identifies Putative E3 Ubiquitin Ligases Involved in STAU1⁵⁵ Degradation

We then used the biotin ligase strategy to identify E3 ubiquitin ligase(s) that interact(s) with STAU1⁵⁵ via the degradation motif. To increase the probability of identifying the E3 ligase, we biotin-labeled proteins in the presence of the STAU1⁵⁵-biotin ligase fusion protein for either 16 h in asynchronous hTERT-RPE1 cells (BioID2) or 3 h in cells synchronized in mitosis or in G1/S phase transition (TurboID). Labeled proteins were pulled down with streptavidin-coated magnetic beads and analyzed by mass spectrometry (Supplementary Tables S1–S3). Due to the difficulty of generating an optimal negative control with these techniques, we only kept proteins with a total spectrum enriched at least four times compared with controls for further analysis. As expected, proteins known to be linked to STAU1⁵⁵ (e.g., UPF1, PP1, FXR1, STAU2) were found in the proximity of STAU1⁵⁵ and were grouped in GO categories that matched known STAU1⁵⁵ functions (e.g., translation, RNA degradation, ribonucleoprotein complex

assembly) (Supplementary Tables S4–S6), indicating the specificity of the results. While CDH1 was not found in the proximity of STAU1⁵⁵, CDC20 was found in its proximity in cells synchronized in mitosis, in agreement with previous data showing that STAU1⁵⁵ is a target of APC/C [19]. Interestingly, three additional E3 ubiquitin ligases, TRIM25, TRIP12, and ZNF598, were repeatedly found in the proximity of STAU1⁵⁵ with significant peptide counts (Table 2-2).

Table 2-2. List of E3 ubiquitin ligases in the proximity of STAU1⁵⁵. Total spectrum count in different conditions.

	BioID2		TurboID (G1/S)		TurboID (Mitosis)	
	Ctrl	STAU1 ⁵⁵	Ctrl	STAU1 ⁵⁵	Ctrl	STAU1 ⁵⁵
Cul4B	2	3	13	4		
RBBP6	0	2			44	85
TRIP12	0	1	0	6	11	36
TRIM25	0	8	13	32	4	65
TRIM56	0	1	0	2		
SMURF2			0	1	0	3
ZNF598	0	1	0	5	6	55
CDC20					3	8
CDH1						

The E3 Ubiquitin Ligase TRIM25 Is Involved in STAU1⁵⁵ and MAP4K1 Degradation

To determine whether TRIM25, TRIP12, or ZNF598 could be involved in STAU1⁵⁵ degradation, we downregulated the expression of the three proteins with dsRNAs and compared the amounts of STAU1⁵⁵ in control and siRNA-expressing cells (Figure 2-6). RT-qPCR experiments confirmed that the E3 ubiquitin ligases were downregulated by the expression of dsRNAs (Figure 2-6A). Following the depletion of TRIM25, the amounts of STAU1⁵⁵ were increased (Figure 2-6B), indicating that TRIM25 can degrade STAU1⁵⁵. In

contrast, TRIP12 and ZNF598 depletion had no effect on STAU1⁵⁵ stability. We then tested whether TRIM25 is involved in MAP4K1-HA₃ degradation. In the presence of dsRNA against TRIM25, the amounts of MAP4K1-HA₃ were increased, indicating that it is a target of TRIM25 (Figure 2-6C). These results indicate that the E3 ubiquitin ligase TRIM25 is implicated in the degradation of STAU1⁵⁵ and MAP4K1.

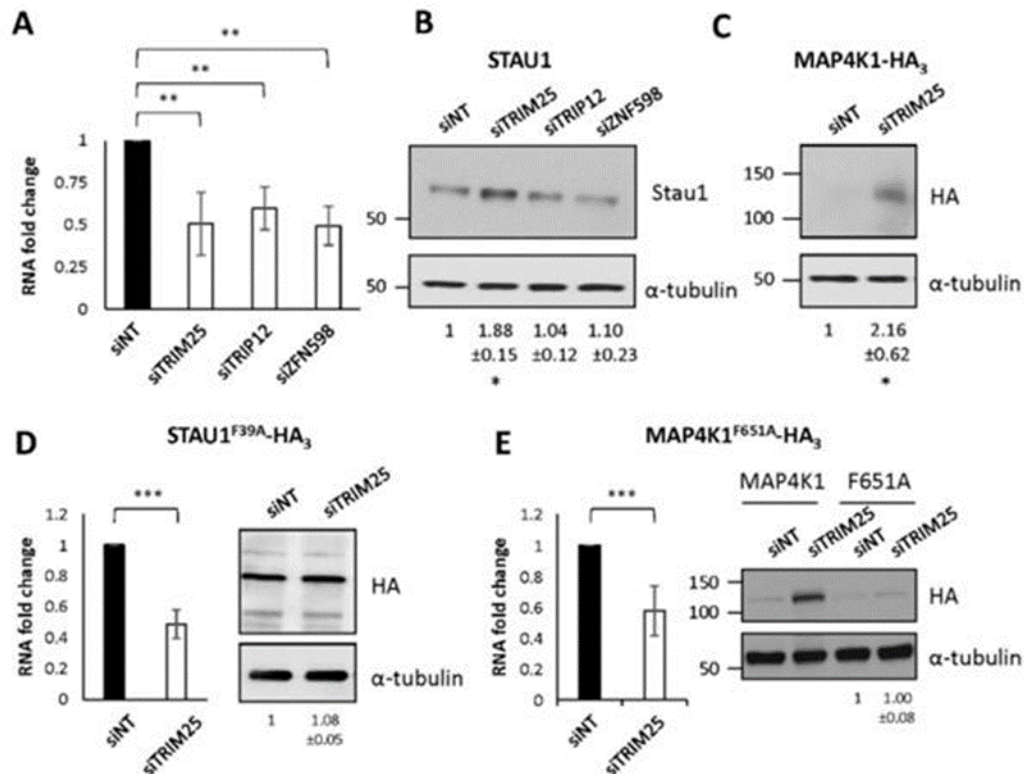


Figure 2-6. TRIM25 is involved in STAU1 and MAP4K1 degradation via the FPL-motif. (A) HEK293T cells were transfected with siRNA against the E3 ubiquitin ligases TRIM25, TRIP12 or ZNF598. After 24 h, RNAs were purified from cell extracts and the amounts of mRNA coding for the E3 ligases quantified by RT-qPCR. Their amounts were normalized over that of HPRT and RPL22. The ratio in cells transfected with non-targeting siRNAs (siNT) was arbitrary fixed to 1. **, p value ≤ 0.01 (t-student test). (B) siRNA-transfected cells were lysed and the amounts of endogenous STAU1 proteins analyzed by western

blot using anti-STAU1 and anti-tubulin antibodies. (C) HEK293T cells were co-transfected with plasmid coding for MAP4K1-HA₃ and siRNA against TRIM25. Protein extracts were analyzed by western blotting using anti-HA and anti-tubulin antibodies. The ratio of the amounts of the expressed proteins on that of tubulin in control cells was arbitrary fixed to 1. The numbers represent the means +/- standard deviation of the relative amounts of the proteins in three independently performed experiments. *, p value ≤ 0.05 (Student t-test). (D, E) HEK293T cells were transfected with siRNA against the E3 ubiquitin ligase TRIM25 and plasmids coding for STAU1^{F39A}-HA₃ (D) or MAP4K1^{F651A}-HA₃ (E). MAP4K1-HA₃ was used as control. After 24 h, RNAs were purified from cell extracts and TRIM25 mRNA quantified by RT-qPCR (left panels). The amount was normalized as in (A). Protein levels were analyzed by Western blot (right panels) using anti-HA and anti-tubulin antibodies. The blots are representative of three independently performed experiments that gave similar results. The numbers below the gels represent the means +/- standard deviation of the relative amounts of the proteins in three independently performed experiments. The ratio of the amount of the proteins to that of tubulin in siNT-transfected cells was arbitrary fixed to 1. ***, p value ≤ 0.001 (Student t-test).

TRIM25 Recognizes the Degradation Motif

To determine whether TRIM25 uses the degradation motif to target the proteins to the proteasome, we expressed STAU1^{F39A}-HA₃ (Figure 2-6D) and MAP4K1^{F651A}-HA₃ (Figure 2-6E) proteins in the presence or absence of dsRNAs against TRIM25. We first confirmed the depletion of TRIM25 by RT-qPCR (left panels). The quantification of the amount of the mutant proteins (right panels) revealed that they were not affected by TRIM25

depletion, indicating that the mutation in the FPL-motif prevents their degradation by TRIM25.

2.3.5 Discussion

In this paper, we identified the molecular determinant that causes STAU1⁵⁵ polyubiquitination and degradation by the 26S proteasome degradation following its interaction with the E3 ligase APC/C coactivators, CDC20 and CDH1. The FPL-motif is not related to previously identified targets of the APC/C coactivators, such as the D-box [17] or KENbox [18] motifs. Interestingly, the FPL-motif is found in 15 additional proteins and shown to be required for the degradation of MAP4K1. Nevertheless, MAP4K1 is not a target of APC/C, indicating that additional E3 ligase(s) can also recognize the FPL-motif. Interestingly, a search for other E3 ubiquitin ligases that target both STAU1⁵⁵ and MAP4K1 identifies TRIM25, a protein involved in inflammation and immune response [48]. Strikingly, STAU1⁵⁵ [31,32,49,50] and most of the proteins that share that FPL-motif (see below) were previously associated with inflammation and/or immune response, suggesting that the motif is part of a signaling pathway that coordinately responds to inflammation. Our results indicate that the degradation motif of STAU1⁵⁵ is a target site for at least two E3 ubiquitin ligases that lead to STAU1⁵⁵ degradation under different cell signaling pathways, cell cycle (APC/C) and inflammation (TRIM25).

STAU1⁵⁵ Degradation Motif Is a Noncanonical Sequence Targeted by APC/C

We previously showed that STAU1⁵⁵ is polyubiquitinated by the E3 ubiquitin ligase APC/C and, subsequently, degraded by the proteasome [19]. Both APC/C coactivators, CDH1 and CDC20, were found to specifically interact with STAU1⁵⁵. Surprisingly, the co-

activators did not interact with the D-box motif at the C-terminal end of the protein but rather with the RBD2 domain. RBD2 is composed by the first 88 residues at the N-terminal end of STAU1⁵⁵. Its sequence is similar to a double-stranded RNA-binding consensus motif, although it has no detectable RNA-binding activity in vitro. Accordingly, it is expected to adopt the known dsRBD tridimensional structure $\alpha 1\beta 1\beta 2\beta 3\alpha 2$ [51]. Computer modeling of the protein structure suggests a disordered $\beta 1$ sequence while the $\alpha 1\beta 2\beta 3\alpha 2$ structures are conserved (Supplementary Figure S2A). The first four amino acids of the FPL-motif are located in the loop between the disordered region and β -sheath 2, whereas Leu50 is found within $\beta 2$. Therefore, the FPL-motif is likely exposed to putative external ligands. The FPL-motif is novel and was not previously described. It is necessary and sufficient for protein degradation since it induces the degradation of proteins on which it is fused. Nevertheless, not all FPL-containing proteins are targeted by APC/C, as observed for the MAP4K1 protein (Figure 2-5). It is possible that their different subcellular localization accounts for this observation, APC/C being a nuclear protein and MAP4K1 a membrane-associated protein.

The FPL-motif may allow a flexibility or specificity for the degradation of STAU1⁵⁵ by APC/C that is spatially and/or timely different from that observed for other APC/C target proteins with D-box or KEN-box motifs (see also below). Indeed, APC/C was shown to recognize multiple degrons [16], suggesting that it may differentially coordinate the expression of subfamilies of proteins. Interestingly, the FPL-motif is well conserved among STAU1 proteins in mammals (Supplementary Figure S2B) but not in nonmammalian species, suggesting that mammalian STAU1 proteins have recently evolved and acquired novel functions associated with the FPL-motif. It is also conserved

in MAP4K1 (Supplementary Figure S2C) and other FPL-motif-containing proteins (Supplementary Figure S2D–M) in mammals but not in nonmammalian proteins (not shown).

The FPL-Motif Is Shared by a Family of Proteins Involved in the Immune and Inflammatory Responses

The FPL-motif that regulates STAU1⁵⁵ stability is also found in 15 additional proteins. Most of them are linked to the inflammatory response and/or participate in the innate immune response (Table 2-1 and Figure 2-7). In addition to its role in cell proliferation, STAU1⁵⁵ was recently linked to inflammation. Through post-transcriptional regulation, STAU1⁵⁵ controls the expression of multiple mRNAs coding for inflammatory and immune response proteins [32,34,52]. For example, STAU1⁵⁵ upregulates the expression of IFIT3, a protein of these proteins to MAVS to enhance innate immunity [53]. Similarly, STAU1⁵⁵ upregulates the translation of netrin-1 mRNA, an inflammation-inducible factor and a proinflammatory protein, in hepatocytes [34]. Consistent with its role in the upregulation of proinflammatory mRNAs, STAU1⁵⁵ expression is itself upregulated in response to lipopolysaccharide-induced embryonic inflammation in mice [49]. These results suggest that STAU1⁵⁵ expression can be induced by inflammatory processes, which leads to signal amplification through the post-transcriptional regulation of STAU1⁵⁵-bound mRNAs. STAU1⁵⁵ expression is upregulated in most cancers compared with normal tissues [23,30]. It was hypothesized that STAU1⁵⁵ upregulation facilitates tumor development via its role in cell cycle phase transitions. This present study suggests that, in addition, STAU1⁵⁵ expression may trigger inflammation and, thus, contribute to tumor growth.

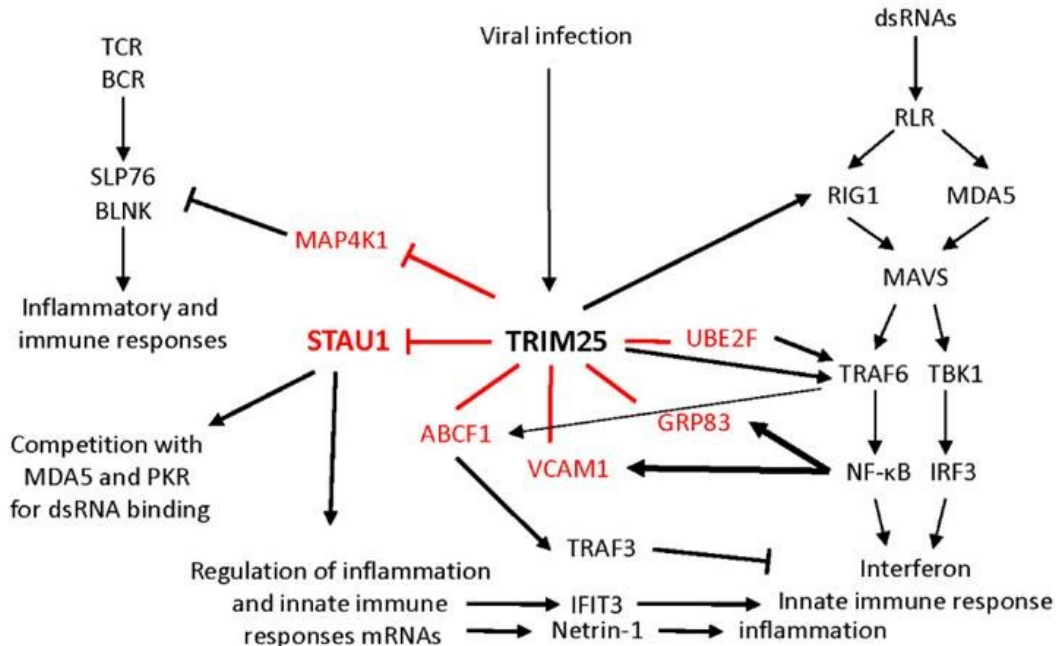


Figure 2-7. A family of proteins linked by the FPL-motif is involved in inflammation. Schematic representation of the interactions between proteins of the FPL-motif family, the E3-ubiquitin ligase TRIM25 and proteins of the adaptive (left pathway) and innate (right pathway) immune response pathways. TRIM25 activates the RIG1 pathway of the innate immune response via K63-ubiquitination of RIG1 and TRAF6. On the other hand, TRIM25 causes the degradation of MAP4K1, an inhibitor of the adaptive immune response via the T-cell (TCR) and B-cell (BCR) receptor pathways. It also degrades STAU1⁵⁵. Through competition for dsRNA binding, STAU1⁵⁵ prevents activation of proteins of the innate immune response such as MDA5 and PKR. STAU1⁵⁵ also up- or down-regulates expression of multiple mRNAs coding for proteins of the inflammatory and immune response pathways. For example, STAU1⁵⁵-mediated up-regulation of IFIT3 and netrin-1 leads to enhanced immune response via activation of the MAVS pathway and inflammation, respectively. TRIM25 also targets other proteins (in red). Whether it

activates (K63-ubi) or degrades (K48-ubi) these proteins is still unresolved. UBE2F activates the NF- κ B pathway and interferon production by K63-ubiquitination of TRAF6. ABCF1 enhances anti-inflammatory response by K63-ubiquitination-mediated activation of TRAF3. In turn, NF- κ B binds the promotor of the VCAM1 and GRP83 genes and up-regulates their expression.

STAU1⁵⁵ has a long tradition of interaction with genomic RNAs and proteins of several RNA viruses. Through these interactions, STAU1⁵⁵ influences viral RNA encapsidation, viral protein association, virus replication, and/or cap-dependent and cap-independent translation of viral proteins [31,54–58]. It also influences the immune and/or antiviral response. For example, following infectious bursal disease virus (IBDV) infection, STAU1⁵⁵ competes with the immune response protein MDA5 for the recognition and binding to viral dsRNAs [31]. As a consequence of its binding to the genomic dsRNA of IBDV, STAU1⁵⁵ prevents MDA5-mediated interferon- activation by virus infection, PKR blocks viral protein synthesis and activates the NF- κ B pathway, thus enhancing the expression of interferon cytokines to spread the antiviral response. In contrast, the binding of STAU1⁵⁵ to endogenous retrovirus dsRNAs induced by the inhibition of DNA methylation stabilizes these dsRNAs. The presence of these dsRNAs in the cells activates proteins of the immune response pathway and the downstream effectors [50]. Therefore, the presence of the FPL-degradation motif in STAU1⁵⁵ would permit us to modulate STAU1⁵⁵-mediated responses during the immune responses. STAU1⁵⁵ degradation may be important to reduce or terminate the inflammation process.

MAP4K1, ABCF1, ADGRG1, GPR83, and OMD are known for their anti-inflammatory functions [36,37,39,40,43]. MAP4K1 is a serine/threonine kinase that negatively regulates the inflammatory and the adaptive immune responses [40]. Upon interaction with the T-cell and B-cell receptors, MAP4K1 triggers a phosphorylation cascade that includes the phosphorylation and then the degradation of the T-cell and B-cell effectors SLP76 and BLNK, respectively. MAP4K1 is also a negative regulator of the antiviral innate immune response by interacting with the ubiquitin ligase DTX4, which, in turn, ubiquitinates TBK1 for degradation [60] (Figure 2-7). MAP4K1 activity and autophosphorylation then trigger its ubiquitination by the E3 ubiquitin ligase CUL7/fbxw8 and its degradation by the proteasome [41]. Our results now identify TRIM25 as an additional E3 ubiquitin ligase that degrades MAP4K1.

The anti-inflammatory functions of several proteins are often accomplished by regulating the activation of different specialized cells. For instance, ABCF1 induces the transition from M1 macrophages that set a cytokine storm to M2 macrophages that induce the tolerance phase and, thus, switch off inflammation [36]. The transition correlates with the activation of ABCF1 by TRAF6-mediated K63-ubiquitination. ABCF1 possesses an E2 ubiquitin enzyme activity and, via the activation of E3 ligases, activates proteins of the TLR4 signaling pathway, such as SYK and TRAF3 by K63-polyubiquitination, and reduces the inflammatory responses (Figure 2-7). Similarly, ADGRG1 inhibits the cytotoxicity of the natural killer (NK) cells and production of inflammatory cytokines [37]. Likewise, GPR83 is one of the signature genes expressed in immunosuppressive regulatory T cells (Treg), where its expression is regulated by the transcription factor NF-

κ B [39,61]. GPR83-transduced T cells can interfere with inflammatory responses in vivo, suggesting that GPR83 is involved in Treg induction during immune responses [39]. In contrast, VCAM1, UBE2F, and ABCC11 have proinflammatory roles [35,44,46]. VCAM1 is expressed in response to proinflammatory cytokine stimulation and plays a key role in the immune and inflammatory responses [46]. This transmembrane cell surface adhesion protein controls inflammation-associated leukocyte recruitment and adhesion at inflamed sites and transendothelial migration of leukocytes. Dysregulation of VCAM1 expression is indeed linked to several immunological disorders, such as rheumatoid arthritis and asthma [46]. UBE2F is an E2-NEDD8 ligase involved in the neddylation of proteins. UBE2F activates E3 ubiquitin Cullin-RING ligase 5 (CRL5) by neddylation, triggering K63-ubiquitination of TRAF6 and thus NF- κ B activation [62]. Following HIV1 infection, UBE2F is hijacked by the viral protein Vif to promote CRL5-mediated ubiquitination and degradation of the host antiviral proteins APOBEC3. UBE2F, thus, allows the virus to subvert the immune system and achieve a chronic infection [63].

TRIM25 Is the E3 Ubiquitin Ligase That Links a Family of Proteins Involved in Inflammation

TRIM25 is an E3 ubiquitin ligase that can catalyze the addition of K48- and K63-linked polyubiquitin chains for protein degradation or signal transduction, respectively [48,64]. TRIM25 plays several roles in the cells notably during development and differentiation in cancer and in the innate immune system [64,65]. The proximity labeling assays identify TRIM25 as a putative E3 ubiquitin ligase that mediates STAU1⁵⁵ degradation (Table 2-2).

The biochemical characterization of the wild-type and mutated proteins confirms that TRIM25 is involved in STAU1⁵⁵ and MAP4K1 degradation via the FPL-motif (Figure 2-6). This is consistent with a previous study showing that TRIM25 coimmunoprecipitates with STAU1 [66]. Strikingly, as documented for most of the proteins with the FPL-motif, the main role of TRIM25 is linked to antiviral, immune, and/or inflammatory responses. TRIM25 is part of the RIG-1/interferon pathway [48,64,67] (Figure 2-7). Upon infection, the pattern recognition receptor RIG-1 recognizes viral RNA molecules and initiates a downstream signaling cascade that leads to interferon production [68]. RIG-1 activity is stimulated by TRIM25-mediated K63-ubiquitination, leading to the activation of the innate immune response [48,67]. TRIM25 also activates the MDA5 pathway via ubiquitination and activation of TRAF6 [69]. Not surprisingly, then, many viruses elaborate specific mechanisms to target/impair the TRIM25/RIG-1 pathway and especially the ubiquitination of RIG-1 by TRIM25 to escape the immune response [70–75]. Interestingly, the TurboID assay identifies a cluster of proteins involved in the positive regulation of the RIG-I signaling pathway in the proximity of STAU1⁵⁵ (Supplementary Table 2-S5), suggesting that STAU1⁵⁵ is closely related to the immune and/or inflammatory responses. Our results add another layer to the complexity of protein turnover in different cell conditions. They identify TRIM25 as a novel factor in the turnover of the FPL-containing proteins to complement the involvement of other E3 ubiquitin ligases (Table 2-1) and fine-tune biological processes.

2.3.6 Materials & Methods

Cell culture

hTERT-RPE1 (immortalized retinal pigment epithelial cells) and HEK293T (human embryonic kidney cell line) cells were obtained from American Type Culture Collection. They were cultured in Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM, Wisent) supplemented with 10% fetal bovine serum (Wisent), 100 µg/ml streptomycin and 100 units/ml penicillin (Wisent) under 5% CO₂ atmosphere.

Plasmids and cloning strategies

Plasmid coding for HA-CDH1 was obtained from Dr Michele Pagano [76], and those coding for GFP-Ubi-K11 and GFP-Ubi-K11R from Dr Michel Bouvier [77]. Plasmids coding for STAU1⁵⁵-HA₃, STAU1^{Δ37}-HA₃, STAU1^{Δ46}-HA₃, STAU1^{Δ60}-HA₃ and STAU1^{Δ88}-HA₃ were previously described [19,20,78–80]. RBD2-YFP, RBD2^{Δ51}-YFP, RBD2^{Δ46}-YFP, and RBD2^{Δ37}-YFP were generated by PCR amplification of the N-terminal end of STAU1⁵⁵-HA₃ using sense and antisense oligonucleotide primers (Supp Table S7). PCR products were digested with the endonucleases EcoRI and AgeI and inserted into YFP CMV Topaz vector. For the alanine scanning of amino acids 37 to 51, STAU1⁵⁵-HA₃ was PCR amplified using the Pfu Ultra II polymerase (Agilent Technologies, Toronto, ON, Canada) and oligonucleotide primers (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) (Supplementary Table 2-S7). MAP4K1 was cloned in the pcDNA-RSV vector by PCR amplification from pDONR223-MAP4K1 (Supplementary Table 2-S7). pDONR223-MAP4K1 was a gift from Drs Hahn and Root (Addgene plasmid #23484; <http://n2t.net/addgene:23484> accessed on 30 October 2019; RRID: Addgene_23484)

[81]. The PCR product was cloned at the XhoI and NotI sites. An HA₃ tag was then inserted at the NotI site as described [110]. The MAP4K1^{F651A}-HA₃ mutant was generated using the Pfu Ultra II polymerase and specific oligonucleotide primers (Supplementary Table 2-S7).

To produce STAU1⁵⁵-HA₃-biotin ligase (BioID2), STAU1⁵⁵-HA₃ in pCDNA3 RSV was PCR amplified using oligonucleotide primers (IDT, Coralville, IA, USA) (Supplementary Table 2-S7). The PCR product was digested with the restriction enzymes NheI (Thermo Scientific) and SacI (NEB, Whitby, ON, Canada) and ligated into MCS-BioID2-HA (a gift from Dr Kyle Roux. Addgene plasmid # 74224; <http://n2t.net/addgene:74224>; RRID: Addgene_74224) [82]. STAU1⁵⁵-BioID2 was then pulled of the vector by digestion with NheI and AgeI and inserted into pMSCVpuro. To produce STAU1⁵⁵-HA₃-TurboID, STAU1⁵⁵-HA₃ in pCDNA3 RSV was PCR amplified using oligonucleotide primers (IDT, Coralville, IA, USA) (Supplementary Table 2-S7). The PCR product was digested with the restriction enzymes NotI (NEB, Whitby, ON, Canada) and NheI (Thermo Scientific, St-Laurent, QC, Canada) and ligated into V5-TurboID-NES_pCDNA3 (a gift from Dr Alice Ting, Addgene plasmid #107169; <http://n2t.net/addgene:107169> accessed on 13 April 2019; RRID: Addgene_107169) [83] with

T4 ligase (NEB, Whitby, ON, Canada). STAU1⁵⁵-TurboID was then extracted by digestion with NotI (NEB, Whitby, ON, Canada) and BglII, treated with PNK (Thermo Scientific, St-Laurent, QC, Canada) and inserted in pMCVpuro after digestion with HpaI (Thermo Scientific, St-Laurent, QC, Canada). Positive clones were selected and digested with NotI to insert the HA₃ tag as described [110]. siRNAs against the ubiquitin-ligases

TRIM25, TRIP12 and ZNF598 were purchased from IDT. Oligonucleotide primers used to quantify their expression are listed in supplementary Table 2-S7.

Antibodies and reagents

Antibodies against GFP (11814460001) were purchased from Roche (Oakville, ON, Canada) and used to detect YFP-tagged proteins since the two proteins are identical except for one amino acid and anti-GFP antibody perfectly recognizes YFP. Anti-STAU1 was previously described [84]. Anti- β -actin (A5441) and anti- α -tubulin (T5168) were obtained from Sigma-Aldrich (Aokville, ON, Canada). Anti-HA (SC7392) and anti-CDC20 (SC13162) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). All primary antibodies were used at 1:1000 dilution. MG132 (C2211) and DMSO were purchased from Millipore-Sigma (Aokville, ON, Canada).

Western blot analysis

Total-cell extracts were prepared in laemli lysis buffer (25 mM Tris-Cl pH 7.4, 1% SDS), and protein concentrations were determined using the PierceTM BCA protein assay (23223) (Thermo Scientific, St-Laurent, QC, Canada). Cell extracts (10–20 μ g) were analyzed by western blotting. Data were collected either on X-ray films (Fujifilm- Christie Innomed, St-Eustache, QC, Canada) or with the ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories- St-Laurent, QC, Canada) and western blot signals were quantified with the ImageJ or ImageLab (Bio-Rad Laboratories- St-Laurent, QC, Canada) softwares (version number:1.53c), respectively.

Stabilisation, degradation and ubiquitination assays

For the analysis of STAU1⁵⁵ stabilization, HEK293T cells were transfected with STAU1⁵⁵ or its deletion mutants and treated with the proteasome inhibitor MG132 (20 µM) for 8 h. For degradation assay, HEK293T cells were cotransfected with plasmids coding for STAU1⁵⁵-HA₃, RBD2-YFP, or their mutants and plasmids coding for the empty vector, CDC20-HA or CDH1-HA. For ubiquitination assays, HEK293T cells were cotransfected with plasmids coding for STAU1⁵⁵ or its mutants and for GFP-UBI or GFP-UBI-K11R. Twenty-four hours after transfection, cells were treated with MG132 as described above. Protein extracts were prepared in the lysis buffer, cleared by sonication for 20 s, and centrifuged at 15,000x g for 15 min. Proteins were analyzed by Western blotting.

RNA isolation and RT-qPCR

RNA isolation was performed by homogenisation of HEK293T cells with TRIZOL reagent (Ambion, St-Laurent, QC, Canada). After precipitation, purified RNAs were resuspended in 40-50 µl of purified water (RNA free) and digested with DNase using the TURBO DNA-free kit (Ambion, St-Laurent, QC, Canada). An amount of 1 µg of the resulting RNA was used for the reverse transcription reaction using the RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific, St-Laurent, QC, Canada) and oligo(dT). qPCR was performed in triplicates using the Luna® Universal qPCR Master Mix (NEB—Whitby, ON, Canada) in a 96 wells plate and ran on a LightCycler96 (Roche-Oakville, ON, Canada). Normalization was done using the average of HPRT and RPL22 gene expression.

BiOLD2/TurbOLD immunoprecipitation

hTERT-RPE1 cells were used to generate a stable cell line expressing STAU1⁵⁵-HA₃-BiOLD2 or STAU1⁵⁵-HA₃-TurbOLD by retroviral infection. After puromycin selection, cells

were incubated in the presence of 50 μ M biotin (SIGMA—Oakville, ON, Canada) for either 16 h (BioID2) or 3 h (TurboID). For the TurboID assay, cells were first synchronized either in mitosis with nocodazole or in G₁/S by a double thymidine block as described [90], before incubation with biotin. Biotinylated proteins were pulled down with 250 μ L of pre-washed streptavidin-coated magnetic beads (Dynabeads MyOne Streptavidin T1). Beads were then washed six times with RIPA lysis buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1X protease inhibitor cocktail, 1X PhosStop), once with 1 M KCl, once with 8 M urea in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), three times with modified RIPA lysis buffer (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 0.02% SDS, 0.5% sodium deoxycholate and 0.2% Triton X-100) and once with 0.1 M Na₂CO₃. Beads were then resuspended in 100 μ L of 50 mM ammonium bicarbonate solution.

Protein digestion and LC-MS/MS

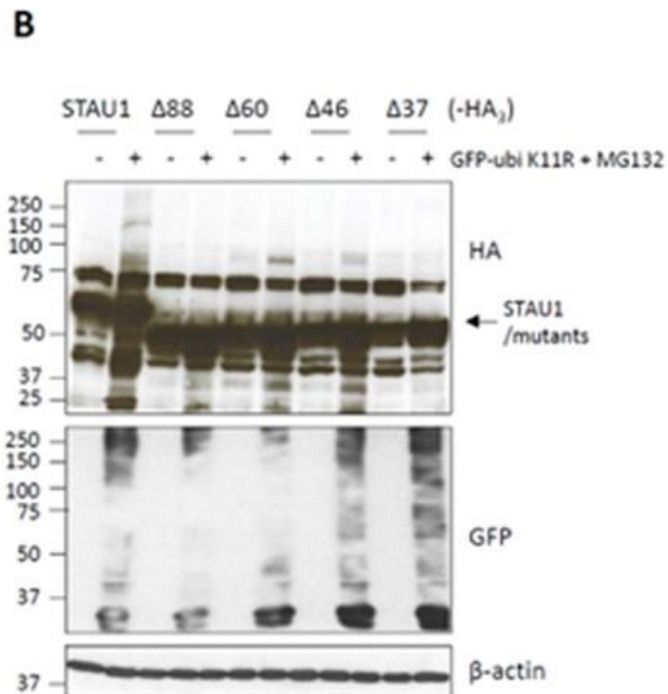
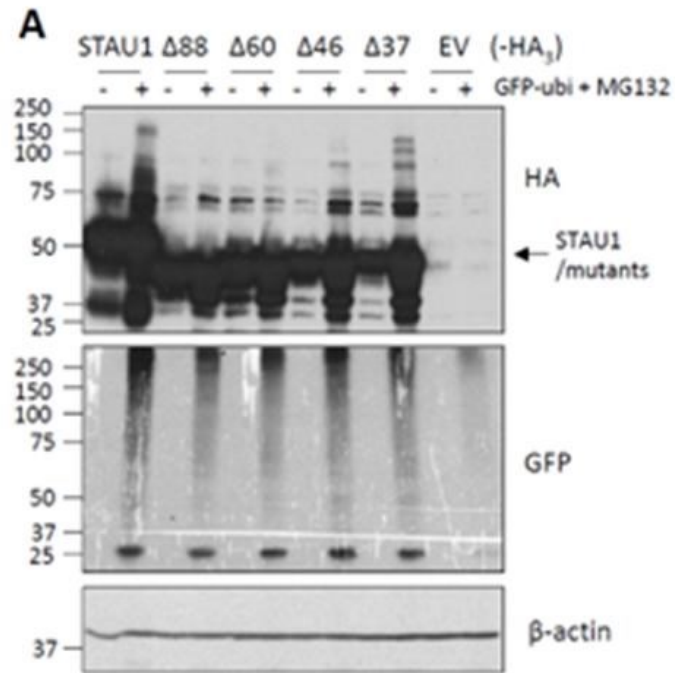
Proteins on beads were digested overnight with 1 μ g of Sequencing Grade Modified Trypsin (Promega—Madison, WI, USA). Resulting peptides were reduced in 9 mM dithiothreitol for 30 minutes at 37°C and alkylated with 17 mM iodoacetamide for 20 minutes at room temperature. Peptides were then desalted and eluted in 10% ammonium hydroxide/ 90% methanol and resuspended in 5% formic acid. Peptides were injected in the Easy-nLC II system (Proxeon Biosystems—St-Laurent, QC, Canada) for chromatography using two buffers, 0.2% formic acid and 0.2% formic acid plus 90% acetonitrile. Peptides were sent to a Q Exactive mass spectrometer (Thermo Scientific, St-Laurent, QC, Canada) through a Nanospray Flex Ion Source set to 1.3-1.8kV for the Nanospray and to 50V for the S-lens at a capillary temperature of 225°C. The MS survey spectra was acquired in the Orbitrap with a resolution of 70,000. The most intense peptide

ions were fragmented, and the MS/MS was also analysed in the Orbitrap. The mass spectrometry proteomics data have been deposited in the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [85] partner repository with the dataset identifiers PXD036675 and 10.6019/PXD036675.

2.3.7 Conclusions

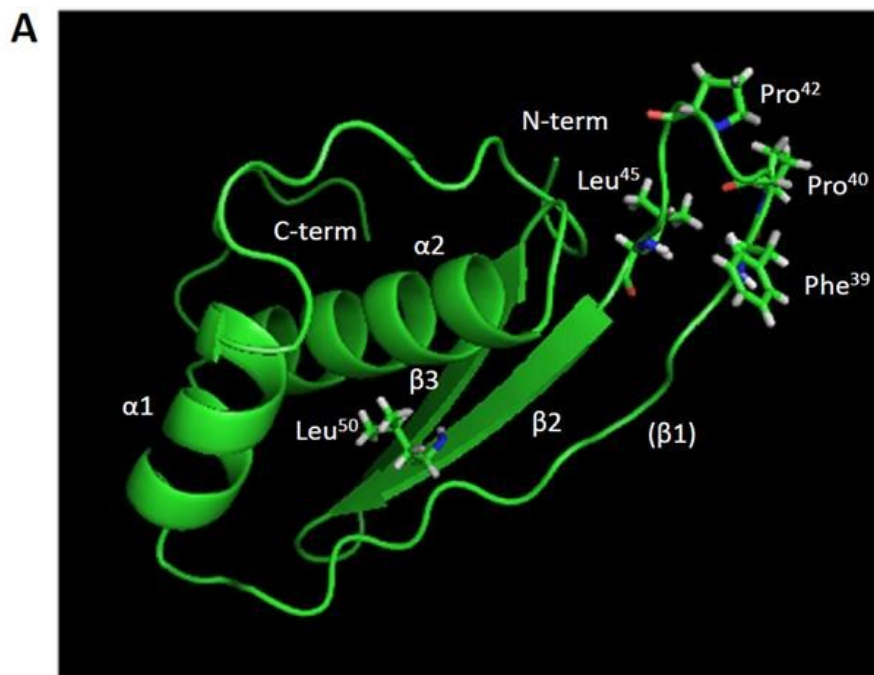
The fine-tuning of biological processes needs the coordinated regulation of effector proteins by upstream modulators. We show that the E3 ubiquitin ligase TRIM25 can be one of these modulators in charge of a family of proteins involved in inflammation. Interestingly, although the number of proteins in the family is relatively modest, the inflammatory signal initiated by TRIM25 can be highly amplified by the FPL-motif-containing proteins. In fact, these proteins control post-transcriptional and post-translational processes and/or trigger signal transduction (RNA-binding protein, kinases, transporters, receptors, ubiquitin ligase) (Table 2-1). It will be interesting to define the type of ubiquitination chains (K48; K63) on proteins of the family as a clue to whether the ubiquitination process is used to activate or attenuate the inflammatory process. The relevance of TRIM25 in the regulation of the family is strengthened by the observation of a direct interaction with STAU1⁵⁵ [66]. Whether TRIM25 interacts with other proteins of the family via the FPL-motif is still an open question. Similarly, it will be relevant to determine how TRIM25 affects the pathways normally controlled by the proteins and whether this family of proteins is involved in cancer-related inflammation. Once the role of the FPL-motif is better understood, it will be essential to determine whether it can serve as platforms for drug targeting against cancer and/or inflammatory diseases.

2.3.8 Supplemental material



Supplementary Figure S1. STAU1⁵⁵ is tagged by K11-ubiquitin chains.

HEK293T cells were co-transfected with plasmids coding for STAU1⁵⁵-HA₃ (STAU1) or deletion mutants and for GFP-ubi (+) (A) or GFP-ubi-K11R (+) (B). Cells expressing GFP-ubi or GFP-ubi-K11R were further incubated in the presence (+) or absence (-) of MG132 for 8 h. Protein extracts were analyzed by western blotting using anti-HA (to detect STAU1) and anti-GFP (to detect total protein ubiquitination) antibodies. The blots are representative of three independently performed experiments that gave similar results.



B STAU1

Homo	Y	P	F	P	V	P	P	L	L	Y	Q	V	E	L	S
Macaca	Y	P	F	P	V	P	P	L	L	Y	Q	V	E	L	S
Rattus	Y	P	F	P	V	P	P	L	L	Y	Q	V	E	L	S
Mus	Y	P	F	P	V	P	P	L	L	Y	Q	V	E	L	S
Bos	Y	P	F	P	V	p	P	L	L	Y	Q	V	E	L	S
Canis	Y	P	F	P	V	P	P	L	L	Y	Q	V	E	L	S
Xenopus	Y	P	F	P	V	A	P	I	L	Y	Q	V	E	L	S
Gallus	Y	P	F	P	V	G	P	L	L	Y	Q	V	E	L	S
Danio	Y	P	F	P	V	G	P	V	L	Y	H	M	E	L	S

C MAP4K1

Homo	V	L	F	P	L	P	T	P	L	S	V	F	A	L	L
Macaca	V	L	F	P	L	P	T	P	L	S	V	F	A	L	L
Rattus	V	L	F	P	L	P	T	P	L	P	V	F	A	L	L
Mus	V	L	F	P	L	P	T	P	L	P	V	F	T	L	L
Bos	V	L	F	P	L	P	T	P	L	P	V	F	A	L	L
Canis	V	L	F	P	L	P	T	P	L	P	V	F	A	L	L
Xenopus	F	D	F	P	L	P	N	P	L	R	V	F	Q	M	L
Gallus	F	D	F	P	L	P	S	P	L	R	V	F	E	M	L

D ABCC11

Homo	P	R	F	P	A	P	Q	P	L	D	N	A	G	L	F
Macaca	P	R	F	P	A	P	Q	P	L	D	D	A	G	L	F
Bos	P	K	F	P	E	P	Q	P	L	D	D	A	G	L	F
Canis	P	K	F	P	A	P	Q	P	M	D	D	A	G	L	F

E ABCF1

Homo	F	T	F	P	D	P	P	P	L	S	P	P	V	L	G
Macaca	F	T	F	P	D	P	P	P	L	S	P	P	V	L	G
Rattus	F	T	F	P	D	P	P	P	L	S	P	P	V	L	G
Mus	F	T	F	P	D	P	P	P	L	S	P	P	V	L	G
Bos	F	T	F	P	D	P	P	P	L	S	P	P	V	L	G
Canis	F	T	F	P	N	P	P	P	L	S	P	P	V	L	G
Xenopus	F	T	F	P	N	P	P	P	L	S	P	P	I	L	G
Danio	F	T	F	P	N	P	P	P	L	S	P	P	I	L	G

F ADGRG1

Homo	R	S	F	P	D	P	R	G	L	Y	H	F	C	L	Y
Macaca	R	S	F	P	H	P	R	G	L	Y	H	F	C	L	Y
Rattus	Y	F	F	P	E	P	R	G	L	Y	H	F	C	L	Y
Mus	R	F	F	P	E	P	R	G	L	Y	H	F	C	L	Y
Bos	W	P	F	P	L	P	R	G	L	Y	H	F	C	L	Y
Canis	Q	L	F	P	E	P	R	G	L	Y	H	F	C	L	Y
Xenopus	F	T	L	Q	S	L	P	G	P	Y	I	F	C	V	H
Gallus	Y	S	L	P	T	T	L	G	R	Y	R	F	C	I	Y
Danio	L	D	S	N	P	H	Q	N	Q	S	H	F	C	V	F

G GPR83

Homo	P	D	F	P	E	P	A	D	L	F	W	K	Y	L	D
Macaca	P	D	F	P	E	P	A	D	L	F	W	K	Y	L	D
Rattus	P	D	F	P	E	P	A	D	L	F	W	K	Y	L	D
Mus	P	D	F	P	E	P	A	D	L	F	W	K	Y	L	D
Bos	P	D	F	P	E	P	A	D	L	F	W	K	Y	L	D
Canis	P	D	F	P	E	P	A	D	L	F	W	K	Y	L	D
Xenopus	P	D	F	P	E	P	S	D	L	F	W	K	Y	L	D
Gallus	P	D	F	P	E	P	A	D	L	F	W	K	Y	L	D
Danio	P	S	F	P	H	P	S	D	L	F	W	K	Y	L	D

H KBTBD13

Homo	A	G	F	P	R	P	G	S	L	Q	T	F	L	L	R
Macaca	A	G	F	P	R	P	G	S	L	Q	T	F	L	L	R
Rattus	A	G	F	P	R	P	G	S	L	Q	T	F	L	L	R
Mus	A	G	F	P	R	P	G	S	L	Q	T	F	L	L	R
Bos	A	G	F	P	R	P	G	S	L	Q	T	F	L	L	R
Canis	A	G	F	P	R	P	G	S	L	Q	T	C	L	L	R
Xenopus	A	G	F	N	R	G	G	S	L	H	T	F	F	L	R
Gallus	S	E	F	P	S	P	H	Q	L	R	Y	D	V	R	L
Danio	T	G	F	P	R	I	G	S	K	W	T	F	L	L	R

I LING04

Homo	T	A	F	P	S	P	D	K	L	V	T	L	R	L	S
Macaca	T	A	F	P	S	P	D	K	L	V	T	L	R	L	S
Rattus	T	A	F	P	S	P	D	K	L	V	T	L	R	L	S
Mus	T	A	F	P	S	P	D	K	L	V	T	L	R	L	S
Bos	T	A	F	P	S	P	D	K	L	V	T	L	R	L	S
Canis	T	A	F	P	S	P	D	K	L	V	T	L	R	L	S
Xenopus	D	A	L	P	S	P	L	G	L	E	T	L	L	L	S

J MCHR2

Homo	F	F	F	P	L	P	L	I	L	V	C	Y	I	L	I
Macaca	F	F	F	P	L	P	L	I	L	V	C	Y	I	L	I
Bos	S	F	F	P	L	P	L	I	L	M	C	Y	I	L	I
Canis	F	F	F	P	L	P	L	I	L	V	C	Y	I	L	I
Xenopus	F	F	F	P	L	P	L	I	L	A	C	Y	I	L	I
Gallus	F	V	I	P	V	L	V	I	S	L	S	Y	T	R	T

K OMD

Homo	F	P	F	P	L	P	K	S	L	E	R	L	L	L	G
Macaca	F	P	F	P	L	P	K	S	L	E	R	L	L	L	G
Rattus	F	P	F	P	L	P	K	S	L	E	R	L	L	L	G
Mus	F	P	F	P	L	P	K	S	L	E	R	L	L	L	G
Bos	F	P	F	P	L	P	K	S	L	E	R	I	F	L	G
Canis	F	P	F	P	L	P	K	S	L	E	R	L	L	L	G
Xenopus	I	P	P	D	L	P	S	S	V	E	R	L	N	F	A
Gallus	F	P	F	P	L	P	S	S	L	E	R	L	L	L	G
Danio	I	P	S	P	L	P	K	T	L	K	R	L	H	L	G

L UBE2F

Homo	V	H	F	P	D	P	N	K	L	H	C	F	Q	L	T
Macaca	V	H	F	P	D	P	N	K	L	H	C	F	Q	L	T
Rattus	V	H	F	P	D	P	N	K	L	H	C	F	Q	L	T
Mus	V	H	F	P	D	P	N	K	L	H	C	F	Q	L	T
Bos	V	H	F	P	D	P	N	K	L	H	C	F	Q	L	T
Canis	V	H	F	P	D	P	N	K	L	H	C	F	Q	L	T
Xenopus	V	N	F	P	D	P	N	K	L	H	Y	F	H	L	T
Gallus	V	N	F	P	D	P	N	K	L	H	Y	F	Q	L	T
Danio	V	T	F	P	D	E	N	K	L	C	H	F	Q	L	A

M VCAM1

Homo	Q	G	F	P	A	P	K	I	L	W	S	R	Q	L	P
Macaca	H	G	L	P	A	P	K	I	L	W	S	R	Q	L	P
Rattus	D	G	F	P	T	P	K	I	L	W	S	R	Q	L	K
Mus	D	G	I	P	A	P	K	I	L	W	S	R	Q	L	N
Bos	N	G	L	P	A	P	K	I	L	W	S	R	K	L	S
Canis	D	G	L	P	A	P	K	I	L	W	S	R	R	L	S
Xenopus	E	A	F	P	T	P	T	L	I	L	K	E	K	T	E
Gallus	D	S	N	P	P	A	Q	V	F	W	R	K	H	L	A
Danio	D	S	F	P	A	G	R	M	V	L	S	R	V	V	D

Supplementary Figure S2. In silico modelling of the FPL-motif. (A) In silico modelling (I-Tasser software) of the RBD2 domain with the position of amino acids of the

FPL-motif. While the predicted alpha helices ($\alpha 1$ and $\alpha 2$) and the beta sheaths ($\beta 2$ and $\beta 3$) of RNA-binding domains are conserved, the beta sheath $\beta 1$ is disordered in the modelling. The FPL-motif is located in the loop between the disordered region and β -sheath 2 (Phe39, Pro40, Pro42, Leu45) and in the beta sheath $\beta 2$ (Leu50). (B-M) Amino acid conservation of the FPL-motif through evolution. Blue columns: amino acids required for the function of the FPL-motif. Homo, humans. Macaca, macaques. Rattus, rats. Mus, mice. Bos, cattle. Canis, dog. Xenopus, frogs. Gallus, chicken. Danio, zebrafish.

Supplementary tables 2-S1-S6. High throughput studies results. The results can be found and downloaded at the external link:

<https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms231911588/s1>.

Supplementary Table 2-S7. List of oligonucleotides used in this study.

Plasmids	Oligonucleotide primers	
	Sense	Antisense
Y37A	5'-GGTACTTTGCCCAATTCC-3'	5'-GGAAATGGGGCAAAGTACC-3'
P38A	5'-GTACTTTTACGCATTCCAGTCC-3'	5'-GGAAC TGGAAATGCGTAAAAGTAC-3'
F39A	5'-CTTTTACCAGCTCCAGTCCACC-3'	5'-GGTGGAACTGGAGCTGGGTAAG-3'
P40A	5'-CTTTTACCATTGCAAGTCCACC-3'	5'-GGTGGAACTGCAAAATGGGTAAG-3'
V41A	5'-CCCAATTCAGCTCCACCTTAC-3'	5'-GTAAAGGTGGAGCTGGAAATGGG-3'
P42A	5'-CCCAATTCAGTTGCACCTTAC-3'	5'-GTAAAGGTGCAACTGGAATGGG-3'
P43A	5'-CATTTCAGTTCAGCTTACTTTATC-3'	5'-GATAAAGTAAAGCTGGAAGTGGAAATG-3'
L44A	5'-CAGTTCACCTGCACCTTATCAAG-3'	5'-CTTGATAAAGTGCAGGTGGAACTG-3'
L45A	5'-CAGTTCACCTTAGCTTATCAAGTG-3'	5'-CACTTGATAAGCTAAAGGTGGAACTG-3'
Y46A	5'-CCACCTTTACTTGCTCAAGTGGAAAC-3'	5'-GTTCCACTTGAGCAAGTAAAGGTGG-3'
N47A	5'-CTTTACTTTATGCAGTGGAAAC-3'	5'-GTTCCACTGCATAAAGTAAAG-3'
V48A	5'-CTTTATCAAGCGGAACCTTCTG-3'	5'-CAGAAAGTTCGGCTTGATAAAG-3'
E49A	5'-TATCAAGTGGCACCTTCTGTGG-3'	5'-CCACAGAAAGTGCACCTTGATA-3'
L50A	5'-CAAGTGGAAAGCTTCTGTGGG-3'	5'-CCCACAGAAGCTTCCACTTG-3'
S51A	5'-GTGGAACCTGCTGTGGGAGG-3'	5'-CCTCCCACAGCAAGTCCAC-3'
RBD2	5'-TACCGAATTCATGTATAAGCTGTGACCTTAC-3'	5'-TACCACCGGTGATTCTCTTCCATTACCTCCAG-3'
RBD2 ²⁵¹	5'-TACCGAATTCATGGTGGGAGGACAGCAATTAATG-3'	5'-TACCACCGGTGATTCTCTTCCATTACCTCCAG-3'
RBD2 ²⁴⁶	5'-TACCGAATTCATGCAAGTGGAACTTCTGTGGG-3'	5'-TACCACCGGTGATTCTCTTCCATTACCTCCAG-3'
RBD2 ²³⁷	5'-TACCGAATTCATGCCATTTCCAGTTCACCTTAC-3'	5'-TACCACCGGTGATTCTCTTCCATTACCTCCAG-3'
MAP4K1	5'-CTCGAGATGGACGTCGTGGACCCTGAC-3'	5'-ATTATAAGCGCCGCTCCTGGATGTAGAGGTTG-3'
MAP4K1 ^{F651A}	5'-GCAGGTGCTGGCCCACTGCCG-3'	5'-CGGCAGTGGGGCCAGCACCTGC-3'
TRIM25	5'-GGAGGGAGACTTTCAGTCTTAC-3'	5'-ATAGGTGAGGCTGACTCAAAGCC-3'
TRIP12	5'-GTTTCATCTGTACTTGACATTTATCC-3'	5'-GTCCCGTGATTGAAGGAGG-3'
ZNF598	5'-TGCTGGGACCTGTTGTGC-3'	5'-CACAAACATCTGTGACATCTGACT-3'
STAU1 ⁵⁵ HA ₃ -BioID2	5'-ATATATGAGCTCATGAAACTTGGAAAAAACAATG-3'	5'-ATATATAGCGCTGGCACCTCCACACACAGAC-3'
STAU1 ⁵⁵ HA ₃ -TurboID	5'-TAAGCAGCGGGCCGCCACCATGAAACTTGGAAAAA AACCA-3'	5'-TGTACAGTAGCGAATTCGAATCCGGAGACGTA CGATGCGTAATCCGGTACATC-3'
HPRT	5'-GCTTTCCTTGGTCAGGCAGAT-3'	5'-CTTCGTGGG GTCCTTTTACC-3'
RPL22	5'-TTGCTGTTAGCAACTACGCACAAC-3'	5'-TGGTGACCATCGAAAGGAGCAAGA-3'

Author contributions

Conceptualization, Y.G.Q. and L.D.; methodology, Y.G.Q. and L.D.; validation, Y.G.Q. and L.D.; formal analysis, Y.G.Q.; investigation, Y.G.Q.; writing—original draft, Y.G.Q.; writing—review and editing, Y.G.Q. and L.D.; visualization, Y.G.Q. and L.D.; supervision, L.D.; project administration, L.D.; funding acquisition, L.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (grant number MOP-229979) and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (grant number RGPIN-2019-05027) to L.D.G. The funding agencies had no role in the design of the study; collection, analysis, and interpretation of data; and writing of the manuscript.

Data availability statement

The data presented in this study are available in the manuscript and Supplementary Materials. The mass spectrometry proteomics data have been deposited in the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [85] partner repository with the dataset identifiers PXD036675 and 10.6019/PXD036675.

Conflict of interests and other ethics statements

The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

2.3.9 Acknowledgments

We thank Louise Cournoyer for the help with cell culture and Bellastrid Doran, Laurie Chevalier, Lionel Condé, Florence Bonnet-Magnaval, Mehdi Ghram, and Karine Boulay for the technical support and/or useful suggestions. We thank the proteomics core facilities at the Institut de Recherches Cliniques de Montréal (and especially Josée Champagne, Sylvain Tessier, Marguerite Boulos, and Denis Faubert) and at the Institut de Recherche en Immunologie et Cancer (especially Eric Bonneil) for the proteomics analysis. We thank Josée Harel (Département de pathologie et microbiologie, Université de Montréal) for the scientific support.

2.3.10 References

1. Piotrowski, I.; Kulcenty, K.; Suchorska, W. Interplay between inflammation and cancer. *Rep. Pract. Oncol. Radiother.* 2020, 25, 422–427.
2. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011, 144, 646–674.
3. Alber, A.B.; Suter, D.M. Dynamics of protein synthesis and degradation through the cell cycle. *Cell Cycle* 2019, 18, 784–794.
4. Hanna, J.; Guerra-Moreno, A.; Ang, J.; Micoogullari, Y. Protein Degradation and the Pathologic Basis of Disease. *Am. J. Pathol.* 2019, 189, 94–103.
5. Aliabadi, F.; Sohrabi, B.; Mostafavi, E.; Pazoki-Toroudi, H.; Webster, T.J. Ubiquitin-proteasome system and the role of its inhibitors in cancer therapy. *Open Biol.* 2021, 11, 200390.
6. Finley, D. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu. Rev. Biochem.* 2009, 78, 477–513.
7. Sahu, I.; Mali, S.M.; Sulkshane, P.; Xu, C.; Rozenberg, A.; Morag, R.; Sahoo, M.P.; Singh, S.K.; Ding, Z.; Wang, Y.; et al. The 20S as a stand-alone proteasome in cells can degrade the ubiquitin tag. *Nat. Commun.* 2021, 12, 6173.
8. Ronai, Z.A. Monoubiquitination in proteasomal degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2016, 113, 8894–8896.
9. Swatek, K.N.; Komander, D. Ubiquitin modifications. *Cell Res.* 2016, 26, 399–422.
10. Lopez-Castejon, G. Control of the inflammasome by the ubiquitin system. *FEBS J.* 2020, 287, 11–26.
11. Goru, S.K.; Pandey, A.; Gaikwad, A.B. E3 ubiquitin ligases as novel targets for inflammatory diseases. *Pharmacol. Res.* 2016, 106, 1–9.
12. Nakayama, K.I.; Nakayama, K. Ubiquitin ligases: Cell-cycle control and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2006, 6, 369–381.
13. Ella, H.; Reiss, Y.; Ravid, T. The Hunt for Degrons of the 26S Proteasome. *Biomolecules* 2019, 9, 230.
14. Manchado, E.; Eguren, M.; Malumbres, M. The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C): Cell-cycle-dependent and -independent functions. *Biochem. Soc. Trans.* 2010, 38, 65–71.
15. Pesin, J.A.; Orr-Weaver, T.L. Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2008, 24, 475–499.
16. He, J.; Chao, W.C.; Zhang, Z.; Yang, J.; Cronin, N.; Barford, D. Insights into degron recognition by APC/C coactivators from the structure of an Acm1-CDH1 complex. *Mol. Cell* 2013, 50, 649–660.
17. Burton, J.L.; Tsakraklides, V.; Solomon, M.J. Assembly of an APC-CDH1-substrate complex is stimulated by engagement of a destruction box. *Mol. Cell* 2005, 18, 533–542.
18. Pfleger, C.M.; Kirschner, M.W. The KEN box: An APC recognition signal distinct from the D box targeted by CDH1. *Genes Dev.* 2000, 14, 655–665.
19. Boulay, K.; Ghram, M.; Viranaicken, W.; Trepanier, V.; Mollet, S.; Frechina, C.; DesGroseillers, L. Cell cycle-dependent regulation of the RNA-binding protein Staufen1. *Nucleic Acids Res.* 2014, 42, 7867–7883.

20. Wickham, L.; Duchaine, T.; Luo, M.; Nabi, I.R.; DesGroseillers, L. Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* 1999, 19, 2220–2230.
21. Marion, R.M.; Fortes, P.; Beloso, A.; Dotti, C.; Ortin, J. A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* 1999, 19, 2212–2219.
22. Duchaine, T.; Wang, H.J.; Luo, M.; Steinberg, S.V.; Nabi, I.R.; DesGroseillers, L. A novel murine Staufen isoform modulates the RNA content of Staufen complexes. *Mol. Cell. Biol.* 2000, 20, 5592–5601.
23. Bonnet-Magnaval, F.; DesGroseillers, L. The Staufen1-dependent cell cycle regulon or how a misregulated RNA-binding protein leads to cancer. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2021, 96, 2192–2208.
24. Kim, Y.K.; Furic, L.; Desgroseillers, L.; Maquat, L.E. Mammalian Staufen1 recruits UPF1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* 2005, 120, 195–208.
25. Dugre-Brisson, S.; Elvira, G.; Boulay, K.; Chatel-Chaix, L.; Mouland, A.J.; DesGroseillers, L. Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2005, 33, 4797–4812.
26. Kohrmann, M.; Luo, M.; Kaether, C.; DesGroseillers, L.; Dotti, C.G.; Kiebler, M.A. Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol. Biol. Cell* 1999, 10, 2945–2953.
27. Ravel-Chapuis, A.; Belanger, G.; Yadava, R.S.; Mahadevan, M.S.; DesGroseillers, L.; Cote, J.; Jasmin, B.J. The RNA-binding protein Staufen1 is increased in DM1 skeletal muscle and promotes alternative pre-mRNA splicing. *J. Cell Biol.* 2012, 196, 699–712.
28. Hassine, S.; Bonnet-Magnaval, F.; Benoit Bouvrette, L.P.; Doran, B.; Ghram, M.; Bouthillette, M.; Lecuyer, E.; DesGroseillers, L. Staufen1 localizes to the mitotic spindle and controls the localization of RNA populations to the spindle. *J. Cell Sci.* 2020, 133, jcs247155.
29. Ghram, M.; Bonnet-Magnaval, F.; Hotea, D.I.; Doran, B.; Ly, S.; DesGroseillers, L. Staufen1 Is Essential for Cell-Cycle Transitions and Cell Proliferation via the Control of E2F1 Expression. *J. Mol. Biol.* 2020, 432, 3881–3897.
30. Almasi, S.; Jasmin, B.J. The multifunctional RNA-binding protein Staufen1: An emerging regulator of oncogenesis through its various roles in key cellular events. *Cell. Mol. Life Sci.* 2021, 78, 7145–7160.
31. Ye, C.; Yu, Z.; Xiong, Y.; Wang, Y.; Ruan, Y.; Guo, Y.; Chen, M.; Luan, S.; Zhang, E.; Liu, H. STAU1 binds to IBDV genomic double-stranded RNA and promotes viral replication via attenuation of MDA5-dependent beta interferon induction. *FASEB J.* 2019, 33, 286–300.
32. Zhong, Y.; Hu, Z.; Wu, J.; Dai, F.; Lee, F.; Xu, Y. STAU1 selectively regulates the expression of inflammatory and immune response genes and alternative splicing of the nerve growth factor receptor signaling pathway. *Oncol. Rep.* 2020, 44, 1863–1874.

33. Gonzalez Quesada, Y.; Bonnet-Magnaval, F.; DesGroseillers, L. Phosphomimicry on STAU1 Serine 20 Impairs STAU1 Posttranscriptional Functions and Induces Apoptosis in Human Transformed Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 7344.
34. Barnault, R.; Verzeroli, C.; Fournier, C.; Michelet, M.; Redavid, A.R.; Chicherova, I.; Plissonnier, M.L.; Adrait, A.; Khomich, O.; Chapus, F.; et al. Hepatic inflammation elicits production of proinflammatory netrin-1 through exclusive activation of translation. *Hepatology* 2022.
35. Yunchun, L.; Yue, W.; Jun, F.Z.; Qizhu, S.; Liumei, D. Clinical Significance of Myeloid-Related Protein 8/14 as a Predictor for Biological Treatment and Disease Activity in Rheumatoid Arthritis. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2018, 48, 63–68.
36. Arora, H.; Wilcox, S.M.; Johnson, L.A.; Munro, L.; Eyford, B.A.; Pfeifer, C.G.; Welch, I.; Jefferies, W.A. The ATP-Binding Cassette Gene ABCF1 Functions as an E2 Ubiquitin-Conjugating Enzyme Controlling Macrophage Polarization to Dampen Lethal Septic Shock. *Immunity* 2019, 50, 418–431.e41.
37. Chang, G.W.; Hsiao, C.C.; Peng, Y.M.; Vieira Braga, F.A.; Kragten, N.A.; Remmerswaal, E.B.; van de Garde, M.D.; Straussberg, R.; Konig, G.M.; Kostenis, E.; et al. The Adhesion G Protein-Coupled Receptor GPR56/ADGRG1 Is an Inhibitory Receptor on Human NK Cells. *Cell Rep.* 2016, 15, 1757–1770.
38. Usener, D.; Schadendorf, D.; Koch, J.; Dubel, S.; Eichmuller, S. cTAGE: A cutaneous T cell lymphoma associated antigen family with tumor-specific splicing. *J. Investig. Dermatol.* 2003, 121, 198–206.
39. Hansen, W.; Westendorf, A.M.; Toepfer, T.; Mael, S.; Geffers, R.; Gruber, A.D.; Buer, J. Inflammation in vivo is modulated by GPR83 isoform-4 but not GPR83 isoform-1 expression in regulatory T cells. *Genes Immun.* 2010, 11, 357–361.
40. Chuang, H.C.; Wang, X.; Tan, T.H. MAP4K Family Kinases in Immunity and Inflammation. *Adv. Immunol.* 2016, 129, 277–314.
41. Wang, H.; Chen, Y.; Lin, P.; Li, L.; Zhou, G.; Liu, G.; Logsdon, C.; Jin, J.; Abbruzzese, J.L.; Tan, T.H.; et al. The CUL7/F-box and WD repeat domain containing 8 (CUL7/Fbxw8) ubiquitin ligase promotes degradation of hematopoietic progenitor kinase
42. Kokkotou, E.; Moss, A.C.; Torres, D.; Karagiannides, I.; Cheifetz, A.; Liu, S.; O'Brien, M.; Maratos-Flier, E.; Pothoulakis, C. Melanin-concentrating hormone as a mediator of intestinal inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008, 105, 10613–10618.
43. Yuan, X.; Hua, X.; Wilhelmus, K.R. Expression of small leucine-rich proteoglycans during experimental fungal keratitis. *Cornea* 2010, 29, 674–679.
44. Sun, H.; Yao, W.; Wang, K.; Qian, Y.; Chen, H.; Jung, Y.S. Inhibition of neddylation pathway represses influenza virus replication and pro-inflammatory responses. *Virology* 2018, 514, 230–239.
45. Zhou, W.; Xu, J.; Tan, M.; Li, H.; Li, H.; Wei, W.; Sun, Y. UBE2M Is a Stress-Inducible Dual E2 for Neddylation and Ubiquitylation that Promotes Targeted Degradation of UBE2F. *Mol. Cell* 2018, 70, 1008–1024.e100.
46. Kong, D.H.; Kim, Y.K.; Kim, M.R.; Jang, J.H.; Lee, S. Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 1057.
47. Rouillard, A.D.; Gundersen, G.W.; Fernandez, N.F.; Wang, Z.; Monteiro, C.D.; McDermott, M.G.; Ma'ayan, A. The harmonizome: A collection of processed datasets

- gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. Database 2016, 2016, baw100.
48. Choudhury, N.R.; Heikel, G.; Michlewski, G. TRIM25 and its emerging RNA-binding roles in antiviral defense. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 2020, 11, e1588.
 49. Wu, Y.F.; Zhang, Y.M.; Ge, H.H.; Ren, C.Y.; Zhang, Z.Z.; Cao, L.; Wang, F.; Chen, G.H. Effects of Embryonic Inflammation and Adolescent Psychosocial Environment on Cognition and Hippocampal Stauferin in Middle-Aged Mice. *Front. Aging Neurosci.* 2020, 12, 578719.
 50. Ku, Y.; Park, J.H.; Cho, R.; Lee, Y.; Park, H.M.; Kim, M.; Hur, K.; Byun, S.Y.; Liu, J.; Lee, Y.S.; et al. Noncanonical immune response to the inhibition of DNA methylation by Stauf1 via stabilization of endogenous retrovirus RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2021, 118, e2016289118.
 51. Lazzaretti, D.; Bandholz-Cajamarca, L.; Emmerich, C.; Schaaf, K.; Basquin, C.; Irion, U.; Bono, F. The crystal structure of Stauf1 in complex with a physiological RNA sheds light on substrate selectivity. *Life Sci. Alliance* 2018, 1, e201800187.
 52. Zheng, D.; Cho, H.; Wang, W.; Rambout, X.; Tian, B.; Maquat, L.E. 30READS + RIP defines differential Stauf1 binding to alternative 30UTR isoforms and reveals structures and sequence motifs influencing binding and polysome association. *RNA* 2020, 26, 1621–1636.
 53. Liu, X.Y.; Chen, W.; Wei, B.; Shan, Y.F.; Wang, C. IFN-induced TPR protein IFIT3 potentiates antiviral signaling by bridging MAVS and TBK1. *J. Immunol.* 2011, 187, 2559–2568.
 54. Ramos, H.; Monette, A.; Niu, M.; Barrera, A.; Lopez-Ulloa, B.; Fuentes, Y.; Guizar, P.; Pino, K.; DesGroseillers, L.; Moulard, A.J.; et al. The double-stranded RNA-binding protein, Stauf1, is an IRES-transacting factor regulating HIV-1 cap-independent translation initiation. *Nucleic Acids Res.* 2021, 50, 411–429.
 55. Blackham, S.L.; McGarvey, M.J. A host cell RNA-binding protein, Stauf1, has a role in hepatitis C virus replication before virus assembly. *J. Gen. Virol.* 2013, 94, 2429–2436.
 56. Chatel-Chaix, L.; Clement, J.F.; Martel, C.; Beriault, V.; Gatignol, A.; DesGroseillers, L.; Moulard, A.J. Identification of Stauf1 in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Mol. Cell. Biol.* 2004, 24, 2637–2648.
 57. de Lucas, S.; Peredo, J.; Marion, R.M.; Sanchez, C.; Ortin, J. Human Stauf1 protein interacts with influenza virus ribonucleoproteins and is required for efficient virus multiplication. *J. Virol.* 2010, 84, 7603–7612.
 58. Fang, J.; Pietzsch, C.; Ramanathan, P.; Santos, R.I.; Ilinykh, P.A.; Garcia-Blanco, M.A.; Bukreyev, A.; Bradrick, S.S. Stauf1 Interacts with Multiple Components of the Ebola Virus Ribonucleoprotein and Enhances Viral RNA Synthesis. *mBio* 2018, 9, e01771-18.
 59. Dixit, U.; Pandey, A.K.; Mishra, P.; Sengupta, A.; Pandey, V.N. Stauf1 promotes HCV replication by inhibiting protein kinase R and transporting viral RNA to the site of translation and replication in the cells. *Nucleic Acids Res.* 2016, 44, 5271–5287.
 60. He, T.S.; Huang, J.; Chen, T.; Zhang, Z.; Cai, K.; Yu, J.; Xu, L.G. The Kinase MAP4K1 Inhibits Cytosolic RNA-Induced Antiviral Signaling by Promoting Proteasomal Degradation of TBK1/IKKepsilon. *Microbiol. pectr.* 2021, 9, e0145821.

61. Oh, H.; Grinberg-Bleyer, Y.; Liao, W.; Maloney, D.; Wang, P.; Wu, Z.; Wang, J.; Bhatt, D.M.; Heise, N.; Schmid, R.M.; et al. An NF-kappaB Transcription-Factor-Dependent Lineage-Specific Transcriptional Program Promotes Regulatory T Cell Identity and Function. *Immunity* 2017, 47, 450–465.e45.
62. Jiang, Y.; Li, L.; Li, Y.; Liu, G.; Hoffman, R.M.; Jia, L. Neddylation Regulates Macrophages and Implications for Cancer Therapy. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021, 9, 681186.
63. Stanley, D.J.; Bartholomeeusen, K.; Crosby, D.C.; Kim, D.Y.; Kwon, E.; Yen, L.; Cartozo, N.C.; Li, M.; Jager, S.; Mason-Herr, J.; et al. Inhibition of a NEDD8 Cascade Restores Restriction of HIV by APOBEC3G. *PLoS Pathog.* 2012, 8, e1003085.
64. Heikel, G.; Choudhury, N.R.; Michlewski, G. The role of Trim25 in development, disease and RNA metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* 2016, 44, 1045–1050.
65. Lee, J.M.; Choi, S.S.; Lee, Y.H.; Khim, K.W.; Yoon, S.; Kim, B.G.; Nam, D.; Suh, P.G.; Myung, K.; Choi, J.H. The E3 ubiquitin ligase TRIM25 regulates adipocyte differentiation via proteasome-mediated degradation of PPARgamma. *Exp. Mol. Med.* 2018, 50, 1–11.
66. Lee, S.H.; Mayr, C. Gain of Additional BIRC3 Protein Functions through 30-UTR-Mediated Protein Complex Formation. *Mol. Cell* 2019, 74, 701–712.e70.
67. Gack, M.U.; Shin, Y.C.; Joo, C.H.; Urano, T.; Liang, C.; Sun, L.; Takeuchi, O.; Akira, S.; Chen, Z.; Inoue, S.; et al. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 2007, 446, 916–920
68. Rehwinkel, J.; Gack, M.U. RIG-I-like receptors: Their regulation and roles in RNA sensing. *Nat. Rev. Immunol.* 2020, 20, 537–551.
69. Lee, N.R.; Kim, H.I.; Choi, M.S.; Yi, C.M.; Inn, K.S. Regulation of MDA5-MAVS Antiviral Signaling Axis by TRIM25 through TRAF6-Mediated NF-kappaB Activation. *Mol. Cells* 2015, 38, 759–764.
70. Xiao, H.; Li, J.; Yang, X.; Li, Z.; Wang, Y.; Rui, Y.; Liu, B.; Zhang, W. Ectopic Expression of TRIM25 Restores RIG-I Expression and IFN Production Reduced by Multiple Enteroviruses 3C(pro). *Viol. Sin.* 2021, 36, 1363–1374.
71. Yang, Z.; Wang, J.; He, B.; Zhang, X.; Li, X.; Kuang, E. RTN3 inhibits RIG-I-mediated antiviral responses by impairing TRIM25-mediated K63-linked polyubiquitination. *eLife* 2021, 10, e68958.
72. Chiang, C.; Dvorkin, S.; Chiang, J.J.; Potter, R.B.; Gack, M.U. The Small t Antigen of JC Virus Antagonizes RIG-I-Mediated Innate Immunity by Inhibiting TRIM25's RNA Binding Ability. *mBio* 2021, 12, e00620-21.
73. Li, J.; Xie, Y.; Li, L.; Li, X.; Shen, L.; Gong, J.; Zhang, R. MicroRNA-30a Modulates Type I Interferon Responses to Facilitate Coxsackievirus B3 Replication Via Targeting Tripartite Motif Protein 25. *Front. Immunol.* 2020, 11, 603437.
74. Gori Savellini, G.; Anichini, G.; Gandolfo, C.; Cusi, M.G. SARS-CoV-2 N Protein Targets TRIM25-Mediated RIG-I Activation to Suppress Innate Immunity. *Viruses* 2021, 13, 1439.
75. Gack, M.U.; Albrecht, R.A.; Urano, T.; Inn, K.S.; Huang, I.C.; Carnero, E.; Farzan, M.; Inoue, S.; Jung, J.U.; Garcia-Sastre, A. Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. *Cell Host Microbe* 2009, 5, 439–449.

76. Bashir, T.; Dorrello, N.V.; Amador, V.; Guardavaccaro, D.; Pagano, M. Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(CDH1) ubiquitin ligase. *Nature* 2004, 428, 190–193.
77. Perroy, J.; Pontier, S.; Charest, P.G.; Aubry, M.; Bouvier, M. Real-time monitoring of ubiquitination in living cells by BRET. *Nat. Methods* 2004, 1, 203–208.
78. Chatel-Chaix, L.; Boulay, K.; Mouland, A.J.; Desgroseillers, L. The host protein Staufen1 interacts with the Pr55Gag zinc fingers and regulates HIV-1 assembly via its N-terminus. *Retrovirology* 2008, 5, 41.
79. Luo, M.; Duchaine, T.F.; DesGroseillers, L. Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association. *Biochem. J.* 2002, 365, 817–824.
80. Martel, C.; Dugre-Brisson, S.; Boulay, K.; Breton, B.; Lapointe, G.; Armando, S.; Trepanier, V.; Duchaine, T.; Bouvier, M.; Desgroseillers, L. Multimerization of Staufen1 in live cells. *RNA* 2010, 16, 585–597.
81. Johannessen, C.M.; Boehm, J.S.; Kim, S.Y.; Thomas, S.R.; Wardwell, L.; Johnson, L.A.; Emery, C.M.; Stransky, N.; Cogdill, A.P.; Barretina, J.; et al. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* 2010, 468, 968–972.
82. Kim, D.I.; Jensen, S.C.; Noble, K.A.; Kc, B.; Roux, K.H.; Motamedchaboki, K.; Roux, K.J. An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. *Mol. Biol. Cell* 2016, 27, 1188–1196.
83. Branon, T.C.; Bosch, J.A.; Sanchez, A.D.; Udeshi, N.D.; Svinkina, T.; Carr, S.A.; Feldman, J.L.; Perrimon, N.; Ting, A.Y. Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nat. Biotechnol.* 2018, 36, 880–887.
84. Rao, S.; Hassine, S.; Monette, A.; Amorim, R.; DesGroseillers, L.; Mouland, A.J. HIV-1 requires Staufen1 to dissociate stress granules and to produce infectious viral particles. *RNA* 2019, 25, 727–736.
85. Perez-Riverol, Y.; Bai, J.; Bandla, C.; Garcia-Seisdedos, D.; Hewapathirana, S.; Kamatchinathan, S.; Kundu, D.J.; Prakash, A.; Frericks-Zipper, A.; Eisenacher, M.; et al. The PRIDE database resources in 2022: A hub for mass spectrometry-based proteomics evidences. *Nucleic Acids Res.* 2022, 50, D543–D552.

- 3. Le phosphomimétisme sur la sérine 20 de STAU1 altère les fonctions posttranscriptionnelles de STAU1 et induit l'apoptose dans les cellules transformées humaines**

3.1 Mise en contexte de l'article 2

Depuis quelques années, notre laboratoire cible plus spécifiquement les possibles rôles de STAU1 dans le cycle et la prolifération cellulaires. Les recherches à ce sujet sont le prélude de cette publication.

Les publications découlant des recherches du Dr. Mehdi Ghram en 2020 [91], de la Dre. Karine Boulay en 2014 [90] et du Dr. Sami Hassine en 2020 [125], ont permis d'observer les différentes conséquences de la dérégulation du niveau protéique de STAU1 dans le cycle et la prolifération cellulaires. De plus, les phénotypes obtenus sont différents selon que les cellules sont normales et cancéreuses [90, 91]]. La manipulation génétique qui cause une diminution du niveau protéique de STAU1 engendre un ralentissement de la prolifération des cellules non-transformées comme conséquence du ralentissement des transitions G1/S et G2/M du cycle cellulaire [90]; pourtant cette diminution n'a aucun effet sur les cellules transformées. De plus, dans des cellules transformées, telles que HCT116 et HEK293, il a été possible de générer des lignées stables avec déplétion totale de STAU1 par le système CRISPR-Cas9 [125, 126], alors que ce fut un échec dans les cellules non-transformées (hTERT-RPE1). Ces résultats nous ont permis de conclure que dans les cellules non-transformées, la protéine STAU1 est essentielle [91].

D'un autre côté, une augmentation du niveau protéique de STAU1 n'affecte pas la progression cellulaire des cellules non-transformées, alors qu'elle induit un ralentissement de la prolifération cellulaire dans les lignées transformées [90]. La cartographie du motif fonctionnel montre que la présence du dsRBD2 de STAU1 est essentielle pour reproduire ce phénotype, ce qui nous a amené à étudier plus en détails

ce domaine pour déterminer le mécanisme par lequel l'augmentation du niveau protéique de STAU1 ralentit la prolifération des cellules transformées [90].

Dans ce papier nous montrons qu'une faible augmentation du niveau protéique de STAU1 déclenche l'apoptose rapidement et que la prolifération des cellules survivantes est altérée à long terme. De façon intéressante, une mutation phosphomimétique de la sérine 20 dans le dsRBD2 de STAU1 est suffisante pour reproduire les phénotypes associés à l'augmentation de la protéine dans des cellules transformées. Du côté mécanistique, nous avons montré que ce mutant augmente la traduction des ARNm cibles de STAU1 et diminue le SMD, ce qui suggère que le dsRBD2 contient des éléments régulateurs de l'activité post-transcriptionnelle pour le contrôle de l'apoptose et la prolifération cellulaire des cellules transformées. À la lumière de ces résultats, STAU1 pourrait être donc considérée comme une nouvelle cible thérapeutique contre le cancer.

3.2 Contribution à l'article 2

J'ai utilisé le plasmide STAU1⁵⁵-HA₃ en pCDNA3-RSV et les mutants progressifs de l'extrémité N-terminal de la protéine ($\Delta 88$, $\Delta 60$, $\Delta 46$, $\Delta 37$, $\Delta 25$, $\Delta 17$, and $\Delta 7$) en pcDNA3-RSV ainsi que le vecteur STAU1⁵⁵-YFP et le vecteur YFP-Topaz du laboratoire du Dr Luc DesGroseillers pour faire les expériences pertinentes et à partir de ces plasmides j'ai créé les subséquents clones pour le reste des expériences. J'ai fait les expériences de culture cellulaire, de transfection ou co-transfections, les courbes de croissance, les traitements avec des drogues, les essais d'expression génique, les buvardages de type western et l'analyse de données ainsi que l'extraction d'ARN total et les RT-qPCR. Florence Bonnet-Magnaval a réalisé la culture cellulaire, les transfections pour la microscopie de STAU1, $\Delta 88$ et RBD2 avec le kit caspases, les buvardages de type Western contrôles d'expression et l'analyse des images de microscopie. Florence Bonnet-Magnaval, Luc DesGroseillers et moi avons participé dans la conception expérimentale, la rédaction et correction du manuscrit et la création et correction des figures.

3.3 Article 2

Phosphomimicry on STAU1 Serine 20 Impairs STAU1 Posttranscriptional Functions and Induces Apoptosis in Human Transformed Cells

Yulemi Gonzalez Quesada, Florence Bonnet-MagnaVal and Luc DesGroseillers*

Affiliations :

Département de Biochimie et Médecine Moléculaire, Faculté de Médecine, Université de Montréal, 2900 Édouard Montpetit, Montreal, QC H3T 1J4, Canada

*** To whom correspondence should be addressed:**

Dr Luc DesGroseillers, Département de biochimie et médecine moléculaire, Faculté de médecine, Université de Montréal, 2900 Édouard Montpetit Montréal, QC, Canada. H3T 1J4. Phone : 514-343-5802. Fax: 514-343-2210. Email: luc.desgroseillers@umontreal.ca

Keywords: Staufen 1; apoptosis; cell proliferation; posttranscriptional regulation

Academic Editors: John Murphy, Kalpana Surendranath and Radhakrishnan Kanagaraj
Int. J. Mol. Sci. 2022, 23(13), 7344; <https://doi.org/10.3390/ijms23137344>

Received: 1 June 2022 / Revised: 28 June 2022 / Accepted: 29 June 2022 / Published: 1 July 2022

3.3.1 Abstract

Staufen 1 (STAU1) is an RNA-binding protein that is essential in untransformed cells. In cancer cells, it is rather STAU1 overexpression that impairs cell proliferation. In this paper, we show that a modest increase in STAU1 expression in cancer cells triggers apoptosis as early as 12 h post-transfection and impairs proliferation in non-apoptotic cells for several days. Interestingly, a mutation that mimics the phosphorylation of STAU1 serine 20 is sufficient to cause these phenotypes, indicating that serine 20 is at the heart of the molecular mechanism leading to apoptosis. Mechanistically, phosphomimicry on serine 20 alters the ability of STAU1 to regulate translation and the decay of STAU1-bound mRNAs, indicating that the posttranscriptional regulation of mRNAs by STAU1 controls the balance between proliferation and apoptosis. Unexpectedly, the expression of RBD2^{S20D}, the N-terminal 88 amino acids with no RNA-binding activity, is sufficient to induce apoptosis via alteration, in trans, of the posttranscriptional functions of endogenous STAU1. These results suggest that STAU1 is a sensor that controls the balance between cell proliferation and apoptosis, and, therefore, may be considered as a novel therapeutic target against cancer.

3.3.2 Introduction

Cell proliferation is a complex phenomenon that relies on the tight regulation of gene expression, signaling pathways, and proteome balance [1,2,3,4]. Cell survival and adaptation depend on the capacity of the cells to rapidly respond to several internal and external stresses that are continuously challenging their homeostasis. The dysregulation of any of these pathways may trigger severe abnormalities that cause diseases or induce cell death [4,5]. For example, the activation of oncogenes is well known to stimulate cell proliferation and thus induce tumorigenesis in many cancer types [6]. However, oncogenic mutations or the overexpression of oncogenes can rather induce cellular senescence [7]. Similarly, cancer cells use a variety of molecular mechanisms to suppress apoptosis and facilitate cell proliferation [8,9]. Thus, cell proliferation, senescence, and apoptosis form intricate pathways, in which even the subtle dysregulation of a gene or protein expression can tip the balance toward one or the other cell decision. Understanding the molecular mechanisms beyond the cell decision may provide deeper insights into cancer and influence therapeutic strategy.

STAU1 is expressed as two different isoforms of ⁵⁵ and 63 kDa [10]. STAU1⁶³ is identical to STAU1⁵⁵ but carries an 81-amino acid extension at its N-terminal extremity. STAU1⁵⁵ is a double-stranded RNA-binding protein that plays critical roles in cell decisions via the posttranscriptional regulation of RNA regulons [10,11,12,13]. STAU1⁵⁵ binds to and controls the expression of different populations of specific mRNAs [14,15,16,17,18] through the induction or inhibition of their transport and localization [19,20], alternative splicing [21], translation [15,17,18,22], or decay [23]. STAU1⁵⁵ is associated with ribosomes and regulates cap-dependent translation [10,11,24]. It also acts as an IRES-

transacting factor in cap-independent translation [25]. Through these molecular mechanisms, STAU1⁵⁵ regulates several physiological pathways linked to cell decision such as differentiation, proliferation, migration, apoptosis, autophagy, and stress response autophagy (reviewed in [13,19,26,27,28,29]). In cancer cells, the proto-oncogene non-receptor tyrosine kinase SRC phosphorylates STAU1⁵⁵ on tyrosines 380 and 493 [30]. Although the meaning of these modifications is not known, it suggests that posttranslational modifications could modify the molecular functions of STAU1⁵⁵ in cancer cells compared to those in untransformed cells.

STAU1⁵⁵ expression is essential for the proliferation of non-transformed cells, as it facilitates the cell cycle checkpoint transition via a coordinated control of pro/anti-proliferative and pro/anti-apoptotic regulons [31]. Not surprisingly then, large scale comparative studies of tumor and normal tissues indicate that the STAU1⁵⁵ expression level is upregulated in most cancers, favoring the pro-proliferative (reviewed in [13,29]) and malignant [32,33] phenotypes. It was suggested that STAU1⁵⁵ could be considered as an oncogene and that the high level of STAU1⁵⁵ could indeed be a potential biomarker for prostate cancer [34], high grade gliomas [35,36], and stage IA and IB lung squamous cell carcinoma [37]. Thus, by adjusting the expression of STAU1⁵⁵, the cancer cell establishes a new balance of gene expression via the STAU1⁵⁵-mediated posttranscriptional regulation that favors both cell proliferation and survival. However, genome-wide studies of large cohorts of tumors also show a correlation between high STAU1⁵⁵ level and long-term survival rates following treatments [38,39,40]. These opposite results suggest that STAU1⁵⁵ expression marks the boundary between proliferation and cell death and that a small modulation of its expression could tip the

balance towards one of the two pathways. Indeed, ectopic expression of STAU1⁵⁵ in cancer cells triggers signaling pathways that lead to mitotic defects [41] and increases sensitivity to apoptosis induction [42,43,44]. Similarly, proliferation is facilitated and apoptosis is reduced when STAU1⁵⁵-mediated RNA decay (SMD) is inhibited by the upregulation of long non-coding RNAs in several tumors [33,42,43,45], indicating that SMD controls cell decision.

STAU1⁵⁵ expression is transcriptionally upregulated by the transcription factor E2F1 [31] and proteolytically downregulated by the E3-ubiquitin ligase anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) during mitosis [41]. However, the mechanisms that control its functions in proliferation versus apoptosis are not clear. We previously showed that a modest increase in STAU1⁵⁵ levels impairs cancer cell proliferation and that the molecular determinant involved in this antiproliferative effect is located in the first N-terminal 88 amino acids of STAU1⁵⁵ [41]. This sequence corresponds to STAU1⁵⁵ RBD2, a domain that does not bind RNAs in vitro but establishes protein–protein interaction with CDH1 and CDC20 for its degradation in mitosis by APC/C [41] and with the mitotic spindle [46]. In this paper, we show that STAU1⁵⁵ overexpression in transformed cells induces apoptosis and proliferation impairment dependent on a molecular determinant located within amino acid 17 and 25 at the N-terminal end of STAU1⁵⁵. More specifically, the presence of a negative charge on S20 is at the heart of the mechanism that induces apoptosis and proliferation impairment in cancer upon STAU1⁵⁵ overexpression via altered STAU1⁵⁵ posttranscriptional functions.

3.3.3 Results

STAU1⁵⁵ Overexpression Causes a Fast-Acting Apoptosis Response in Transformed Cells

Our previous results demonstrated that an increase in the level of STAU1⁵⁵ expression is deleterious to cancer cells [41]. To determine if this phenotype is due to apoptosis, we performed time-lapse experiments using a coupled-GFP dye that specifically stains activated caspases 3/7 in cellulo, thus allowing a real-time detection of apoptosis induction. First, HEK293T cells were transfected with plasmids coding for STAU1⁵⁵-mCherry or mCherry as the control. The GFP-dye was directly added after transfection, and the time-lapse microscopy acquisition was performed for 36 h (Figure 3-1A). A significant increment of GFP staining (apoptosis) was observed 12 h after the transfection in STAU1⁵⁵-mCherry transfected cells but not in control cells (Figure 3-1B,C). At this time point, mCherry staining (STAU1⁵⁵ and control expression) was barely detectable in both cell lines (Figure 3-1B,D). Nevertheless, the western blotting analysis showed that STAU1⁵⁵-mCherry and the control mCherry were expressed at this time point (Figure 3-1D). The GFP signal intensity then reached a maximum value at around 18–24 h, and then stabilized until 36 h (Figure 3-1B,C). Simultaneously, the mCherry signal slowly increased until the end of the experiment (Figure 3-1B,D). This result revealed that STAU1⁵⁵ overexpression triggers cell apoptosis during the first hours following transfection. Interestingly, although the induction of apoptosis correlates with STAU1⁵⁵ expression, STAU1⁵⁵ overexpression (red signal) was not detected at this time point, suggesting that the cell decision to activate the apoptotic cascade occurs in the early

steps following STAU1⁵⁵ expression and is not due to the excessive or artificial overexpression of STAU1⁵⁵.

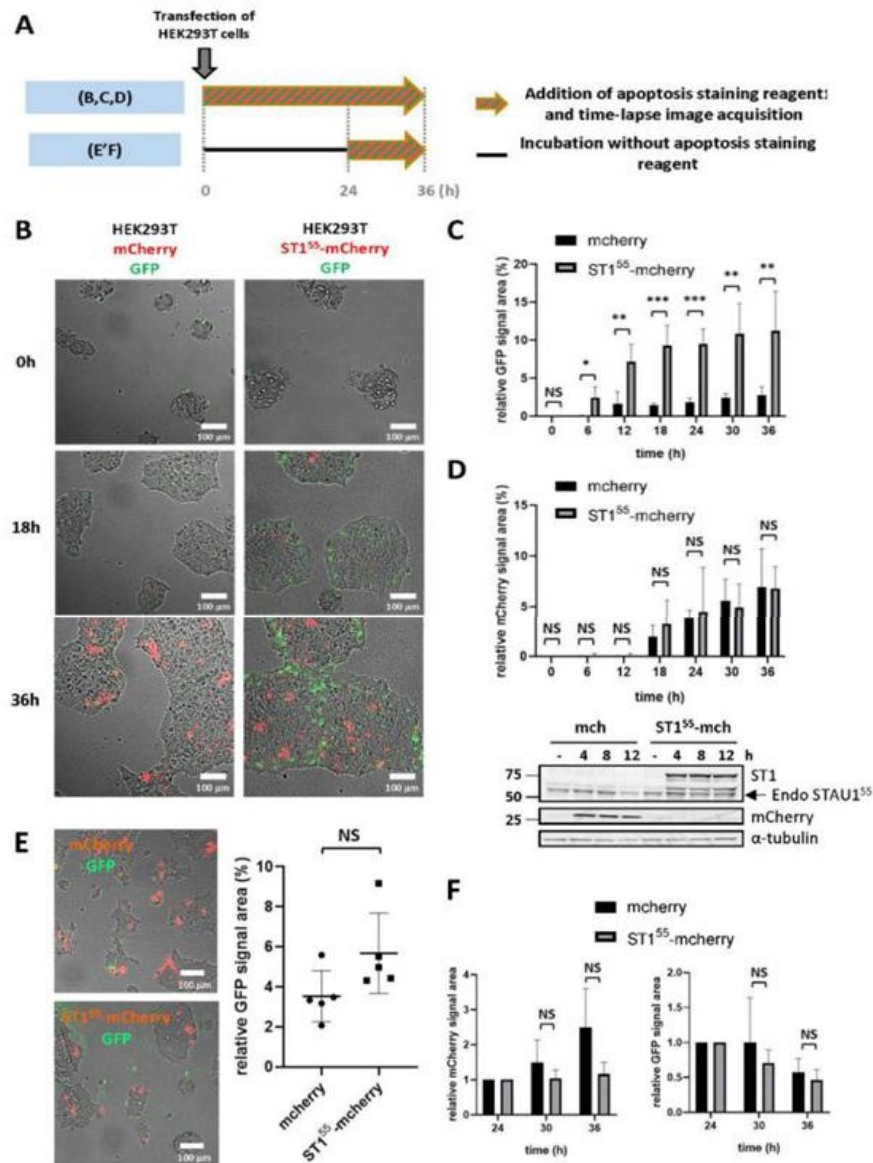


Figure 3-1. STAU1 expression induces apoptosis in transformed cells. (A) Schematic representation of the protocols used in the experiments shown in (B–F). (B–D) HEK293T

cells were transfected with plasmids coding for mCherry or STAU1⁵⁵-mCherry. Caspase activation (apoptosis) was quantified using the CellEvent-caspase3/7-green kit. Following transfection, time lapse video microscopy (B) was used to quantify apoptosis (C) and mCherry expression (D) over 36 h. *, p-value \leq 0.05; **, p-value \leq 0.01; ***, p-value \leq 0.001. NS, not significant. A western blot showed that STAU1⁵⁵-mCherry and mCherry were expressed soon after transfection (D). Endo STAU1⁵⁵, endogenous STAU1⁵⁵. (E,F) At 24 h post-transfection, cells were washed to remove dead cells and incubated in the presence of the CellEvent-caspase 3/7-green kit for an additional 12 h. (E) Pictures taken 24 h post-transfection showing mCherry-expressing and apoptotic cells (left) and the quantification of apoptotic cells (right). (F) The quantification of apoptosis and mCherry expression at 36 h.

The stabilization of the apoptotic GFP signal suggests that once the cell fate is decided, STAU1⁵⁵-mCherry-expressing cells no longer enter apoptosis. To test this hypothesis, the addition of the GFP-dye and time-lapse microscopy was initiated 24 h post-transfection (Figure 3-1A), during the apoptotic plateau (Figure 3-1C). Prior to adding the GFP-dye, cells were washed to remove dead cells. After washing, the amount of apoptotic green signal was similar in the control and STAU1⁵⁵-mCherry-expressing cells (Figure 3-1E). Images were then acquired for 12 h. Interestingly, in contrast to what was observed in the first 24 h, there was no significant difference between the two cell lines in the apoptotic GFP signal (Figure 3-1F), indicating that apoptosis is an early response to STAU1⁵⁵ expression.

Amino Acids 18–25 Carry the Molecular Determinant That Impairs Cell Proliferation

To determine the fate of non-apoptotic cells, growth curves were generated. Controls (empty vector and STAU1^{Δ88}-HA₃) and STAU1⁵⁵-HA₃-transfected cells were trypsinized 24 h post-transfection to remove apoptotic cells, then plated at the same density, and allowed to grow for three days (Figure 3-2). As previously observed [41], STAU1⁵⁵-expressing cells had impaired cell proliferation profiles compared to control cells, indicating that cells that did not enter the apoptotic pathway nevertheless have proliferation defects.

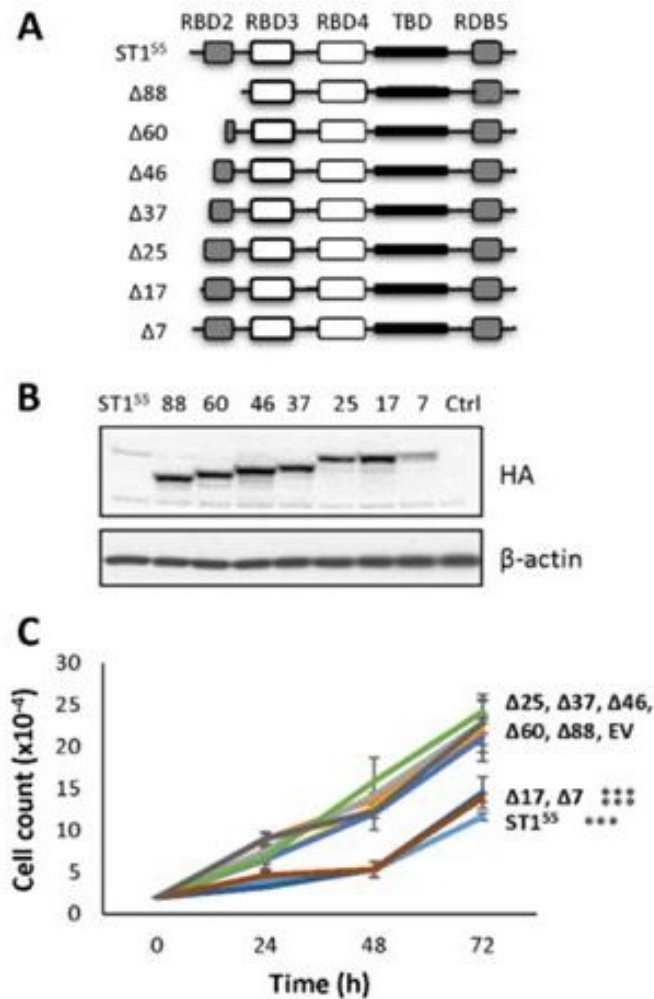


Figure 3-2. A molecular determinant that controls cell proliferation is present within amino acids 18 and 25. (A) Schematic representation of STAU1⁵⁵ and STAU1⁵⁵ mutants with progressive deletion in the first 88 amino acids at the N-terminal end of STAU1⁵⁵. RBD, RNA-binding domain; TBD, tubulin-binding domain. White boxes, domain with RNA-binding activity; grey boxes, RNA-binding consensus sequence lacking RNA-binding activity; black boxes, tubulin-binding domain. Δx , deletion of x amino acids at the N-terminal end of STAU1⁵⁵. (B) Plasmids coding for STAU1⁵⁵ and STAU1⁵⁵ mutants were transfected in HEK293T cells. At 24 h post-transfection, cells were trypsinized, plated at the same density, and allowed to grow for three days. Expression of the proteins was visualized by western blotting. The blots are representative of three independent experiments that gave similar results. (C) Cell proliferation using growth curve assays was quantified over three days. The graph represents the means and standard deviations of three independently performed experiments. ***, p-value \leq 0.001 (Tukey's multiple comparisons ANOVA test).

To identify the molecular determinant within the first 88 amino acids at the N-terminal of STAU1⁵⁵ that impairs cell proliferation, we generated progressive deletions in this region (Figure 3-2A). The wild type and mutant proteins were expressed in HEK293T cells (Figure 3-2B), and growth curve assays were initiated 24 h post-transfection (Figure 3-2C) to determine the capacity of each mutant to impair cell proliferation. As controls, the expression of STAU1⁵⁵-HA₃ impaired cell proliferation, whereas the mutant protein with deletion of the first 88 N-terminal amino acids (STAU1 ^{Δ 88}-HA₃) grew as efficiently as untransfected or empty vector-transfected cells. The expression of mutants that lacked

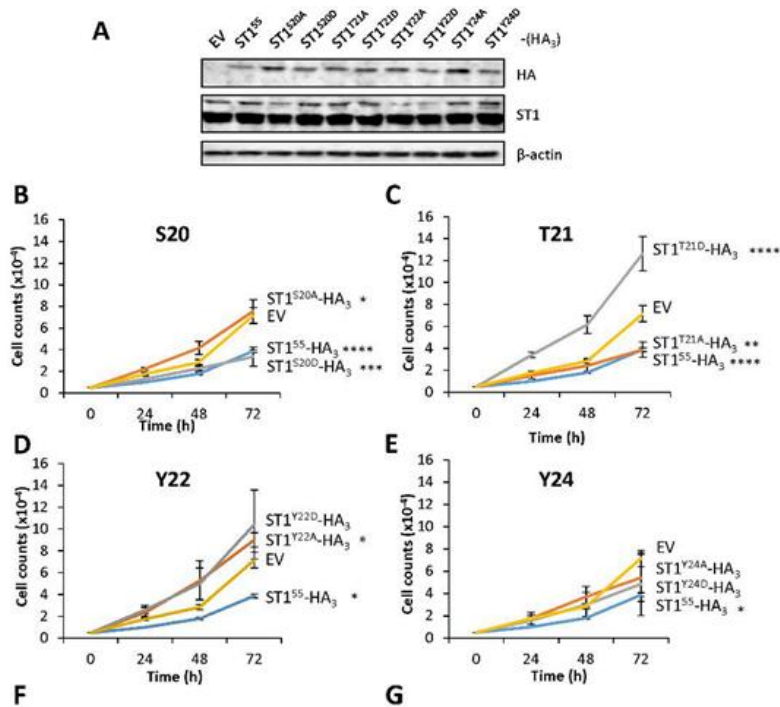
the first 17 N-terminal amino acids (or less) still impaired cell proliferation, as did the wild-type protein. In contrast, the expression of proteins with the deletion of 25 (or more) amino acids did not impair cell proliferation. These results indicate that the molecular determinant responsible for the antiproliferative effect of STAU1⁵⁵ is comprised between amino acid 18 and 25 at the N-terminal extremity of STAU1⁵⁵.

Phosphomimicry on S20 and T21 Controls Cell Proliferation

Remarkably, four of the eight amino acids in the 18–25 amino acid sequence were putative targets for phosphorylation, MQS²⁰T²¹Y²²NY²⁴N. To determine if phosphorylation events could be involved in the STAU1⁵⁵-dependent impairment of cell proliferation, we generated phosphomimetic and non-phosphorylatable mutants for each of these residues and determined the impact of these modifications on cell proliferation using the growth curve assay (Figure 3-3). Each mutant was transfected in HEK293T cells, and western blotting was performed to confirm their expression (Figure 3-3A). The expression of the phosphomimetic S20D mutant impaired cell proliferation (Figure 3-3B). In contrast, cells transfected with the non-phosphorylatable S20A mutant grew normally. The opposite effect was observed following the expression of the T21 mutants (Figure 3-3C). The non-phosphorylatable T21A mutant impaired cell proliferation, as did the wild-type protein. Cells expressing the phosphomimetic T21D mutant grew even faster than the control cells. These results indicate that the presence of a permanent negative charge on S20 affects cell proliferation and suggest that phosphorylation may account for the antiproliferative effect. In contrast, no differences in cell growth were observed when the

phosphomimetic and non-phosphorylatable mutants of Y22 and Y24 were expressed (Figure 3-3D,E).

To determine if STAU1^{S20D} also recapitulates the apoptotic program induced by STAU1⁵⁵ when expressed in transformed cells, we transfected plasmids coding for STAU1⁵⁵-HA₃, STAU1^{S20A}-HA₃, and STAU1^{S20D}-HA₃ in HEK293T cells and measured the fluorescence generated by the caspase activation. STAU1^{S20D}-HA₃ induced apoptosis, as did STAU1⁵⁵-HA₃ (Figure 3-3F). In contrast, STAU1^{S20A}-HA₃ had a limited capacity to induce apoptosis. A western blot experiment indicated that the proteins were expressed at the same levels (Figure 3-3G). These results indicate that the presence of a negative charge on S20 induces apoptosis and impairs the cell proliferation of non-apoptotic cells.



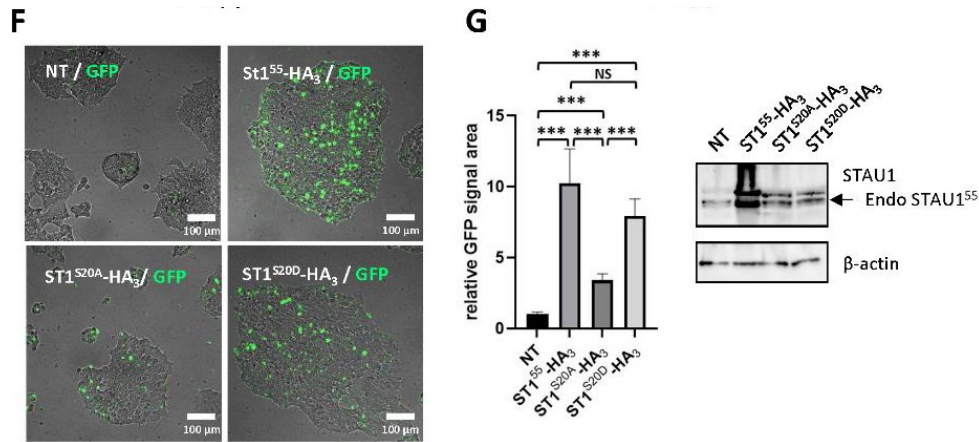


Figure 3-3. Serine 20 and threonine 21 controls cell proliferation and apoptosis. (A) HEK293T cells were transfected with plasmids coding for STAU1⁵⁵-HA₃ or phosphomimetic (S/T/Y to D) and non-phosphorylatable (S/T/Y to A) mutants. The expression of the proteins was visualized by western blotting. The blot is representative of three independently performed experiments that gave similar results. (B–D) Cell proliferation using growth curve assays to monitor the effect of phosphomimetic and non-phosphorylatable mutations on serine 20 (S20) (B), threonine 21 (T21) (C), tyrosine 22 (Y22) (D), and tyrosine 24 (Y24) (E). Transfected cells were trypsinized 24 h post-transfection, plated, and allowed to grow for three days. Each graph represents the means and standard deviations of three independently performed experiments. *, p-value ≤ 0.05; **, p-value ≤ 0.01; ***, p-value ≤ 0.001; ****, p-value ≤ 0.0001 (Tukey's multiple comparisons ANOVA test). (F) HEK293T cells were transfected with plasmids coding for STAU1⁵⁵-HA₃, STAU1^{S20A}-HA₃, and STAU1^{S20D}-HA₃ and immediately incubated in the presence of the GFP-coupled apoptosis stain. (G) (Left) Quantification of the GFP signal observed in (F). The graph represents the means and standard deviations of three independently performed experiments. ***, p-value ≤ 0.001 (Student t-test). NT, not transfected. (Right) Western blots showing the expression of the proteins used in (F). The

blots are representative of three independent experiments that gave similar results. Endo STAU1⁵⁵, endogenous STAU1⁵⁵.

S20 Phosphomimicry Controls STAU1⁵⁵-Mediated Post-Transcriptional Regulation

To identify the mechanism that impairs cell proliferation when STAU1⁵⁵ is expressed in transformed cells, we determined whether the presence or absence of a negative charge on S20 altered STAU1⁵⁵ posttranscriptional functions. Therefore, STAU1⁵⁵, STAU1^{S20A}, STAU1^{S20D}, and the controls were expressed in HEK293T cells, and their molecular functions were compared. Our results indicate that the sub-cellular localization of the proteins in the cytoplasm or on the mitotic spindle and their stability/degradation were not affected by the mutations (data not shown).

In contrast, the capacity of STAU1⁵⁵ to enhance translation when bound to the 5'UTR of mRNAs [22] was affected by the mutation on S20. We used the reporters Rluc fused (SBS-Rluc) or not (Rluc) to the ARF1 STAU1⁵⁵-binding site (SBS) in the 5'UTR [22] to measure the impact of S20 mutations on translation. Plasmids coding for Rluc and SBS-Rluc were co-transfected with plasmids coding for STAU1⁵⁵-YFP, STAU1^{S20A}-YFP, STAU1^{S20D}-YFP, or the empty vector. Luciferase assays were performed as a measure of translation. Western blotting experiments indicated that the levels of expression of STAU1⁵⁵ mutants were similar and that their expression was equivalent to that of endogenous STAU1⁵⁵ (Figure 3-4A). Luciferase assays first indicated, as expected [22], that the expression of STAU1⁵⁵ enhanced the translation of SBS-Rluc compared to Rluc (Figure 3-4A). Then, they showed that STAU1^{S20D} was not able to enhance the translation

of SBS-Rluc, whereas STAU1^{S20A} was still able. None of these proteins had a significant effect on the translation of Rluc.

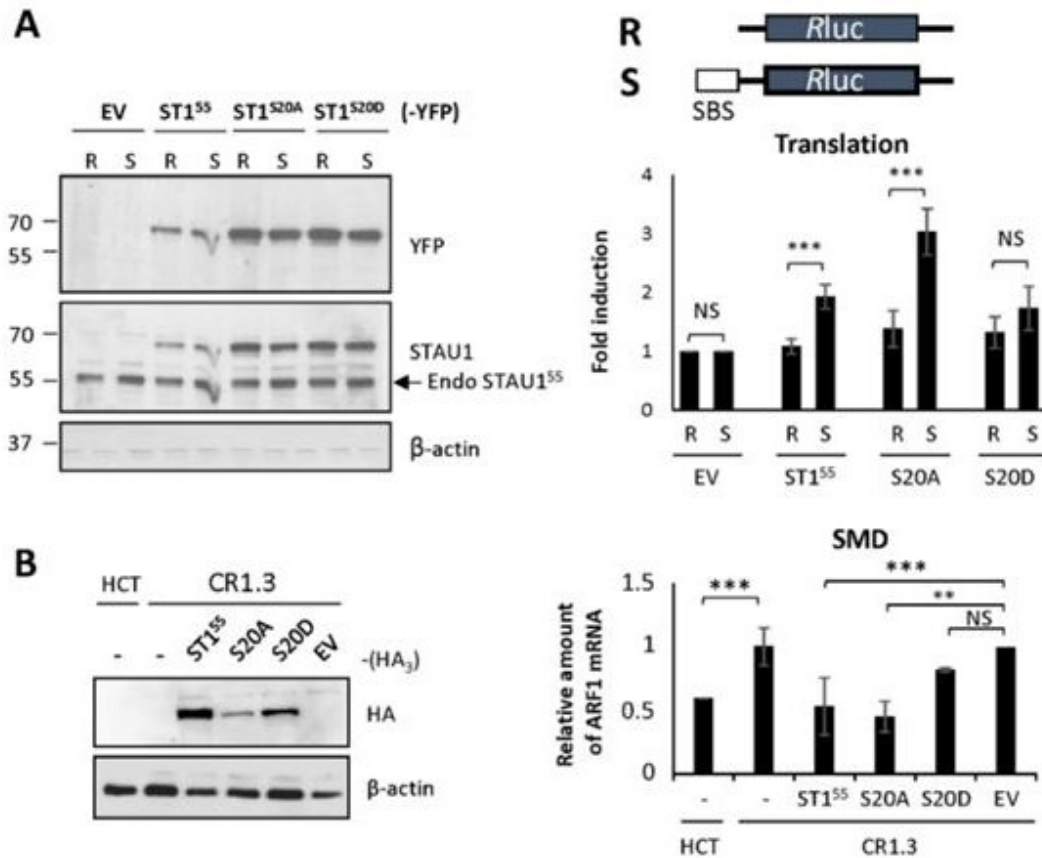


Figure 3-4. Expression of the phosphomimetic mutant S20D abrogates STAU1⁵⁵-dependent translation and SMD. (A) Schematic representation of the reporter proteins used in the translation assay. Rluc, Renilla luciferase; SBS, STAU1-binding site. HEK293T cells were co-transfected with plasmids coding for the reporter Rluc or SBS-Rluc proteins and for STAU1⁵⁵ and mutants as indicated. (Left panel) Cell extracts were collected 24 h post-transfection, and the expression of STAU1⁵⁵ proteins was analyzed by western blotting. Endo STAU1⁵⁵, endogenous STAU1⁵⁵. (Right panel) Relative translation of Rluc (R) and SBS-Rluc (S) is shown. The graph represents the means and

standard deviations of three independently performed experiments. **, p-value ≤ 0.01 ; ***, p-value ≤ 0.001 . NS, not significant. Translation of Rluc in the presence of the empty vector (EV) was arbitrary fixed to 1. (B) STAU1-KO HCT116 (CR1.3) cells were transfected with plasmids coding for STAU1⁵⁵, STAU1⁵⁵ mutants as indicated, or the empty vector (EV). (Left panel) Expression of the proteins was analyzed by western blotting. (Right panel) RNAs were isolated and ARF mRNA was quantified by RT-qPCR using HPRT and RPL22 mRNAs as normalization controls. The graph represents the means and standard deviations of three independently performed experiments. **, p-value ≤ 0.01 ; ***, p-value ≤ 0.001 . Expression of ARF mRNA in untransfected CR1.3 cells (-) was arbitrary fixed to 1. Untransfected HCT116 cells (-) were used as a reference for SMD.

Similarly, the capacity of STAU1⁵⁵ to elicit SMD was affected by the S20D mutation. To measure SMD, we compared the amounts of ARF1 mRNA, a known target of SMD [23], in HCT116 and STAU1-KO HCT116 (CR1.3 cells) cells. As expected, the amounts of ARF1 mRNA were lower in HCT116 cells compared to those in STAU1-KO cells (Figure 3-4B). We then transfected STAU1-KO cells with plasmids coding for STAU1⁵⁵-HA₃, STAU1^{S20A}-HA₃, or STAU1^{S20D}-HA₃ and determined if SMD can be rescued. As expected, the expression of STAU1⁵⁵-HA₃ restored SMD in STAU1-KO cells, while the transfection of the empty vector had no effect. Interestingly, STAU1^{S20A}-HA₃ also rescued SMD, as did the STAU1⁵⁵ wild type (Figure 3-4B). In contrast, STAU1^{S20D}-HA₃ was unable to rescue SMD. Altogether, these results indicate that the presence of a negative charge on S20 abrogates STAU1⁵⁵-dependent translation and SMD.

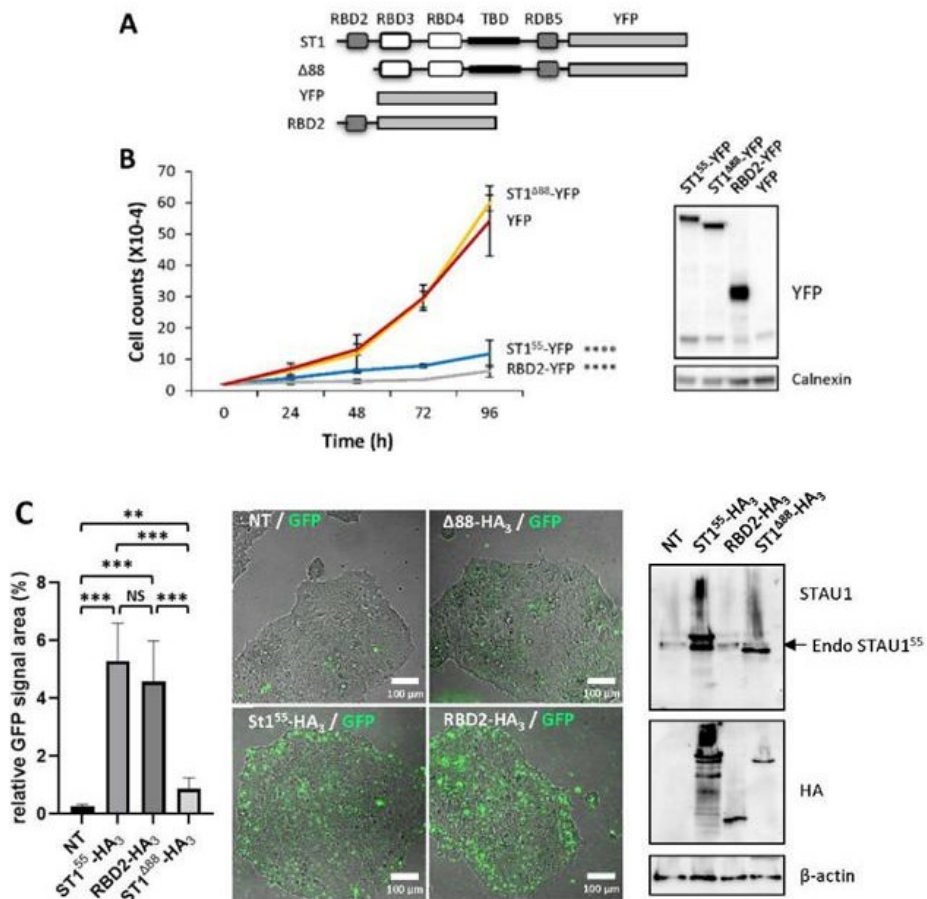
RBD2 Expression Is Sufficient to Impair Cell Proliferation and to Induce Apoptosis

To determine if RBD2 is sufficient to impair cell proliferation and as corollary if other functional domains of STAU1⁵⁵ are synergistically involved in this function, we fused RBD2 to YFP (Figure 3-5A), a protein that does not impair cell proliferation when expressed in transformed cells. Growth curve assays, initiated 24 h post-transfection, were used to compare the growth of cells expressing RBD2-YFP to that of cells expressing STAU1⁵⁵-YFP, STAU1^{Δ88}-YFP, and YFP, as controls (Figure 3-5B). Western blotting compared the expression of these proteins in HEK293T cells. As expected, the growth of cells expressing STAU1⁵⁵-YFP was lower than those of cells expressing YFP or STAU1^{Δ88}-YFP. Interestingly, cells expressing RBD2-YFP showed impaired cell proliferation, similar to that of cells expressing STAU1⁵⁵-YFP.

To determine if RBD2-YFP is able to induce apoptosis, cells were then transfected with plasmids coding for RBD2-YFP, STAU1⁵⁵-YFP, or STAU1^{Δ88}-YFP and immediately visualized by microscopy for fluorescence staining following caspase activation (Figure 3-5C). The expression of RBD2-YFP induced apoptosis, as did STAU1⁵⁵-YFP, whereas STAU1^{Δ88}-YFP did not. These results indicate that RBD2 is sufficient to impair cell proliferation and induce apoptosis when expressed in transformed cells and, consequently, that other domains of STAU1⁵⁵ are not required for these functions.

To determine if RBD2-YFP uses that same molecular determinant as STAU1⁵⁵ to impair cell proliferation, we generated phosphomimetic and non-phosphorylatable mutants of S20 in the context of RBD2-YFP. The growth of cells expressing RBD2^{S20A}-YFP and RBD2^{S20D}-YFP was compared to that of cells expressing STAU1⁵⁵-YFP, STAU1^{Δ88}-YFP,

RBD2-YFP, and YFP (Figure 3-5D). Interestingly, cells expressing RBD2^{S20D} showed impaired cell proliferation, as did STAU1⁵⁵-YFP and RBD2-YFP, whereas cells expressing RBD2^{S20A}-YFP grew normally, as did STAU1^{Δ88}-YFP and YFP-expressing cells. These results indicate that the molecular determinant of RBD2-YFP that contributes to impair cell proliferation when expressed in transformed cells is identical to that of STAU1⁵⁵.



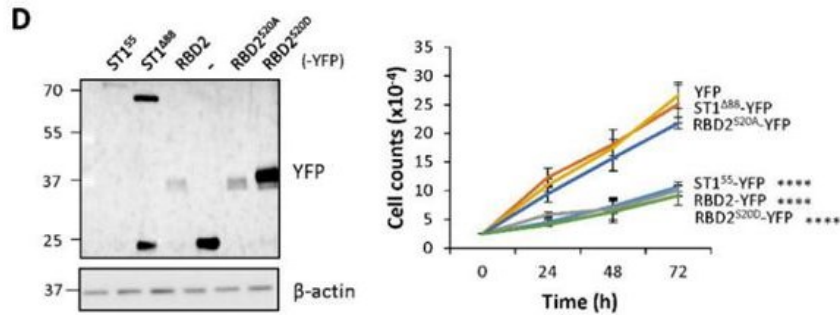


Figure 3-5. RBD2 expression impairs cell proliferation via serine 20. (A) Schematic representation of the expressed proteins. See legend of Figure 3-2. YFP, yellow fluorescent protein. (B) Cell proliferation assay. Transfected cells were trypsinized 24 h post-transfection, plated, and allowed to grow for four days. The graph represents the means and standard deviations of three independently performed experiments. ****, p-value ≤ 0.0001 (Tukey's multiple comparisons ANOVA test). Western blots (right panel) showing the expression of the proteins. (C) HEK293T cells were transfected with plasmids coding for STAU1⁵⁵-HA₃, STAU1^{Δ88}-HA₃, and RBD2-HA₃ and were immediately incubated in the presence of the GFP-coupled apoptosis stain. (Left) Quantification of the GFP signal. The graph represents the means and standard deviations of three independently performed experiments. **, p-value ≤ 0.01 . ***, p-value ≤ 0.001 (Student t-test). NS, not significant. (Right) Western blots showing the expression of the proteins. The blots are representative of three independent experiments that gave similar results. Endo STAU1⁵⁵, endogenous STAU1⁵⁵. (D) Cell proliferation using growth curve assays was quantified over three days. The graph represents the means and standard deviations of three independently performed experiments. ****, p-value ≤ 0.0001 (Tukey's multiple comparisons ANOVA test). Western blots (left panel) showing the expression of the proteins.

RBD2 Interferes with Endogenous STAU1⁵⁵ to Impair SMD

We showed that RBD2 impairs cell proliferation, as does STAU1⁵⁵, and that it uses the same molecular determinant. However, RBD2 does not bind dsRNA. Therefore, we tested the capacity of RBD2 to affect STAU1⁵⁵-dependent translation and SMD. Plasmids coding for Rluc and SBS-Rluc were co-transfected with plasmids coding for STAU1⁵⁵-YFP, STAU1^{Δ88}-YFP, RBD2-YFP, or the empty vector. Luciferase assays indicated that RBD2 expression did not enhance the translation of SBS-Rluc (Figure 3-6A). We then compared the effects of RBD2 on SMD. STAU1⁵⁵-HA₃, STAU1^{Δ88}-HA₃, RBD2-HA₃, or the empty vector were transfected into STAU1-KO HCT116 cells. As expected, the expression of STAU1⁵⁵-HA₃ restored SMD, while STAU1^{Δ88}-HA₃ partly restored SMD. In contrast, the expression of RBD2-HA₃ did not re-establish SMD (Figure 3-6B).

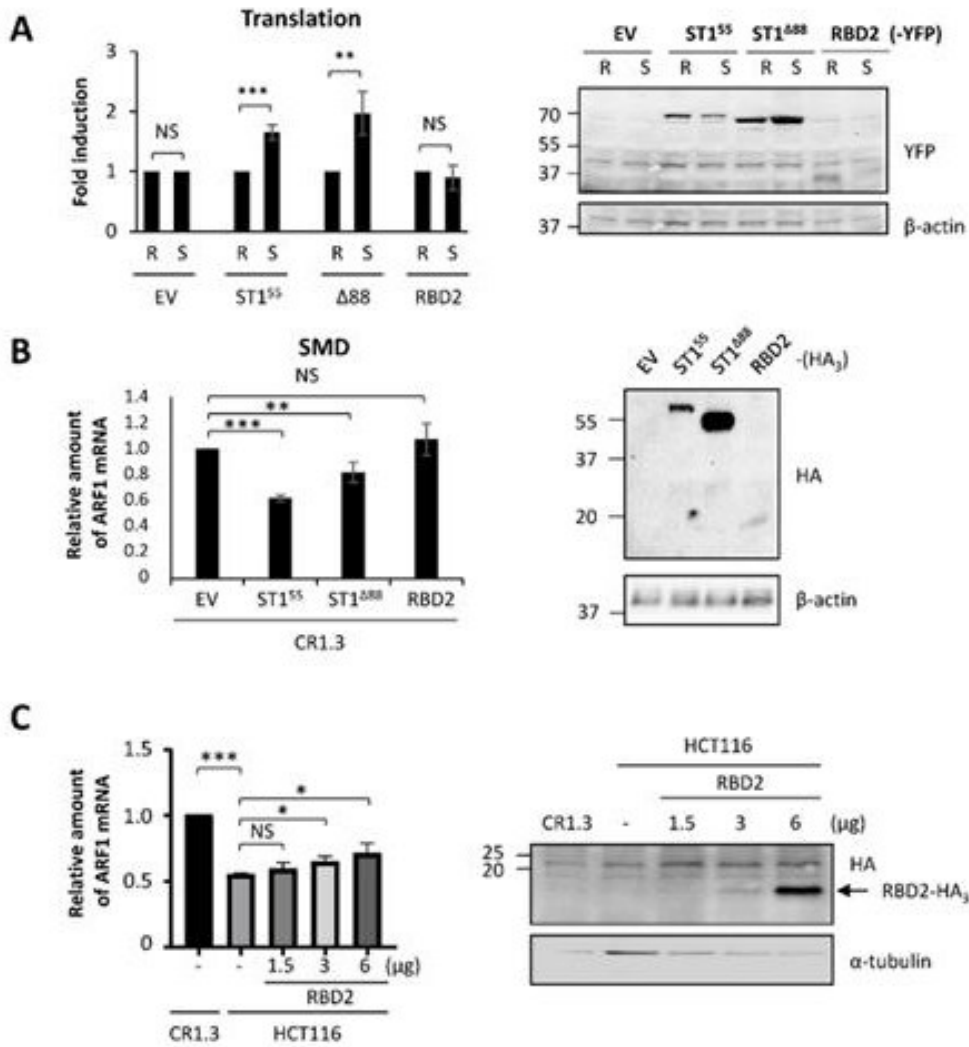


Figure 3-6. RBD2 expression impairs SMD via interference with endogenous STAU1⁵⁵ functions. (A) HEK293T cells were co-transfected with plasmids coding for the reporter Rluc or SBS-Rluc proteins and for RBD2-YFP or controls (ST1⁵⁵, Δ88) as indicated. (Left panel) Relative translation of Rluc (R) and SBS-Rluc (S) is shown. The graph represents the means and standard deviations of three independently performed experiments. **, p-value ≤ 0.01; ***, p-value ≤ 0.001. NS, not significant. Translation of Rluc in the presence of the empty vector (EV) was arbitrary fixed to 1. (Right panel) Cell extracts were collected 24 h post-transfection, and the expression of STAU1⁵⁵ proteins was analyzed by western

blotting. (B) STAU1-KO HCT116 (CR1.3) cells were transfected with plasmids coding for RBD2-HA₃ or controls (EV, ST1⁵⁵, Δ88) as indicated. (Left panel) RNAs were isolated, and ARF1 mRNA was quantified by RT-qPCR using HPRT and RPL22 mRNAs as normalization controls. The graph represents the means and standard deviations of three independently performed experiments. **, p-value ≤ 0.01; ***, p-value ≤ 0.001. The expression of ARF mRNA in CR1.3 cells transfected with empty vector (EV) was arbitrary fixed to 1. (Right panel) The expression of the proteins was analyzed by western blotting. (C) HCT116 cells were transfected with increasing concentrations of plasmids coding for RBD2-HA₃ as indicated. (Left panel) RNAs were isolated, and ARF mRNA was quantified as above. *, p-value ≤ 0.05. The expression of ARF mRNA in untransfected STAU1-KO HCT116 (CR1.3) cells was arbitrary fixed to 1. (Right panel) The expression of the proteins was analyzed by western blotting.

Experiments in Figure 3-6 A, B were designed to test the direct role of RBD2 in post-transcriptional regulation. As RBD2 had no direct role on translation or SMD, we then tested whether RBD2 interferes with endogenous STAU1⁵⁵ and indirectly affects STAU1⁵⁵-mediated posttranscriptional control. Especially, RBD2 was previously shown to interact with RBD5 [47], the C-terminal domain involved in STAU1⁵⁵ homodimerization [48]. The expression of RBD2 could, therefore, prevent STAU1⁵⁵ dimerization that in turn is essential for SMD [48]. Thus, HCT116 cells were transfected with increasing amounts of a plasmid coding for RBD2-HA₃ (Figure 3-6C), and SMD efficiency was quantified with ARF1 mRNA (Figure 3-6D). STAU1-KO cells were used as the control for the amount of ARF1 mRNA when STAU1⁵⁵ was absent. As expected, ARF1 mRNA levels were reduced

in HCT116 cells compared to STAU1-KO cells due to SMD. The increasing expression of RBD2-HA₃ paralleled an increase of ARF1 mRNA levels in STAU1⁵⁵-expressing cells, consistent with impaired SMD. Combined with the fact that RBD2 has no effect on SMD in STAU1-KO cells (Figure 3-6B), these results indicate that RBD2 acts in trans and interferes with endogenous STAU1⁵⁵ functions to prevent SMD.

3.3.4 Discussion

STAU1⁵⁵ is well characterized for its involvement in cell decision during development, cell differentiation, or proliferation, through pluripotent post-transcriptional activities [13,29]. We now show that the posttranslational modification on serine 20 in the N-terminal region of STAU1⁵⁵ is sufficient to impair cell proliferation and trigger the apoptosis of cancer cells. Indeed, the presence of a negative charge on serine 20 rather than overexpression, per se, is responsible for the observed phenotypes since the overexpression of STAU1^{S20A} has no effect on cell proliferation. The molecular mechanism by which serine 20 impairs cell proliferation likely relies on a modulation of STAU1⁵⁵ posttranscriptional activity, especially the translation and/or decay of STAU1⁵⁵-bound mRNAs. Surprisingly, expression of RBD2 alone is also able to impair cell proliferation dependent on serine 20, likely via an interaction that inhibits endogenous STAU1⁵⁵ functions.

STAU1⁵⁵ Overexpression Impairs Cell Proliferation and Triggers Apoptosis of Transformed Cells

In contrast to what was observed in untransformed cells [31], STAU1 depletion or knockout had no effect on the proliferation of cancer cells, indicating that STAU1 is not essential once cells are transformed [40,41,46]. In contrast, STAU1⁵⁵ overexpression led to impaired cell proliferation that is due, at least partly, to the induction of cell death [41,42,43,44]. STAU1⁵⁵ is described as an oncogene that facilitates cell cycle phase transition [31]. It is thus appropriate that its expression is upregulated in most cancers. However, STAU1⁵⁵ expression seems to be kept at the edge between cell proliferation and cell death since high STAU1⁵⁵ expression correlates with better survival rates

following treatments [38,39,40], indicating that high STAU1⁵⁵ expression makes cells more sensitive to death-inducing treatments. Therefore, an increase of STAU1⁵⁵ expression in cancer cells perturbs the fragile equilibrium between proliferation and cell death and impairs cell proliferation. In addition to being an oncogene, STAU1⁵⁵ can also be considered a pro-apoptotic factor.

Interestingly, STAU1⁵⁵-overexpressing transformed cells entered apoptosis shortly after transfection, well before exogenous STAU1⁵⁵ expression was elevated. Cells that escaped apoptosis during this early response did not enter apoptosis later on. They nevertheless displayed impaired cell proliferation compared to untransfected cells. The nature of the defects was not clear. We previously showed that these cells are not apoptotic, senescent, or quiescent [41]. As STAU1⁵⁵ is a facilitator of the cell cycle phase transition in untransformed cells [31], we believe that STAU1⁵⁵ overexpression in these cells may cause an unregulated acceleration of phase transition that eventually triggers genetic stress and, in turn, impaired cell proliferation.

STAU1⁵⁵ Regulates Cell Proliferation through Modifications of Serine 20/Threonine 21

The molecular dissection of the N-terminal region of STAU1⁵⁵ allowed us to identify two phosphorylatable residues, serine 20 and threonine 21, that exert opposite effects on cell proliferation. Impaired cell proliferation caused by the expression of the phosphomimetic S20D mutant correlated with the expression of the non-phosphorylatable T21A. These results strongly suggest that the phosphorylation/dephosphorylation of serine 20 and threonine 21 is the determinant that modulates cell proliferation, although we do not

exclude the possibility that other types of posttranslational modifications on S20/T21 may control this function. These opposite results suggest that the phosphorylation of T21 may antagonize S20 phosphorylation, likely through conformational changes or steric hindrance.

The physiologically controlled phosphorylation/dephosphorylation of serine 20 is likely an efficient molecular mechanism for the regulation of the STAU1⁵⁵-mediated posttranscriptional regulation in changing cell environments. Interestingly, STAU1⁵⁵ overexpression had no effect on cell proliferation in non-transformed cells [31]. In contrast, it induced apoptosis in cancer cells. This suggests that cancer cells may express a constitutively active kinase that can phosphorylate STAU1⁵⁵. Cancer cells are known to overexpress several kinases and/or express mutated kinases with constitutively active functions compared to non-transformed cells [49,50]. Since cancer cells grow well, it is likely that only a fraction of STAU1⁵⁵ is phosphorylated and that cancer cells maintain an optimal ratio of phosphorylated/unphosphorylated STAU1⁵⁵ molecules that facilitate proliferation. We proposed that this ratio keeps the cells at the edge between proliferation and apoptosis, since a modest increase in STAU1⁵⁵ expression causes apoptosis. Upon STAU1⁵⁵ overexpression, the absolute amount of phosphorylated STAU1⁵⁵ then increases tipping the balance toward apoptosis. One caveat of this study is that we were unable to document posttranslational modifications on serine 20. Although we identified four phosphorylation sites on STAU1⁵⁵ following immunoprecipitation and mass spectrometry (Boulay and DesGroseillers, unpublished), none of them were in the N-terminal end of STAU1⁵⁵. The absence of coverage in the N-terminal fragment did not

allow us to determine if serine 20 is phosphorylated or not and may reflect technical constraints.

Expression of RBD2 Alone Impairs Cell Proliferation and Triggers Apoptosis

Surprisingly, our results indicate that RBD2 is sufficient to impair cell proliferation and trigger apoptosis following its overexpression in transformed cells. As observed with STAU1⁵⁵, the presence of a negative charge on serine 20 of RBD2 was absolutely required to impair cell proliferation. The observation that RBD2 needs the expression of endogenous STAU1⁵⁵ to impair SMD suggests that the charged serine 20 in the context of RBD2 interferes in trans with STAU1⁵⁵, the same way as the charged serine 20 in STAU1⁵⁵ does to impair STAU1⁵⁵ posttranscriptional functions. Our model was that the negative charge on serine 20 promotes or facilitates the interaction between RBD2 and the C-terminal domain of endogenous STAU1⁵⁵, preventing STAU1⁵⁵ dimerization and inhibiting SMD (Figure 3-7). Interactions between RBD2 and RBD5 were previously reported [47,48]. Similarly, the mechanism of STAU1⁵⁵ dimerization was elucidated and shows that the Staufen-swapping domain (SSM) of one STAU1⁵⁵ molecule interacts with the RBD5 of another one [48]. The presence of positively charged amino acids at the SSM-RBD5 interface was consistent with a putative role of the negatively charged serine 20 in a mechanism that regulates STAU1⁵⁵ dimerization. The loss of dimerization would then explain the inhibition of STAU1⁵⁵-mediated posttranscriptional regulation [48].

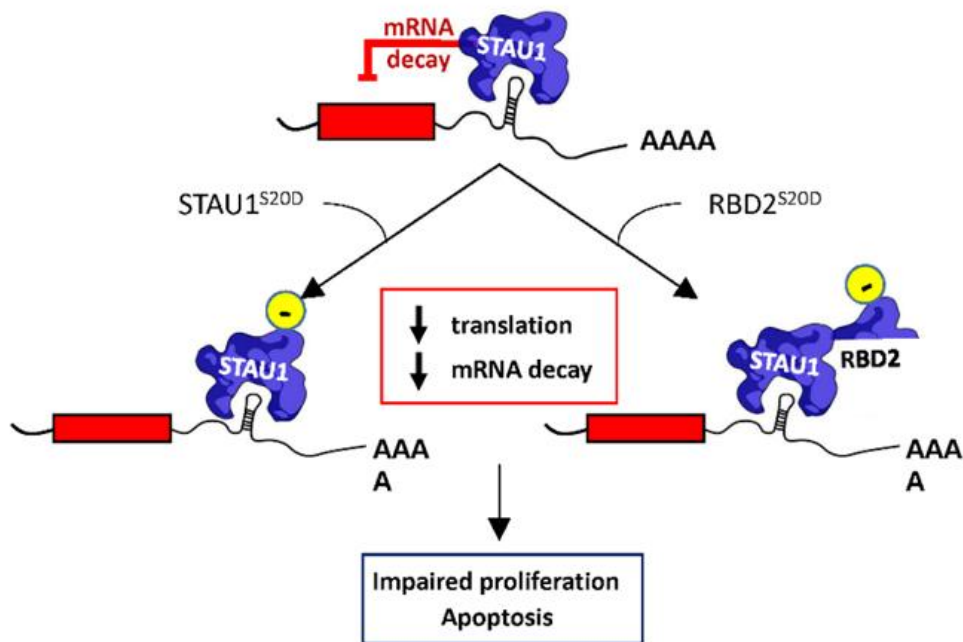


Figure 3-7. Proposed mechanism of STAU1⁵⁵-mediated cell proliferation impairment. STAU1⁵⁵ is a posttranscriptional regulator that controls translation and the SMD of bound mRNAs. Expression of STAU1^{S20D} inhibits both STAU1-mediated translation and decay. Similarly, the expression of RBD2^{S20D} abrogates SMD, but the expression of endogenous STAU1⁵⁵ is required for this phenotype, indicating that RBD2^{S20D} interferes with endogenous STAU1⁵⁵ functions. As a consequence of the misregulation of STAU1⁵⁵-bound mRNAs following STAU1^{S20D} or RBD2^{S20D} expression, cells enter apoptosis or show impaired cell proliferation.

Serine 20 Regulates STAU1⁵⁵ Posttranscriptional Functions

Our results indicate that STAU1^{S20D} loses its ability to enhance translation when bound in the 5'UTR of mRNAs and to induce mRNA decay when bound in the 3'UTR of mRNAs (Figure 3-5). STAU1⁵⁵-mediated translational regulation also occurs through binding to

GC-rich regions of the coding sequence and to the 3'UTR [15,17,18]. STAU1⁵⁵, thus, can strongly influence the expression of RNA regulons in changing cell environment. Many STAU1⁵⁵-bound mRNAs code for proteins involved in the apoptotic or cell proliferation pathways (Supplementary Materials Table S1), suggesting that the modulation of STAU1⁵⁵ expression can change the expression of downstream RNA targets and, accordingly, cell fate. Indeed, through ribosome profiling and RNAseq experiments, it was shown that the misregulation of STAU1⁵⁵ expression (overexpression or depletion) changes the translational profiles and/or abundance of multiple mRNAs in transformed cells [15,17,18,31]. Therefore, through impaired posttranscriptional functions, STAU1^{S20D} may completely change the equilibrium between proliferative and apoptotic transcripts and tip the balance toward impaired cell proliferation.

3.3.5 Materials & Methods

Cell Culture and Transfection

HCT116 (colorectal carcinoma cell line), STAU1-knockout HCT116 [46], and HEK293T (human embryonic kidney cell line) cells were cultured in Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM, Wisent) supplemented with 10% fetal bovine serum (Wisent), 100 µg/mL streptomycin, and 100 units/mL penicillin (Wisent Inc, St-Bruno, QC, Canada) under 5% CO₂ atmosphere. Cells were transfected with TransIT-LT1 transfection reagent (MJS BioLynx Inc, Brockville, ON, Canada), using 3 µg of plasmid DNA for all transfection, except for plasmids coding for RBD2-tagged proteins (2 µg) and YFP (1 µg) in 10-cm petri dishes. Amounts of 2 µg, 1 µg, and 0.5 µg of plasmids were used, respectively, when transfected in 6-cm petri dishes. For the luciferase assay, a mixture of 600 ng of plasmids coding for the specific proteins, 300 ng of the Rluc or SBS-Rluc vector, and 100 ng of empty vector was transfected in 6-cm petri dishes.

Plasmids and Cloning Strategies

Plasmids cloning for STAU1⁵⁵-HA₃ (in pcDNA3 RSV) and its progressive N-terminal deletion mutants (Δ 88, Δ 60, Δ 46, Δ 37, Δ 25, Δ 17, and Δ 7) were previously described [41]. Plasmids cloning for STAU1⁵⁵-YFP (in YFP Topaz) and its mutant of deletion of the first 88 amino acids were described [47]. To obtain the plasmid RBD2 in YFP Topaz, the region corresponding to RBD2 in STAU1⁵⁵ (amino acids 1–88) was PCR amplified using STAU1⁵⁵-YFP as a template. Briefly, RBD2 was amplified with oligos forward 5'-TACCCGAATTCAGTTATAAGCCTGTTGACCCTTAC-3' and reverse 5'-TACCACCGGTGATTCTCTTCCATTACCTCCAG-3'. PCR products were digested with

endonucleases EcoRI and AgeI (New England BioLabs Ltd., Whitby, ON, Canada) and ligated in YFP-topaz with T4 ligase (ThermoFisher scientific, St-Laurent, QC, Canada). Phosphomimetics and non-phosphorylatable mutants for S20, T21, Y22, and Y24 of STAU1⁵⁵ were created by substitution with aspartic acid or alanine, respectively. Briefly, we performed all-around PCR assays using oligos (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) (Supplementary Materials Table S2) and PfuUltra II Fusion HotStart DNA Polymerase (600670) (Agilent, Toronto, ON, Canada). PCR results were digested with DpnI (NEB-R0176S) (New England BioLabs Ltd., Whitby, ON, Canada). Mutations were confirmed by sequencing. Phospho-mutants for S20 in the RBD2-YFP background were obtained using the same strategy and oligos using RBD2-YFP as the PCR template.

Time Lapse Microscopy and Image Analysis

HEK293T cells were transfected with vectors, allowing the overexpression of STAU1⁵⁵-mCherry or mCherry as a control (in pCDNA3.1-CMV). CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Invitrogen™, St-Laurent, QC, Canada) was added directly after transfection (Figure 3-1A experiment A) or 24 h after transfection (Figure 3-1A experiment B) following the manufacturer's procedure at a final concentration of 2 μM. Time lapse video microscopy with images taken every 10 min for 12, 16, or 36 h was conducted with the spinning disk Axio Observer Z1 (Zeiss, Oberkochen, Germany), equipped with an incubation chamber providing the optimal cell growth. Similarly to experiment A, HEK293T cells were transfected with previously described vectors STAU1⁵⁵-HA₃, RBD2-HA₃, Δ88-HA₃, STAU1^{S20A}-HA₃, or STAU1^{S20D}-HA₃, and time lapse was performed every 10 min for 20 h. HEK293T cells were transfected with STAU1⁵⁵-YFP, STAU1^{S20A}-YFP,

STAU1^{S20D}-YFP, or YFP control, and single time-point image acquisition on living cells at 37 °C under a 5% CO₂ atmosphere was conducted after 36 h. Images were analyzed with ImageJ 1.52a (National Institutes Health, Bethesda, MD, USA). YFP (green), and mCherry (red) cell area signals were normalized to the total cell area (brightfield) and expressed as a percentage of this ratio.

Antibodies and Reagents

Anti-HA (12CA5) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) or from Millipore-Sigma (H6908) (Oakville, ON, Canada). The antibody against GFP (11814460001) was purchased from Roche (Oakville, ON, Canada) and used to detect YFP-tagged proteins since the two proteins are identical except for one amino acid and that anti-GFP antibody perfectly recognizes YFP. The antibody against mCherry was purchased from Sigma-Aldrich (AB356482) (Aokville, ON, Canada). Anti-STAU1 was previously described [51]. Anti- β -Actin (A5441) was obtained from Sigma (Aokville, ON, Canada). All primary antibodies were used at 1:1000 dilution. MG132 (C2211) was purchased from Millipore-Sigma (Aokville, ON, Canada) and used at 20 μ M for 8 h. DMSO was purchased from Millipore-Sigma (Aokville, ON, Canada).

Western Blot Analysis

Cell extracts were lysed in Laemli buffer (25 mM Tris-Cl pH 7.4, 1% SDS). Proteins were then quantified with the BCA reagent kit (PierceTM BCA protein assay) (ThermoScientific, St-Laurent, QC, Canada). After adding the bromophenol blue, 10–20 μ g of proteins was separated on 10% (HA-tagged proteins) or 15% (YFP-tagged proteins) acrylamide/bis

acrylamide (29:1) gels, analyzed by western blotting, and revealed on X-ray films (Fujifilm, Christie Innomed, St-Eustache, QC, Canada) or with the ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad Laboratories Ltd, St-Laurent, QC, Canada). Quantification analysis was made with ImageJ or ImageLab 6.1 (Bio-Rad Laboratories Ltd, St-Laurent, QC, Canada) software, respectively.

RNA Isolation and RT-qPCR

Cell extracts were homogenized with TRIZOL reagent (Ambion, St-Laurent, QC, Canada). Nucleic acids were extracted with chloroform and precipitated with isopropanol (Bioshop, Burlington, ON, Canada). Pellets were diluted in water and precipitated twice with LiCl 3M. Samples were digested with DNase using the TURBO DNA-free kit (Ambion, St-Laurent, QC, Canada). Total RNA was quantified, and 1 µg of each sample was reverse transcribed using the RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific, St-Laurent, QC, Canada) and oligo(dT). Products were qPCR amplified with the Luna® Universal qPCR Master Mix (New England BioLabs Ltd, Whitby, ON, Canada) and ran on a LightCycler96 (Roche, Oakville, ON, Canada). Amplification of ARF1 mRNA was performed using the oligos 5'-AGGCTGGTACCGGTCCGGAATTC-3' and 5'-CTCTGTCATTGCTGTCCACCACG-3', and normalization was made by the average gene expression of HPRT and RPL22, amplified using the oligos forward 5'-GCTTTCCTTGGTCAGGCAGAT-3' and reverse 5'-CTTCGTGGGGTCCTTTTCACC-3' for the first and forward 5'-TTGCTGTTAGCAACTACGCGCAAC-3' and reverse 5'-TGGTGACCATCGAAAGGAGCAAGA-3' for the latter.

Gene Expression Assays

To study STAU1⁵⁵-dependent translation, plasmids coding for STAU1⁵⁵-YFP, STAU1^{S20A}-YFP, STAU1^{S20D}-YFP, RBD2-YFP, RBD2^{S20A}-YFP, and RBD2^{S20D}-YFP were co-transfected with plasmids coding for either Rluc or SBS-Rluc [22] in HEK293T cells that were allowed to grow for 24 h. Cells were lysed with passive lysis buffer, and the expression of Rluc was quantified in triplicate using the Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA) and a luminometer (HIDEX). To study SMD, plasmids coding for STAU1⁵⁵-HA₃, STAU1^{S20A}-HA₃, STAU1^{S20D}-HA₃, and RBD2-HA₃ were transfected in STAU1-KO HCT116 cells [46]. At 24 h after transfection, the total RNA was extracted and the level of ARF1 mRNA was measured by RT-qPCR, as previously described [23].

Growth Curve Assays

At 24 h post-transfection, cells were trypsinized and plated at the same density (day = 0), and the remaining cells were lysed and used for western blotting. For growth curve assays, cells were harvested every one or two days, and the number of cells was counted with a hemacytometer (Biorad Laboratories Ltd., St-Laurent, QC, Canada).

3.3.6 Conclusions

We propose that, following transfection, a cancer-associated kinase phosphorylates STAU1⁵⁵ serine 20 (Figure 3-7). Phosphorylation of serine 20 impairs STAU1⁵⁵ posttranscriptional activities (translation, mRNA decay) by preventing STAU1⁵⁵ homodimerization or by sequestering factors essential for cell proliferation. The inhibition of STAU1⁵⁵ posttranscriptional activities then changes the expression of STAU1⁵⁵-bound pro/anti-proliferative and pro/anti-apoptotic transcripts and tips the balance toward apoptosis and cell proliferation impairment. STAU1⁵⁵ can use multiple pathways to induce apoptosis, including the activation of the PERK-CHOP pathway of the unfolded protein response [44] and the perturbation of stress granule assembly [51,52,53]. STAU1⁵⁵ is a sensor of cell proliferation and, through modulate expression, controls cell fate. Our results indicate that, in cancer cells, STAU1⁵⁵ is involved in the control of proliferation and apoptosis. Therefore, STAU1⁵⁵ may be considered as a novel therapeutic target against cancer.

3.3.7 Supplementary Materials

Supplementary Table 3-S1. Selected biological process GO terms enriched in genes whose transcripts are bound by STAU1⁵⁵, as identified in the following publications, can be downloaded at the external link:

<https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23137344/s1>.

Supplementary Table 3-S2. List of oligonucleotides used in this study (mutated nucleotides are highlighted in yellow).

Plasmids	Oligonucleotide primers	
	Sense	Antisense
STAU1 ^{S20A}	5'-ctctcggatgcaggccacacataac-3'	5'-gttataggtggcctgcatccgagag-3'
STAU1 ^{S20D}	5'-ctctcggatgcaggacacacataac-3'	5'-gttataggtgtctctgcatccgagag-3'
STAU1 ^{T21A}	5'-ctcggatgcagtcgccctataactac-3'	5'-gtagttatagggcggactgcatccgag-3'
STAU1 ^{T21D}	5'-ctcggatgcagtcggactataactac-3'	5'-gtagttatagtcggactgcatccgag-3'
STAU1 ^{Y22A}	5'-gatgcagtcaccgctaactacaacatg-3'	5'-catgtttagttagcggggactgcatc-3'
STAU1 ^{Y22D}	5'-gcagtcaccgataactacaac-3'	5'-gtttagttatcggggactgc-3'
STAU1 ^{Y24A}	5'-cagtcacacataacgccaacatgagag-3'	5'-ctctcatgttggcgttataggtggactg-3'
STAU1 ^{Y24D}	5'-gtccacacataacgacaacatgagag-3'	5'-ctctcatgttctgttataggtggac-3'

Author Contributions

Conceptualization, Y.G.Q., F.B.-M. and L.D.; methodology, Y.G.Q., F.B.-M. and L.D.; validation, Y.G.Q., F.B.-M. and L.D.; formal analysis, Y.G.Q. and F.B.-M.; investigation, Y.G.Q. and F.B.-M.; writing—original draft, Y.G.Q. and F.B.-M.; writing—review—editing, Y.G.Q., F.B.-M. and L.D.; visualization, Y.G.Q., F.B.-M. and L.D.; supervision, L.D.; project administration, L.D.; funding acquisition L.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This work was supported by grants from the Canadian Institute for Health Research [grant number MOP-229979] and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada [grant number RGPIN-2019-05027] to L.D. The funding agencies had no role in the design of the study; collection, analysis, and interpretation of data; or in writing the manuscript.

Data Availability Statement

The data presented in this study are available in the article and supplementary material.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

3.3.8 Acknowledgments

We thank Louise Cournoyer for help with cell culture, Karine Boulay, Bellastrid Doran, and Lionel Condé for technical support, and Rémy Beaujois for useful suggestions. We thank Dre Josée Harel (Département de pathologie et microbiologie, Université de Montréal) for scientific support.

3.3.9 References

1. Gookin, S.; Min, M.; Phadke, H.; Chung, M.; Moser, J.; Miller, I.; Carter, D.; Spencer, S.L. A map of protein dynamics during cell-cycle progression and cell-cycle exit. *PLoS Biol.* 2017, 15, e2003268.
2. Visconti, R.; Della Monica, R.; Grieco, D. Cell cycle checkpoint in cancer: A therapeutically targetable double-edged sword. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2016, 35, 153.
3. Harper, J.W.; Bennett, E.J. Proteome complexity and the forces that drive proteome imbalance. *Nature* 2016, 537, 328–338.
4. Corbett, A.H. Post-transcriptional regulation of gene expression and human disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2018, 52, 96–104.
5. El Hiani, Y.; Egom, E.E.; Dong, X.P. mTOR signalling: Jack-of-all-trades. *Biochem Cell Biol* 2019, 97, 58–67.
6. Kontomanolis, E.N.; Koutras, A.; Syllaios, A.; Schizas, D.; Mastoraki, A.; Garpis, N.; Diakosavvas, M.; Angelou, K.; Tsatsaris, G.; Pagkalos, A.; et al. Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Res.* 2020, 40, 6009–6015.
7. Liu, X.L.; Ding, J.; Meng, L.H. Oncogene-induced senescence: A double edged sword in cancer. *Acta Pharmacol. Sin.* 2018, 39, 1553–1558.
8. Jan, R.; Chaudhry, G.E. Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics. *Adv. Pharm. Bull.* 2019, 9, 205–218.
9. Pistrutto, G.; Trisciuglio, D.; Ceci, C.; Garufi, A.; D’Orazi, G. Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging* 2016, 8, 603–619.
10. Wickham, L.; Duchaine, T.; Luo, M.; Nabi, I.R.; DesGroseillers, L. Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* 1999, 19, 2220–2230.
11. Marion, R.M.; Fortes, P.; Beloso, A.; Dotti, C.; Ortin, J. A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* 1999, 19, 2212–2219.
12. Duchaine, T.; Wang, H.J.; Luo, M.; Steinberg, S.V.; Nabi, I.R.; DesGroseillers, L. A novel murine Staufen isoform modulates the RNA content of Staufen complexes. *Mol. Cell. Biol.* 2000, 20, 5592–5601.
13. Bonnet-Magnaival, F.; DesGroseillers, L. The Staufen1-dependent cell cycle regulon or how a misregulated RNA-binding protein leads to cancer. *Biol. Rev. Camb. Philos Soc.* 2021, 96, 2192–2208.
14. Furic, L.; Maher-Laporte, M.; DesGroseillers, L. A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes. *RNA* 2008, 14, 324–335.
15. Ricci, E.P.; Kucukural, A.; Cenik, C.; Mercier, B.C.; Singh, G.; Heyer, E.E.; Ashar-Patel, A.; Peng, L.; Moore, M.J. Staufen1 senses overall transcript secondary structure to regulate translation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2014, 21, 26–35.

16. de Lucas, S.; Oliveros, J.C.; Chagoyen, M.; Ortin, J. Functional signature for the recognition of specific target mRNAs by human Staufen1 protein. *Nucleic Acids Res.* 2014, 42, 4516–4526.
17. Sugimoto, Y.; Vigilante, A.; Darbo, E.; Zirra, A.; Militti, C.; D'Ambrogio, A.; Luscombe, N.M.; Ule, J. hiCLIP reveals the in vivo atlas of mRNA secondary structures recognized by Staufen 1. *Nature* 2015, 519, 491–494.
18. Zheng, D.; Cho, H.; Wang, W.; Rambout, X.; Tian, B.; Maquat, L.E. 3'READS + RIP defines differential Staufen1 binding to alternative 3'UTR isoforms and reveals structures and sequence motifs influencing binding and polysome association. *RNA* 2020, 26, 1621–1636.
19. Sossin, W.S.; DesGroseillers, L. Intracellular trafficking of RNA in neurons. *Traffic* 2006, 7, 1581–1589.
20. Kohrmann, M.; Luo, M.; Kaether, C.; DesGroseillers, L.; Dotti, C.G.; Kiebler, M.A. Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol. Biol. Cell* 1999, 10, 2945–2953.
21. Ravel-Chapuis, A.; Belanger, G.; Yadava, R.S.; Mahadevan, M.S.; DesGroseillers, L.; Cote, J.; Jasmin, B.J. The RNA-binding protein Staufen1 is increased in DM1 skeletal muscle and promotes alternative pre-mRNA splicing. *J. Cell Biol.* 2012, 196, 699–712.
22. Dugre-Brisson, S.; Elvira, G.; Boulay, K.; Chatel-Chaix, L.; Moulard, A.J.; DesGroseillers, L. Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res.* 2005, 33, 4797–4812.
23. Kim, Y.K.; Furic, L.; Desgroseillers, L.; Maquat, L.E. Mammalian Staufen1 recruits UPF1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* 2005, 120, 195–208.
24. Luo, M.; Duchaine, T.F.; DesGroseillers, L. Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association. *Biochem. J.* 2002, 365, 817–824.
25. Ramos, H.; Monette, A.; Niu, M.; Barrera, A.; Lopez-Ulloa, B.; Fuentes, Y.; Guizar, P.; Pino, K.; DesGroseillers, L.; Moulard, A.J.; et al. The double-stranded RNA-binding protein, Staufen1, is an IRES-transacting factor regulating HIV-1 cap-independent translation initiation. *Nucleic Acids Res.* 2021, 50, 411–429.
26. Sanchez-Carbente, M.; DesGroseillers, L. Understanding the importance of mRNA transport in memory. *Prog. Brain Res.* 2008, 169, 41–58.
27. Heraud-Farlow, J.E.; Sharangdhar, T.; Li, X.; Pfeifer, P.; Tauber, S.; Orozco, D.; Hoermann, A.; Thomas, S.; Bakosova, A.; Farlow, A.R.; et al. Staufen2 Regulates Neuronal Target RNAs. *Cell Rep.* 2013, 5, 1511–1518.
28. Park, E.; Gleghorn, M.L.; Maquat, L.E. Staufen2 functions in Staufen1-mediated mRNA decay by binding to itself and its paralog and promoting UPF1 helicase but not ATPase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2013, 110, 405–412.
29. Almasi, S.; Jasmin, B.J. The multifunctional RNA-binding protein Staufen1: An emerging regulator of oncogenesis through its various roles in key cellular events. *Cell Mol. Life Sci.* 2021, 78, 7145–7160.
30. Luo, W.; Slebos, R.J.; Hill, S.; Li, M.; Brabek, J.; Amanchy, R.; Chaerkady, R.; Pandey, A.; Ham, A.J.; Hanks, S.K. Global impact of oncogenic Src on a phosphotyrosine proteome. *J. Proteome Res.* 2008, 7, 3447–3460.

31. Ghram, M.; Bonnet-Magnaval, F.; Hotea, D.I.; Doran, B.; Ly, S.; DesGroseillers, L. Staufen1 is Essential for Cell-Cycle Transitions and Cell Proliferation Via the Control of E2F1 Expression. *J. Mol. Biol.* 2020, 432, 3881–3897.
32. Lu, J.; Liu, X.; Zheng, J.; Song, J.; Liu, Y.; Ruan, X.; Shen, S.; Shao, L.; Yang, C.; Wang, D.; et al. Lin28A promotes IRF6-regulated aerobic glycolysis in glioma cells by stabilizing SNHG14. *Cell Death Dis* 2020, 11, 447.
33. Ruan, X.; Zheng, J.; Liu, X.; Liu, Y.; Liu, L.; Ma, J.; He, Q.; Yang, C.; Wang, D.; Cai, H.; et al. lncRNA LINC00665 Stabilized by TAF15 Impeded the Malignant Biological Behaviors of Glioma Cells via STAU1-Mediated mRNA Degradation. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 2020, 20, 823–840.
34. Marcellus, K.A.; Crawford Parks, T.E.; Almasi, S.; Jasmin, B.J. Distinct roles for the RNA-binding protein Staufen1 in prostate cancer. *BMC Cancer* 2021, 21, 120.
35. Uhlen, M.; Zhang, C.; Lee, S.; Sjostedt, E.; Fagerberg, L.; Bidkhorji, G.; Benfiteas, R.; Arif, M.; Liu, Z.; Edfors, F.; et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science* 2017, 357, 2507.
36. Jing, F.; Ruan, X.; Liu, X.; Yang, C.; Wang, D.; Zheng, J.; Xue, Y.; Shen, S.; Shao, L.; Yang, Y.; et al. The PABPC5/HCG15/ZNF331 Feedback Loop Regulates Vasculogenic Mimicry of Glioma via STAU1-Mediated mRNA Decay. *Mol. Ther. Oncolytics* 2020, 17, 216–231.
37. Wang, K.; Li, Y.; Wang, J.; Chen, R.; Li, J. A novel 12-gene signature as independent prognostic model in stage IA and IB lung squamous cell carcinoma patients. *Clin. Transl. Oncol.* 2021, 23, 2368–2381.
38. Gyorffy, B.; Surowiak, P.; Budczies, J.; Lanczky, A. Online survival analysis software to assess the prognostic value of biomarkers using transcriptomic data in non-small-cell lung cancer. *PLoS ONE* 2013, 8, e82241.
39. Nagy, A.; Lanczky, A.; Menyhart, O.; Gyorffy, B. Validation of miRNA prognostic power in hepatocellular carcinoma using expression data of independent datasets. *Sci. Rep.* 2018, 8, 9227.
40. Bonnet-Magnaval, F.; Diallo, L.H.; Brunchault, V.; Laugero, N.; Morfoisse, F.; David, F.; Roussel, E.; Nougue, M.; Zamora, A.; Marchaud, E.; et al. High Level of Staufen1 Expression Confers Longer Recurrence Free Survival to Non-Small Cell Lung Cancer Patients by Promoting THBS1 mRNA Degradation. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 23, 215.
41. Boulay, K.; Ghram, M.; Viranaicken, W.; Trepanier, V.; Mollet, S.; Frechina, C.; DesGroseillers, L. Cell cycle-dependent regulation of the RNA-binding protein Staufen1. *Nucleic Acids Res.* 2014, 42, 7867–7883.
42. Damas, N.D.; Marcatti, M.; Come, C.; Christensen, L.L.; Nielsen, M.M.; Baumgartner, R.; Gylling, H.M.; Maglieri, G.; Rundsten, C.F.; Seemann, S.E.; et al. SNHG5 promotes colorectal cancer cell survival by counteracting STAU1-mediated mRNA destabilization. *Nat. Commun.* 2016, 7, 13875.
43. Sakurai, M.; Shiromoto, Y.; Ota, H.; Song, C.Z.; Kossenkov, A.V.; Wickramasinghe, J.; Showe, L.C.; Skordalakes, E.; Tang, H.Y.; Speicher, D.W.; et al. ADAR1 controls apoptosis of stressed cells by inhibiting Staufen1-mediated mRNA decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2017, 24, 534–543.

44. Gandelman, M.; Dansithong, W.; Figueroa, K.P.; Paul, S.; Scoles, D.R.; Pulst, S.M. Staufen 1 amplifies proapoptotic activation of the unfolded protein response. *Cell Death Differ.* 2020, 27, 2942–2951.
45. Su, R.; Ma, J.; Zheng, J.; Liu, X.; Liu, Y.; Ruan, X.; Shen, S.; Yang, C.; Wang, D.; Cai, H.; et al. PABPC1-induced stabilization of BDNF-AS inhibits malignant progression of glioblastoma cells through STAU1-mediated decay. *Cell Death Dis.* 2020, 11, 81.
46. Hassine, S.; Bonnet-MagnaVal, F.; Benoit Bouvrette, L.P.; Doran, B.; Ghram, M.; Bouthillette, M.; Lecuyer, E.; DesGroseillers, L. Staufen1 localizes to the mitotic spindle and controls the localization of RNA populations to the spindle. *J. Cell Sci.* 2020, 133, jcs2471⁵⁵.
47. Martel, C.; Dugre-Brisson, S.; Boulay, K.; Breton, B.; Lapointe, G.; Armando, S.; Trepanier, V.; Duchaine, T.; Bouvier, M.; Desgroseillers, L. Multimerization of Staufen1 in live cells. *RNA* 2010, 16, 585–597.
48. Gleghorn, M.L.; Gong, C.; Kielkopf, C.L.; Maquat, L.E. Staufen1 dimerizes through a conserved motif and a degenerate dsRNA-binding domain to promote mRNA decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013, 20, 515–524.
49. Cicenás, J.; Zalyte, E.; Bairoch, A.; Gaudet, P. Kinases and Cancer. *Cancers* 2018, 10, 63.
50. Bhullar, K.S.; Lagaron, N.O.; McGowan, E.M.; Parmar, I.; Jha, A.; Hubbard, B.P.; Rupasinghe, H.P.V. Kinase-targeted cancer therapies: Progress, challenges and future directions. *Mol. Cancer* 2018, 17, 48.
51. Rao, S.; Hassine, S.; Monette, A.; Amorim, R.; DesGroseillers, L.; Mouland, A.J. HIV-1 requires Staufen1 to dissociate stress granules and to produce infectious viral particles. *RNA* 2019, 25, 727–736.
52. Paul, S.; Dansithong, W.; Figueroa, K.P.; Scoles, D.R.; Pulst, S.M. Staufen1 links RNA stress granules and autophagy in a model of neurodegeneration. *Nat. Commun.* 2018, 9, 3648.
53. Thomas, M.G.; Tosar, L.J.; Desbats, M.A.; Leishman, C.C.; Boccaccio, G.L. Mammalian Staufen 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly. *J. Cell Sci.* 2009, 122, 563–573.

4. Discussion générale

Plusieurs recherches ont montré que STAU1 est un régulateur de l'expression génique à travers ses rôles comme facteur post-transcriptionnel [128, 184, 185]. Malgré tout, il existe peu d'information sur les mécanismes qui expliquent comment s'exerce le contrôle sur les différentes fonctions de la protéine. Avec ces deux publications, nous avons approfondi le mécanisme de dégradation de STAU1 en mitose en découvrant son motif minimal de dégradation situé dans le domaine dsRBD2. Cette découverte nous a permis de déterminer que ce motif est la cible d'au moins deux E3 ubiquitine ligases associées à sa dégradation et suggère des rôles de la protéine dans des mécanismes d'inflammation encore incompris et qui seront intéressants à étudier dans le futur. De plus, nous avons identifié le motif associé au phénotype de ralentissement de la prolifération des cellules transformées en condition de surexpression de STAU1. Ce phénotype préalablement lié au dsRBD2 de STAU1 [90] est maintenant associé directement à une modification phosphomimétique sur la Ser20. De plus, nos études lient le phosphomimétisme de la Ser20 au contrôle de la traduction et de la dégradation des ARNm liés par la protéine. Ainsi, nous élucidons pour la première fois, les motifs et résidus dans le domaine dsRBD2 de STAU1 directement liés à la régulation fine de la protéine pour le contrôle de ses rôles dans différents contextes cellulaires tels que l'inflammation et le cancer.

4.1 Un nouveau motif dans dsRBD2 est à la base de la dégradation de STAU1 par le système APC/C-protéasome 26S

Dans la première publication, nous avons identifié le motif minimal responsable de la polyubiquitination et de la dégradation de STAU1 par le protéasome 26S. STAU1 est partiellement dégradé en mitose, ce qui est la conséquence de son association avec les

co-activateurs de l'APC/C, CDC20 et CDH1 [90]. La découverte du dsRBD2 comme domaine responsable et suffisant de la dégradation de la protéine par ce système abolit l'hypothèse de la contribution d'autres domaines de STAU1 dans la dégradation de la protéine (data non-publiée).

Nous avons déterminé que la dégradation de STAU1 est dépendante d'un motif minimal dans le domaine dsRBD2. Ce motif, composé de la séquence F³⁹PxPxxLxxxxL⁵⁰ (motif FPL), est décrit pour la première fois dans la littérature. Le motif FPL, bien qu'il soit ciblé par les deux co-activateurs de l'APC/C, ne montre aucune similitude de séquence avec les motifs D-box ou KEN-box, qui sont des séquences consensus classiques d'interaction avec CDC20 et CDH1 [71, 72].

4.2 MAP4K1, une protéine qui partage le motif FPL avec STAU1 n'est pas une cible de l'APC/C

Nos études sur MAP4K1, l'une des 15 protéines qui partagent le motif FPL avec STAU1, montrent que son niveau protéique n'est pas affecté par la présence des co-activateurs de l'APC/C, CDC20 ou CDH1. D'ailleurs, aucune des autres 15 protéines qui partagent le motif FPL n'a été identifiée comme une cible de l'APC/C précédemment. Il serait donc intéressant de déterminer l'effet de l'APC/C sur le reste de protéines qui partagent le motif FPL pour mieux élucider le rôle de ce motif dans le contexte du cycle cellulaire et caractériser les circonstances et le contexte dans lequel ce motif est ciblé par l'APC/C. Comme la plupart des protéines qui partagent le motif FPL jouent des rôles dans le contexte de l'inflammation [186-193] et vu que l'APC/C est restreint au cycle cellulaire [48], il est tout à fait possible que l'interaction de cette E3 ligase avec ces protéines soit

limitée ou inexistante en faisant de STAU1 la seule cible de ce système. STAU1, en tant que régulateur du passage G1/S et G2/M du cycle cellulaire et probablement responsable de la distribution équitable des ARNm et de la batterie de traduction à la fin de la mitose, où les complexes CDH1-APC/C et CDC20-APC/C sont actifs [68, 81], serait une cible facile et accessible de ce système de régulation par dégradation.

D'autre part, il est toujours possible que d'autres éléments, comme des modifications post-traductionnelles, contribuent à la reconnaissance du motif FPL de STAU1 par CDC20/CDH1 et que ceux-ci pourraient ne pas être présents à proximité des motifs FPT des autres protéines. Nos études prouvent que dsRBD2 est suffisant pour induire la dégradation de STAU1 via l'APC/C et que les résidus entre les positions 1 et 36 de la protéine n'affectent pas ce mécanisme. Ces résidus contiennent les motifs responsables de l'effet antiprolifératif de Staufen1 en mitose et de sa localisation au FM; ces deux fonctions ne sont donc pas liées à la dégradation de Staufen1 en mitose. Il est, de plus, toujours inconnue pourquoi la dégradation de STAU1 en mitose est partielle [90]. De possibles évènements de phosphorylation, ou autres modifications post-traductionnelles, entre les positions 50 et 88 de STAU1 pourraient être la clé pour résoudre cet imbroglio et expliqueraient pourquoi d'autres protéines qui partagent le motif FPL, telles que MAP4K1, ne sont pas des cibles de l'APC/C.

4.3 Le motif FPL est partagé par des protéines pro- ou anti-inflammatoires ciblées par l'E3 ubiquitine ligase de la réponse immune TRIM25.

En plus de son rôle régulateur dans le cycle cellulaire, des études à haut débit lient STAU1 à la régulation de l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation et la

réponse immunitaire [184]. Par exemple, il a été observé que dans le contexte d'inflammation hépatique le facteur post-transcriptionnel STAU1 favorise la traduction de l'ARNm du facteur inductible d'inflammation NTN1 (netrin-1) [194]. Combiné au fait qu'au moins 10 des 15 protéines qui partagent le motif FPL ont des rôles pro- ou anti- inflammatoires [186-193], nos études appuient l'hypothèse que STAU1 puisse agir comme une protéine régulatrice du processus inflammatoire.

Nous avons observé que le motif FPL de STAU1 est la cible de deux différentes E3 ligases, TRIM25 et l'APC/C. D'autres protéines sont déjà décrites comme cibles de différentes E3 ligases, surtout pour des protéines avec des rôles régulateurs importants pour la survie cellulaire, telles que c-myc [52, 195, 196] et p53 [197-199]. Étant donné la variété des rôles de STAU1 dans la régulation de plusieurs mécanismes cellulaires (cycle cellulaire [90], myogenèse [139], adipogenèse [200]) il n'est pas surprenant de constater que différents mécanismes et complexes protéiques agissent sur la régulation de STAU1. Nous avons découvert TRIM25 comme une autre E3 ubiquitine ligase qui cible le motif FPL de STAU1 et de MAP4K1. Il serait logique que TRIM25 cible également les 14 autres protéines qui partagent ce motif. TRIM25 est une E3 ubiquitine ligase connue pour catalyser la polyubiquitination liée aux K48 et K63, pour la dégradation ou la transduction du signal, respectivement [201, 202]. Cette protéine est impliquée dans le développement, et plus notamment dans la différenciation du cancer et la réponse innée du système immunitaire [202]. Ceci est compatible avec la fonction des cibles au motif FPL identifiées dans notre étude qui participent au processus inflammatoire. Dans notre étude, nous montrons que TRIM25 induit la dégradation de STAU1 et de MAP4K1 probablement via leur polyubiquitination liée à la K48 [201]. Il reste encore à étudier les

signaux particuliers qui induisent ou renforcent cette dégradation, tels que des signaux inflammatoires. En tenant compte du rôle de Staufen1 dans l'activité régulatrice de l'inflammation, nos résultats suggèrent que l'action de TRIM25 pourrait être importante pour la diminution ou la terminaison du processus inflammatoire.

TRIM25 active la voie RIG1 de la réponse innée et participe à la régulation de l'inflammation [201, 203]. Le motif FPL, caractérisée ici pour la première fois comme motif d'interaction de TRIM25, est partagé par des protéines pro- et anti-inflammatoires. La caractérisation de l'interaction du motif FPL de ces protéines avec TRIM25, mettrait cette E3 ligase à la base de la régulation du processus inflammatoire et aiderait à la meilleure compréhension de ce processus. La détermination du type de polyubiquitination sur chacune des protéines pourrait aussi aider à la classification de TRIM25 comme protéine pro- ou anti- inflammatoire ou régulatrice du processus d'inflammation.

TRIM25 et STAU1 sont des protéines de liaison à l'ARN qui sont aussi impliquées dans la réponse d'infection virale [152, 154, 201, 203]. Il serait intéressant d'étudier la relation entre ces protéines dans le contexte d'infection virale ainsi que la possibilité que leur interaction soit médiée par les ARNm cibles communs à ces deux protéines.

4.4 La mutation du motif FPL de STAU1 n'entraîne pas de répercussions sur la prolifération cellulaire

Le niveau d'expression de STAU1 lors du cycle cellulaire est finement régulé et des altérations dans son niveau protéique peuvent mener à des évènements catastrophiques [90, 125]. Entre autres, la surexpression de STAU1 a des effets néfastes sur la prolifération des cellules transformées. Bien que, dans la plupart des cellules

cancéreuses, les niveaux de STAU1 soient élevés [204], les évidences suggèrent que la surexpression de STAU1 dans ce type de cellules déclenche des événements de mort et de ralentissement de la prolifération cellulaire.

Vu que des mutations dans le motif FPL de STAU1 empêchent la dégradation de la protéine par l'APC/C-protéasome 26S, nous supposons que le motif FPL de STAU1 pourrait jouer un rôle dans l'accumulation de la protéine et donc dans l'induction du ralentissement cellulaire. En revanche, l'expression de mutants pour des résidus situés autour le motif FPL de STAU1 mène au même phénotype antiprolifératif (data non montrée). Ces résultats suggèrent que le motif FPL n'est pas à la base de l'effet antiprolifératif de STAU1 en cellules transformées, mais un autre ou autres motifs dans dsRBD2 sont impliqués.

4.5 La surexpression de STAU1 dans des cellules transformées déclenche des événements d'apoptose, puis le ralentissement de la prolifération des cellules survivantes

Nos résultats, ainsi que d'autres publications récentes [90, 91], suggèrent que la régulation de STAU1 est vitale pour l'homéostasie cellulaire. Quand la fine balance de l'expression ou de l'activité de STAU1 est en déséquilibre, les conséquences sont catastrophiques pour les cellules. Ces conséquences semblent associées à la perte de régulation de STAU1 sur la partie du transcriptome qui y est associée [90].

Nous avons aussi été capables de mettre en évidence des événements d'apoptose liés à la surexpression de STAU1. L'apoptose, est perceptible très tôt après la transfection de STAU1 et n'est plus détectable 24 h post-transfection. Nos résultats montrent en fait deux événements cellulaires lors de la surexpression de STAU1, 1) l'apoptose qui est

déclenchée rapidement par l'impossibilité des cellules de réguler ou contrôler ce nouveau niveau d'expression de STAU1 et 2) des défauts à long terme dans la prolifération cellulaire une fois que les cellules s'adaptent aux nouvelles conditions, sans toutefois pouvoir récupérer leur prolifération normale. Dans les cellules qui n'entrent pas en apoptose, nous observons des défauts dans la traduction et/ou la dégradation (SMD) des ARNm dépendants de STAU1. Cette dérégulation des ARNm liés par STAU1 semble être responsable de l'apoptose soudaine et des défauts dans la prolifération cellulaire qui émergent à plus long terme après la surexpression de la protéine.

L'apoptose, par suite de la surexpression de STAU1 dans des cellules transformées, est un évènement partiel et très rapide, ce qui rend difficile sa détection et la détermination du mécanisme qui déclenche ce défaut cellulaire catastrophique. Nous supposons que la dérégulation des ARNm liés par STAU1 est la cause de ces deux évènements cellulaires et que les défauts dans la prolifération cellulaire qui surviennent à l'apoptose sont la conséquence d'un mécanisme d'adaptation cellulaire qui survient après le stress initial, mais il est aussi possible que les cellules survivantes déclenchent une voie de survie entièrement différente de celles qui sont entrées en apoptose. Des études plus approfondies seront nécessaires pour répondre à cette interrogation.

4.6 L'expression du domaine dsRBD2 de STAU1 induit l'apoptose et affecte la prolifération des cellules transformées

Boulay et al 2014 a montré que les défauts de prolifération cellulaire associés à la surexpression de STAU1 en cellules transformées sont directement liés au domaine dsRBD2 de STAU1 [90]. Bien que les dsRBD3 et dsRBD4 de STAU1 aient été les plus

associés aux rôles canoniques de STAU1, les événements d'apoptose et de ralentissement de la prolifération cellulaire à la suite de défauts dans le dsRBD2 mettent en évidence le rôle régulateur de ce domaine et l'importance de ses fonctions. Nous avons montré dans cette étude que dsRBD2 peut déréguler la prolifération cellulaire, en exerçant le contrôle sur la régulation du SMD et de la traduction des ARNm liés à STAU1. La dimérisation de STAU1 est essentielle pour le SMD [126] et nous proposons que dsRBD2 est le domaine régulateur de cette dimérisation, ce qui lui permettrait de contrôler la dégradation des ARNm dépendants de STAU1. Dans ce cas, la diminution du SMD lors d'une expression du dsRBD2 dans la cellule, pourrait être la conséquence de la séquestration de STAU1 endogène par ce domaine. Ceci empêcherait la formation des dimères de STAU1 et les complexes dsRBD2-STAU1 ne contiendraient pas tous les domaines nécessaires (notamment dsRBD3 et dsRBD4) pour accomplir le SMD. Nous proposons des études de co-immunoprécipitation ou d'association (BRET ou FRET) pour caractériser les complexes dsRBD2-STAU1 et ainsi appuyer cette hypothèse.

Le dsRBD2 est connu par ses interactions protéine-protéine. Ce domaine contient le motif FPL d'interaction avec les co-activateurs de l'APC/C, CDC20 et CDH1 [90], le motif pour l'association aux microtubules [125], le motif pour le contrôle de la prolifération cellulaire (Gonzalez et al) et le motif d'association avec la protéine Pr⁵⁵Gag de VIH lors d'infection virale [155]. Nos résultats préliminaires de spectrométrie de masse (data non publiés) sur une lignée cellulaire transformée avec expression du RBD2-YFP ou STAU1⁵⁵-HA₃, montrent l'association de ce domaine avec plusieurs facteurs de la traduction (EF1A1, EF1B, EF1D, EIF5B et autres). Nous suggérons donc, que la régulation de la traduction des ARNm liés par STAU1 se passe à travers dsRBD2 grâce à l'association de ce

domaine avec des facteurs protéiques importantes pour la traduction protéique. Nous proposons que l'expression de dsRBD2 dans la cellule causerait la séquestration de ces facteurs de traduction en menant à un déficit de leur disposition pour la traduction des ARNm liés par STAU1. Des essais d'association du dsRBD2 avec ces facteurs de traduction par immunoprécipitation permettraient d'identifier certains de ces facteurs protéiques. De plus, la comparaison des facteurs protéiques liés au dsRBD2 ou ses différents niveaux d'expression entre cellules transformées et non-transformées pourraient expliquer les différences phénotypiques en présence d'une surexpression de STAU1 dans ces deux types cellulaires.

Aussi, nous suggérons la détection des événements d'apoptose à partir de l'expression du dsRBD2 sur des lignées cellulaires transformées dépourvues de STAU1 par le système CRISPR. Ceci nous permettra de déterminer si les effets observés en présence du dsRBD2 sont dépendants ou non de la présence de STAU1 endogène. Enfin, la confirmation de la capacité du domaine dsRBD2 d'inhiber des fonctions canoniques de STAU1 permettrait l'utilisation de ce domaine comme régulateur des fonctions de la protéine dans des systèmes où sa fonction est dérégulée par surexpression et ouvrirait aussi les portes à la recherche des petites molécules inhibitrices de STAU1 qui mimeraient l'effet de ce domaine, pour promouvoir le ralentissement de la prolifération et l'apoptose des cellules cancéreuses.

4.7 La Ser20 du domaine dsRBD2 de STAU1 est à la base de l'apoptose et du ralentissement de la prolifération des cellules transformées

La phosphorylation comme modification post-transcriptionnelle est utilisée comme méthode de régulation de l'expression et de la fonction protéique. Le compendium de spectrométries de masse sur STAU1 décrit quinze sites de phosphorylation sur la protéine. Mais, si l'on contraint à un minimum de cinq références pour des criblages à haut débit, un total de six sites de phosphorylation sont retrouvés sur l'isoforme STAU1⁶³: S176, S278, Y281, T372, S390 et D494 (Information récoltée de PhosphoSitePlus®, www.phosphosite.org). Les rôles spécifiques de la phosphorylation de STAU1 et la contribution sur la régulation de la protéine sont incompris. De même, les kinases responsables de ces événements restent inconnues.

Cependant, des études préliminaires dans notre laboratoire (data non publiés) ont détecté trois de ces phosphorylations sur STAU1 (S176, Y372 et S390) et suggéré que ces deux dernières modulent l'interaction entre STAU1 et UPF1, ce qui inhiberait le SMD. Nous montrons maintenant que des événements de phosphorylation sur le dsRBD2, plus particulièrement sur la Ser20, régule un phénotype cellulaire. Bien que les spectrométries de masse réalisées pour observer cette modification post-traductionnelle aient été négatives à cause de la non-détection du peptide d'intérêt, nous observons des effets opposés sur l'apoptose et la prolifération des cellules transformées quand les mutants phospho-nuls et phospho-mimétiques de la Ser20 sont exprimés, ce qui suggère que la phosphorylation est à la base de ces effets cellulaires. Le mutant STAU1^{S20D} affecte de façon négative le SMD et la traduction associée à la protéine, de façon similaire au domaine dsRBD2.

Il serait intéressant de poursuivre l'étude des effets de la phosphorylation de STAU1 sur le cycle et la prolifération cellulaires. L'un des aspects les plus importants à étudier serait

la détection directe de la phosphorylation sur la Ser20 de STAU1. Nous recommandons l'utilisation des méthodes alternatives de digestion enzymatique pour la spectrométrie de masse qui permettront la détection du peptide d'intérêt et son état de phosphorylation et nous recommandons aussi d'observer leur variation aux différents stades du cycle et aux conditions cellulaires.

Il faudra aussi faire le point sur la compréhension des évènements et des conditions qui permettent la phosphorylation de la Ser20. Vu que la création des mutants de STAU1 phospho-nuls et phospho-mimétiques de la Ser20 montrent des effets sur le SMD et la traduction complètement opposées, tandis que la surexpression de STAU1 produit des effets moyens, nous proposons que dans des conditions physiologiques STAU1 déploie une phosphorylation partielle. Nous avons étudié la possibilité que la sous-population de STAU1 phosphorylé serait déterminée par sa localisation, mais nous avons conclu que la phosphorylation est indépendante de la localisation de la protéine au fuseau mitotique. Il serait intéressant d'explorer l'état de la Ser20 sur d'autres compartiments intracellulaires qui sont aussi enrichis de STAU1 (ex. le noyau).

Il serait aussi important de découvrir la kinase responsable de cet évènement. L'une des causes les plus importantes pour le développement et la progression du cancer est la mutation des différents gènes codant des kinases. Des mutants de kinases qui deviennent constitutivement actives peuvent provoquer diverses anomalies cellulaires, conduisant à l'initiation ou à la croissance du cancer. Il existe alors une forte possibilité que la kinase responsable de la phosphorylation de la Ser20 de STAU1 soit mutée et différemment active en cellules normales ou cancéreuses et que comme conséquence les stades de phosphorylation de STAU1 soient différents entre ces cellules, ce qui

justifierait les différents effets de la surexpression de STAU1 selon le type cellulaire. En suivant cette logique, il serait possible que la surexpression de STAU1 dans les cellules non transformées n'ait pas de phénotype associé à cause d'une régulation de l'activation de kinase responsable de la phosphorylation de la Ser20, ce qui limite l'activité de STAU1. Cette hypothèse pourrait être validée si des expériences avec l'expression du mutant STAU1^{S20D} sur des cellules non transformées arrivent à reproduire l'effet de ralentissement de la prolifération cellulaire.

L'expression des mutants phospho-nul et phospho-mimétiques de la Ser20 dans des cellules transformées montrent des réponses différentes par rapport à la prolifération cellulaire; tandis que le mutant STAU1^{S20D} ralentit la prolifération, le mutant STAU1^{S20A} ne semble pas avoir d'effet. De façon intéressante, les phospho-mutants de la Thr21, qui montrent aussi des patrons de prolifération différents, se manifestent de manière contraire à ceux observés pour la Ser20. En effet, l'expression du mutant STAU1^{T21A} ralentit la prolifération cellulaire. Puisque Ser20 et Thr21 sont deux acides aminés consécutifs, nous postulons que les événements de phosphorylation sur ces résidus se présentent en alternance. Pour valider notre hypothèse, il serait nécessaire d'étudier d'abord les effets des mutants de la Thr21 sur la SMD et la traduction dans le but de déterminer si les deux résidus sont impliqués dans le même mécanisme. Il serait aussi intéressant de déterminer la présence de phosphorylation sur ce résidu par des méthodes directes, ex. spectrométrie de masse.

5. Perspectives

Boulay K et al en 2014 [90] ont montré que, dans les cellules transformées cancéreuses HCT116, le niveau de STAU1 diminue partiellement à la fin du cycle cellulaire. Cette dégradation a été liée à l'interaction entre le domaine dsRBD2 de STAU1 et les coactivateurs de l'APC/C. La diminution partielle de STAU1 en mitose était reproductible dans les cellules HEK293T et U2OS. De même, le défaut de prolifération des cellules qui surexpriment STAU1 est observé dans les trois lignées cellulaires étudiées. Vu la reproductibilité des résultats obtenus, nous avons poursuivi nos études principalement dans la lignée HEK293T notamment lorsque des niveaux élevés de transfection étaient nécessaires. A long terme, nous pensons qu'il serait important de cibler nos études sur la compréhension de la dégradation partielle de STAU1 par l'APC/C. Il a été postulé que d'autres modifications post-traductionnelles, des facteurs protéiques associés ou bien la localisation subcellulaire de STAU1 déterminent la fraction protéique ciblée pour la dégradation via l'APC/C [90], mais à date ce mécanisme reste inconnu. De plus, il serait intéressant d'approfondir le rôle de STAU1 et la régulation de son niveau d'expression dans un contexte inflammatoire, ce qui pourrait faire la lumière sur les causes et conséquences de sa régulation via TRIM25.

Dans notre étude, nous avons retrouvé des E3 ligases à proximité de STAU1 grâce à des essais de BIOID2 et de TurboID. Pour réussir la biotinylation des protéines à proximité de STAU1, le système BIOID2 a besoin d'un temps d'incubation avec la biotine de 16h, ce qui empêche la recherche des facteurs associés à STAU1 dans des phases spécifiques. Nous avons donc utilisé en parallèle le système TurboID, ce qui permet le marquage des protéines à proximité dans un laps de temps aussi court que 3h, ce qui nous a permis de synchroniser les cellules à des phases spécifiques du cycle cellulaire

(G1/S et mitose). Bien que le TurboID permette un temps d'incubation plus court, ce système a été reporté toxique pour les cellules de mammifères [205], alors il est possible que certaines interactions protéiques avec STAU1 soient causées par des conditions de stress cellulaires. De plus, dans les deux systèmes utilisés, il est probable que la biotinylation marque, non seulement des interactants directs de STAU1 mais aussi des protéines à proximité de de STAU1. Nous avons utilisé la YFP étiquetée avec les biotine-ligases comme contrôle négatif pour identifier les faux positifs dus au stress ou au hasard. Nous avons d'abord exprimé STAU1-BIOID2/TurboID dans les cellules cancéreuses HCT116 pour identifier les protéines à proximité. Cependant, l'analyse en spectrométrie de masse n'a montré que quelques hits (4) pour STAU1 (dimérisation) et aucun pour la protéine associée UPF1. Il est rapporté que la surexpression de STAU1 dans ces cellules cancéreuses affecte leur prolifération et induit l'apoptose [90]. Nous proposons que cette mort cellulaire due à l'expression du vecteur STAU1-BIOID/TurboID nous empêche de conclure et d'identifier les protéines à proximité. Nous avons donc utilisé la lignée non-transformée hTERT-RPE1 qui tolère la surexpression de STAU1. Ce changement nous a permis d'identifier plusieurs hits sur STAU1, sur UPF1 et les protéines à proximité telles que TRIM25. Nous avons par la suite confirmé l'interaction de TRIM25 avec STAU1 dans le lignée HEK293T utilisée dans nos études, ce qui confirme la validité de nos résultats. Nous suggérons des études sur des lignées non cancéreuses et cancéreuses primaires pour confirmer la présence de régulation de STAU1 par dégradation partielle dans la mitose, tel qu'observé dans les HCT116 et les HEK293T.

Dans la construction de ce système, nous avons ajouté les étiquettes BIOID2 et TurboID au C-terminal de STAU1 pour garder la flexibilité du RBD2 (au N-terminal), mais la

distance entre ce domaine et la biotine ligase pourrait nous avoir fait échapper quelques interactions transitoires ou éloignées du C-terminal de STAU1. Vu que le RBD2 est suffisant pour la dégradation de la protéine, nous proposons de réaliser cet essai avec ce domaine et raccourcir la distance entre la biotine ligase et les interactions d'intérêt.

Nous avons confirmé que le motif FPL de dégradation minimale de STAU1 par l'APC/C est aussi la cible de TRIM25 pour sa dégradation. MAP4K1, qui partage le motif FPL, est aussi ciblé pour sa dégradation via TRIM25. Les déterminants ou conditions qui empêchent la dégradation de MAP4K1 par l'APC/C restent encore inconnus. Le motif FPL est partagé par 15 autres protéines dont 12 sont impliqués dans le processus inflammatoire [186-193]. Cependant, ces protéines n'ont pas été rapportées comme cibles potentielles de TRIM25 et d'autres n'ont pas été suffisamment étudiées pour proposer des rôles dans le mécanisme proposé. Des études plus approfondies seront nécessaires pour déterminer si le motif FPL découvert dans ces protéines est une cible de l'APC/C ou de TRIM25, sous quelles conditions spécifiques l'interaction avec les ubiquitines ligases est activée et les conséquences de ces interactions dans le processus inflammatoire et/ou le cycle cellulaire.

La surexpression de STAU1 n'affecte pas la prolifération des lignées non cancéreuses hTERT-RPE1 ou IMR90, par contre, ceci induit un ralentissement de la prolifération cellulaire dans les lignés HEK293T, HCT116 et U2OS [90]. Nous avons donc poursuivi nos études pour la recherche des déterminants responsables de l'effet antiprolifératif de STAU1 dans des cellules HEK293T, principalement lorsque le niveau de transfection doit être élevé. Pour les essais qui permettent une expression permanente des protéines, nous avons utilisé des cellules HCT116. La prochaine étape de cette recherche serait de

reproduire ces résultats dans des lignées primaires cancéreuses pour, après, avancer sur des essais dans des modèles animaux de cancer.

Malgré des essais réitérés, la spectrométrie de masse a échoué dans la détection du peptide qui contient la Ser20, ce qui nous a empêché de confirmer la phosphorylation ou non de la Ser20. Pour pouvoir conclure sur la phosphorylation ou non de la S20, il faudrait mettre au point une technique pour générer efficacement le peptide qui contient ce résidu pour être détecté par spectrométrie de masse. Il est possible que la méthylation observée des deux résidus arginines qui flanquent le peptide préviennent sa coupure efficace. Nous avons analysé d'autres digestions théoriques possibles et conclu que le résultat serait similaire.

Comme alternative, nous avons essayé le gel phospho-tag, Dans les résultats préliminaires (n=1), nous avons observé la phosphorylation des domaines dsRBD2 WT, dsRBD2 S20A et dsRBD2 S20D. Il semble donc qu'il existe plus d'une phosphorylation dans le domaine, fait qui nous empêche de confirmer la présence de phosphorylation spécifiquement sur S20. Il faut aussi noter que nos résultats suggèrent que la Thr21 pourrait aussi être phosphorylée et que cette phosphorylation a des effets opposés à ceux de la phosphorylation de la Ser20. Tyr22 et Tyr24 pourraient aussi être phosphorylées.

Pour résoudre le problème, nous pourrions miser sur le fait que S20 est près de l'extrémité terminale et utiliser une technique classique. STAU1 contient plusieurs sites d'initiation alternatif, ce qui nous permet d'exprimer le mutant delta 17 (La méthionine en 18). Pour cette raison nous proposons la méthode de dégradation d'Edman après marquage radioactif et purification de la protéine pour détecter la phosphorylation de la

Ser20 ainsi que de la Thr21, Tyr22 et Tyr24. Il serait intéressant de purifier la protéine aux différents moments de cycle cellulaire et sous différentes conditions de stress pour déterminer la quantité relative des résidus phosphorylés.

6. Conclusion

Le rôle régulateur du dsRBD2 sur les fonctions du facteur post-transcriptionnel STAU1 est illustré dans les deux articles scientifiques présentés. Nous avons découvert et caractérisé des motifs spécifiques dans le dsRBD2 de STAU1 qui permettent le contrôle du niveau protéique de STAU1 lors du cycle cellulaire, de l'inflammation et du cancer et la régulation fine des fonctions de STAU1 comme facteur post-transcriptionnel. Le domaine dsRBD2 de STAU1 est le point de convergence de notre étude.

Le motif FPL dans dsRBD2 garantit la dégradation contrôlée de STAU1 dans le cycle cellulaire via son interaction avec les coactivateurs de l'APC/C, la polyubiquitination de la protéine et sa dégradation subséquente par le protéasome 26S. Ce même motif est la cible de TRIM25, une E3 ligase probablement impliquée dans la régulation fine de STAU1 comme régulateur du signal inflammatoire. Ce motif, sous l'influence de TRIM25 contrôle également le niveau ou l'activation de 15 autres protéines. Pour approfondir cette étude, nous proposons la caractérisation du rôle de TRIM25 sur ces protéines, plus particulièrement la découverte du type d'interaction et d'ubiquitination qui est déclenché par cette E3 ligase et les conséquences de ces signaux dans le processus inflammatoire. Une meilleure compréhension du rôle du motif FPL nous permettra de déterminer sa valeur comme cible d'études contre le cancer et les processus inflammatoires.

Le dsRBD2 est également à la base de l'effet antiprolifératif de la protéine lors de la surexpression de STAU1 dans des cellules transformées. Nos études indiquent que le mécanisme moléculaire qui déclenche cet effet est la conséquence des modifications du rôle post-transcriptionnel de STAU1 par des événements de phosphorylation de la serine 20 dans le dsRBD2. Ce changement dans la traduction et la dégradation des ARNm liés à STAU1 mènent la cellule à favoriser des événements d'apoptose et induit des défauts

de prolifération cellulaire. Basé sur ces résultats, nous proposons que STAU1 puisse être une cible thérapeutique contre le cancer. Nous proposons d'effectuer des études qui mèneraient à la découverte de(s) kinase(s) impliquées dans la phosphorylation de la serine 20 et les mécanismes par lesquels la phosphorylation modifie l'interaction de dsRBD2 avec d'autres protéines, notamment des facteurs traductionnels, et/ou l'homodimérisation de STAU1. Ceci permettra de mieux cibler le mécanisme par lequel la protéine affecte la prolifération des cellules cancéreuses.

Le dsRBD2 de STAU1 garantit le contrôle fin du niveau protéique et des fonctions moléculaires de la protéine. Nous suggérons de continuer l'étude des interactions protéiques et/ou nucléiques du dsRBD2 et les mécanismes moléculaires impliqués dans le but de déterminer la meilleure voie de régulation de STAU1. Nous pensons que cibler la régulation de STAU1 et de ses fonctions situées dans son domaine dsRBD2, serait important dans l'étude des maladies qui impliquent des événements d'apoptose, d'inflammation et de prolifération cellulaire.

7. Bibliographie

1. Canman, J.C. and C. Cabernard, *Mechanics of cell division and cytokinesis*. Mol Biol Cell, 2018. **29**(6): p. 685-686.
2. Pardee, A.B., et al., *Animal cell cycle*. Annu Rev Biochem, 1978. **47**: p. 715-50.
3. Nurse, P., Y. Masui, and L. Hartwell, *Understanding the cell cycle*. Nat Med, 1998. **4**(10): p. 1103-6.
4. Pardee, A.B., *A restriction point for control of normal animal cell proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1974. **71**(4): p. 1286-90.
5. Rubin, S.M., J. Sage, and J.M. Skotheim, *Integrating Old and New Paradigms of G1/S Control*. Mol Cell, 2020. **80**(2): p. 183-192.
6. Chung, M., et al., *Transient Hysteresis in CDK4/6 Activity Underlies Passage of the Restriction Point in G1*. Mol Cell, 2019. **76**(4): p. 562-573.e4.
7. Satyanarayana, A. and P. Kaldis, *Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms*. Oncogene, 2009. **28**(33): p. 2925-39.
8. Müller, S., et al., *The oncofetal RNA-binding protein IGF2BP1 is a druggable, post-transcriptional super-enhancer of E2F-driven gene expression in cancer*. Nucleic Acids Res, 2020. **48**(15): p. 8576-8590.
9. Inoshita, S., et al., *Regulation of the G1/S transition phase in mesangial cells by E2F1*. Kidney Int, 1999. **56**(4): p. 1238-41.
10. Mercadante, A.A., M. Dimri, and S.S. Mohiuddin, *Biochemistry, Replication and Transcription, in StatPearls*. 2023, StatPearls Publishing

Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Manjari Dimri declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Shamim Mohiuddin declares no relevant financial relationships with ineligible companies.

11. Saldivar, J.C., et al., *An intrinsic S/G(2) checkpoint enforced by ATR*. Science, 2018. **361**(6404): p. 806-810.
12. Crosby, M.E., *Cell Cycle: Principles of Control*. Yale J Biol Med. 2007 Sep;80(3):141-2. Epub 2008 Feb.
13. Burakov, A.V. and E.S. Nadezhdina, *Centering and Shifting of Centrosomes in Cells*. Cells, 2020. **9**(6).
14. Bornens, M., *The centrosome in cells and organisms*. Science, 2012. **335**(6067): p. 422-6.
15. Kapoor, T.M., *Metaphase Spindle Assembly*. Biology (Basel), 2017. **6**(1).
16. Castedo, M., et al., *Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2825-37.
17. Lara-Gonzalez, P., F.G. Westhorpe, and S.S. Taylor, *The spindle assembly checkpoint*. Curr Biol, 2012. **22**(22): p. R966-80.
18. Murray, A., *Cell cycle checkpoints*. Curr Opin Cell Biol, 1994. **6**(6): p. 872-6.
19. Uzunova, K., et al., *APC15 mediates CDC20 autoubiquitylation by APC/C(MCC) and disassembly of the mitotic checkpoint complex*. Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(11): p. 1116-23.
20. Clarke, D.J., L.A. Díaz-Martínez, and J.F. Giménez-Abián, *Anaphase promoting complex or cyclosome? Cell Cycle*, 2005. **4**(11): p. 1585-92.
21. Bochis, O.V., et al., *The Importance of Ubiquitin E3 Ligases, SCF and APC/C, in Human Cancers*. Clujul Med, 2015. **88**(1): p. 9-14.
22. Chan, G.K. and T.J. Yen, *The mitotic checkpoint: a signaling pathway that allows a single unattached kinetochore to inhibit mitotic exit*. Prog Cell Cycle Res, 2003. **5**: p. 431-9.
23. Yu, J., et al., *Structural basis of human separase regulation by securin and CDK1-cyclin B1*. Nature, 2021. **596**(7870): p. 138-142.

24. Guertin, D.A., S. Trautmann, and D. McCollum, *Cytokinesis in eukaryotes*. Microbiol Mol Biol Rev, 2002. **66**(2): p. 155-78.
25. Jamasbi, E., et al., *The cell cycle, cancer development and therapy*. Mol Biol Rep, 2022. **49**(11): p. 10875-10883.
26. Bertoli, C., J.M. Skotheim, and R.A. de Bruin, *Control of cell cycle transcription during G1 and S phases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. **14**(8): p. 518-28.
27. Hanks, S.K., A.M. Quinn, and T. Hunter, *The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains*. Science, 1988. **241**(4861): p. 42-52.
28. Morgan, D.O., *Principles of CDK regulation*. Nature, 1995. **374**(6518): p. 131-4.
29. Glotzer, M., A.W. Murray, and M.W. Kirschner, *Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway*. Nature, 1991. **349**(6305): p. 132-8.
30. Kozar, K. and P. Sicinski, *Cell cycle progression without cyclin D-CDK4 and cyclin D-CDK6 complexes*. Cell Cycle, 2005. **4**(3): p. 388-91.
31. Li, L., et al., *The E2F transcription factor 2: What do we know?* Biosci Trends, 2021. **15**(2): p. 83-92.
32. Roskoski, R., Jr., *Cyclin-dependent protein serine/threonine kinase inhibitors as anticancer drugs*. Pharmacol Res, 2019. **139**: p. 471-488.
33. Zetterberg, A., O. Larsson, and K.G. Wiman, *What is the restriction point?* Curr Opin Cell Biol, 1995. **7**(6): p. 835-42.
34. Chu, C., et al., *Cyclin E in normal physiology and disease states*. Trends Cell Biol, 2021. **31**(9): p. 732-746.
35. Lim, S. and P. Kaldis, *Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation*. Development, 2013. **140**(15): p. 3079-93.
36. King, R.W., et al., *A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B*. Cell, 1995. **81**(2): p. 279-88.
37. Hershko, A., et al., *Methylated ubiquitin inhibits cyclin degradation in clam embryo extracts*. J Biol Chem, 1991. **266**(25): p. 16376-9.
38. Komander, D., *The emerging complexity of protein ubiquitination*. Biochem Soc Trans, 2009. **37**(Pt 5): p. 937-53.
39. Park, C.W. and K.Y. Ryu, *Cellular ubiquitin pool dynamics and homeostasis*. BMB Rep, 2014. **47**(9): p. 475-82.
40. Swatek, K.N. and D. Komander, *Ubiquitin modifications*. Cell Res, 2016. **26**(4): p. 399-422.
41. Tracz, M. and W. Bialek, *Beyond K48 and K63: non-canonical protein ubiquitination*. Cell Mol Biol Lett, 2021. **26**(1): p. 1.
42. Verma, R., *Exploiting Ubiquitin Ligases for Induced Target Degradation as an Antiviral Strategy*. Adv Exp Med Biol, 2021. **1322**: p. 339-357.
43. Song, L. and Z.Q. Luo, *Post-translational regulation of ubiquitin signaling*. J Cell Biol, 2019. **218**(6): p. 1776-1786.
44. Toma-Fukai, S. and T. Shimizu, *Structural Diversity of Ubiquitin E3 Ligase*. Molecules, 2021. **26**(21).
45. Barghout, S.H. and A.D. Schimmer, *E1 Enzymes as Therapeutic Targets in Cancer*. Pharmacol Rev, 2021. **73**(1): p. 1-58.
46. Morreale, F.E. and H. Walden, *Types of Ubiquitin Ligases*. Cell, 2016. **165**(1): p. 248-248 e1.
47. Nguyen, K.M. and L. Busino, *The Biology of F-box Proteins: The SCF Family of E3 Ubiquitin Ligases*. Adv Exp Med Biol, 2020. **1217**: p. 111-122.
48. Yamano, H., *APC/C: current understanding and future perspectives*. F1000Res, 2019. **8**.
49. Lorick, K.L., et al., *RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11364-9.

50. Nelson, D.E., S.J. Randle, and H. Laman, *Beyond ubiquitination: the atypical functions of Fbxo7 and other F-box proteins*. Open Biol, 2013. **3**(10): p. 130131.
51. Randle, S.J. and H. Laman, *F-box protein interactions with the hallmark pathways in cancer*. Semin Cancer Biol, 2016. **36**: p. 3-17.
52. Cepeda, D., et al., *CDK-mediated activation of the SCF(FBXO) (28) ubiquitin ligase promotes MYC-driven transcription and tumorigenesis and predicts poor survival in breast cancer*. EMBO Mol Med, 2013. **5**(7): p. 1067-86.
53. Sudakin, V., et al., *The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis*. Mol Biol Cell, 1995. **6**(2): p. 185-97.
54. Zachariae, W., et al., *Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: identification of a subunit related to cullins*. Science, 1998. **279**(5354): p. 1216-9.
55. Yu, H., et al., *Identification of a cullin homology region in a subunit of the anaphase-promoting complex*. Science, 1998. **279**(5354): p. 1219-22.
56. Kramer, K.M., et al., *Budding yeast RSI1/APC2, a novel gene necessary for initiation of anaphase, encodes an APC subunit*. EMBO J, 1998. **17**(2): p. 498-506.
57. Gmachl, M., et al., *The RING-H2 finger protein APC11 and the E2 enzyme UBC4 are sufficient to ubiquitinate substrates of the anaphase-promoting complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 8973-8.
58. Garnett, M.J., et al., *UBE2S elongates ubiquitin chains on APC/C substrates to promote mitotic exit*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(11): p. 1363-9.
59. Peters, J.M., *The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond*. Mol Cell, 2002. **9**(5): p. 931-43.
60. Schreiber, A., et al., *Structural basis for the subunit assembly of the anaphase-promoting complex*. Nature, 2011. **470**(7333): p. 227-32.
61. Greil, C., M. Engelhardt, and R. Wäsch, *The Role of the APC/C and Its Coactivators Cdh1 and Cdc20 in Cancer Development and Therapy*. Front Genet, 2022. **13**: p. 941565.
62. Clute, P. and J. Pines, *Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(2): p. 82-7.
63. Buschhorn, B.A., et al., *Substrate binding on the APC/C occurs between the coactivator Cdh1 and the processivity factor Doc1*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(1): p. 6-13.
64. Wäsch, R. and F.R. Cross, *APC-dependent proteolysis of the mitotic cyclin Clb2 is essential for mitotic exit*. Nature, 2002. **418**(6897): p. 556-62.
65. Jin, L., et al., *Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex*. Cell, 2008. **133**(4): p. 653-65.
66. Peng, H., et al., *The ubiquitin-specific protease USP8 directly deubiquitinates SQSTM1/p62 to suppress its autophagic activity*. Autophagy, 2020. **16**(4): p. 698-708.
67. Rape, M., S.K. Reddy, and M.W. Kirschner, *The processivity of multiubiquitination by the APC determines the order of substrate degradation*. Cell, 2006. **124**(1): p. 89-103.
68. Visintin, R., S. Prinz, and A. Amon, *CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis*. Science, 1997. **278**(5337): p. 460-3.
69. Kramer, E.R., et al., *Activation of the human anaphase-promoting complex by proteins of the CDC20/Fizzy family*. Curr Biol, 1998. **8**(22): p. 1207-10.
70. Kraft, C., et al., *The WD40 propeller domain of Cdh1 functions as a destruction box receptor for APC/C substrates*. Mol Cell, 2005. **18**(5): p. 543-53.
71. Pfleger, C.M. and M.W. Kirschner, *The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1*. Genes Dev, 2000. **14**(6): p. 655-65.

72. Yamano, H., et al., *The role of the destruction box and its neighbouring lysine residues in cyclin B for anaphase ubiquitin-dependent proteolysis in fission yeast: defining the D-box receptor*. EMBO J, 1998. **17**(19): p. 5670-8.
73. Min, M., U. Mayor, and C. Lindon, *Ubiquitination site preferences in anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C) substrates*. Open Biol, 2013. **3**(9): p. 130097.
74. Lin, M.L. and K.M. Sakamoto, *p55Cdc/cdc20 overexpression promotes early g1/s transition in myeloid cells*. Stem Cells, 2001. **19**(3): p. 205-11.
75. Fujimitsu, K., M. Grimaldi, and H. Yamano, *Cyclin-dependent kinase 1-dependent activation of APC/C ubiquitin ligase*. Science, 2016. **352**(6289): p. 1121-4.
76. Yudkovsky, Y., et al., *Phosphorylation of Cdc20/fizzy negatively regulates the mammalian cyclosome/APC in the mitotic checkpoint*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **271**(2): p. 299-304.
77. Shteinberg, M., et al., *Phosphorylation of the cyclosome is required for its stimulation by Fizzy/cdc20*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **260**(1): p. 193-8.
78. Fang, G., H. Yu, and M.W. Kirschner, *Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1*. Mol Cell, 1998. **2**(2): p. 163-71.
79. Shevah-Sitry, D., et al., *Role of phosphorylation of Cdc20 in the regulation of the action of APC/C in mitosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022. **119**(35): p. e2210367119.
80. Izawa, D. and J. Pines, *Mad2 and the APC/C compete for the same site on Cdc20 to ensure proper chromosome segregation*. J Cell Biol, 2012. **199**(1): p. 27-37.
81. Hagting, A., et al., *Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1*. J Cell Biol, 2002. **157**(7): p. 1125-37.
82. Burton, J.L., V. Tsakraklides, and M.J. Solomon, *Assembly of an APC-Cdh1-substrate complex is stimulated by engagement of a destruction box*. Mol Cell, 2005. **18**(5): p. 533-42.
83. Irniger, S. and K. Nasmyth, *The anaphase-promoting complex is required in G1 arrested yeast cells to inhibit B-type cyclin accumulation and to prevent uncontrolled entry into S-phase*. J Cell Sci, 1997. **110** (Pt 13): p. 1523-31.
84. Ondracka, A., J.A. Robbins, and F.R. Cross, *An APC/C-Cdh1 Biosensor Reveals the Dynamics of Cdh1 Inactivation at the G1/S Transition*. PLoS One, 2016. **11**(7): p. e0159166.
85. van Leuken, R., L. Clijsters, and R. Wolthuis, *To cell cycle, swing the APC/C*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1786**(1): p. 49-59.
86. Tanenbaum, M.E., et al., *Regulation of mRNA translation during mitosis*. Elife, 2015. **4**.
87. Cho, R.J., et al., *Transcriptional regulation and function during the human cell cycle*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 48-54.
88. Blackinton, J.G. and J.D. Keene, *Post-transcriptional RNA regulons affecting cell cycle and proliferation*. Semin Cell Dev Biol, 2014. **34**: p. 44-54.
89. Dugre-Brisson, S., et al., *Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(15): p. 4797-812.
90. Boulay, K., et al., *Cell cycle-dependent regulation of the RNA-binding protein Staufen1*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(12): p. 7867-83.
91. Ghram, M., et al., *Staufen1 is Essential for Cell-Cycle Transitions and Cell Proliferation Via the Control of E2F1 Expression*. J Mol Biol, 2020. **432**(13): p. 3881-3897.
92. Keene, J.D., *RNA regulons: coordination of post-transcriptional events*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(7): p. 533-43.
93. Corley, M., M.C. Burns, and G.W. Yeo, *How RNA-Binding Proteins Interact with RNA: Molecules and Mechanisms*. Mol Cell, 2020. **78**(1): p. 9-29.
94. St Johnston, D., et al., *A conserved double-stranded RNA-binding domain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(22): p. 10979-83.

95. Masliah, G., P. Barraud, and F.H. Allain, *RNA recognition by double-stranded RNA binding domains: a matter of shape and sequence*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(11): p. 1875-95.
96. Maris, C., C. Dominguez, and F.H. Allain, *The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression*. Febs j, 2005. **272**(9): p. 2118-31.
97. Gleghorn, M.L. and L.E. Maquat, *'Black sheep' that don't leave the double-stranded RNA-binding domain fold*. Trends Biochem Sci, 2014. **39**(7): p. 328-40.
98. Heber, S., et al., *Staufen2-mediated RNA recognition and localization requires combinatorial action of multiple domains*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 1659.
99. Ferrandon, D., et al., *Staufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner*. Cell, 1994. **79**(7): p. 1221-32.
100. Schupbach, T. and E. Wieschaus, *Germline autonomy of maternal-effect mutations altering the embryonic body pattern of Drosophila*. Dev Biol, 1986. **113**(2): p. 443-8.
101. Ferrandon, D., et al., *RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3' UTR-STAU-FEN ribonucleoprotein particles*. Embo j, 1997. **16**(7): p. 1751-8.
102. Matsuzaki, F., et al., *miranda localizes stau-fen and prospero asymmetrically in mitotic neuroblasts and epithelial cells in early Drosophila embryogenesis*. Development, 1998. **125**(20): p. 4089-98.
103. Roegiers, F. and Y.N. Jan, *Staufen: a common component of mRNA transport in oocytes and neurons?* Trends Cell Biol, 2000. **10**(6): p. 220-4.
104. Micklem, D.R., et al., *Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation*. Embo j, 2000. **19**(6): p. 1366-77.
105. Ramos, A., et al., *RNA recognition by a Staufen double-stranded RNA-binding domain*. Embo j, 2000. **19**(5): p. 997-1009.
106. Broadus, J., S. Fuerstenberg, and C.Q. Doe, *Staufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate*. Nature, 1998. **391**(6669): p. 792-5.
107. Dubnau, J., et al., *The stau-fen/pumilio pathway is involved in Drosophila long-term memory*. Curr Biol, 2003. **13**(4): p. 286-96.
108. Buchner, G., et al., *Identification of a novel homolog of the Drosophila stau-fen protein in the chromosome 8q13-q21.1 region*. Genomics, 1999. **62**(1): p. 113-8.
109. DesGroseillers, L. and N. Lemieux, *Localization of a human double-stranded RNA-binding protein gene (STAU) to band 20q13.1 by fluorescence in situ hybridization*. Genomics, 1996. **36**(3): p. 527-9.
110. Wickham, L., et al., *Mammalian stau-fen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(3): p. 2220-30.
111. Furic, L., M. Maher-Laporte, and L. DesGroseillers, *A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes*. RNA, 2008. **14**(2): p. 324-35.
112. Duchaine, T.F., et al., *Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 16): p. 3285-95.
113. Macchi, P., et al., *The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2: nucleolar accumulation and isoform-specific exportin-5-dependent export*. J Biol Chem, 2004. **279**(30): p. 31440-4.
114. Martel, C., et al., *Staufen1 is imported into the nucleolus via a bipartite nuclear localization signal and several modulatory determinants*. Biochem J, 2006. **393**(Pt 1): p. 245-54.
115. Tang, S.J., et al., *A role for a rat homolog of stau-fen in the transport of RNA to neuronal dendrites*. Neuron, 2001. **32**(3): p. 463-75.
116. Ramasamy, S., et al., *Zebrafish Staufen1 and Staufen2 are required for the survival and migration of primordial germ cells*. Dev Biol, 2006. **292**(2): p. 393-406.

117. Cockburn, D.M., et al., *The double-stranded RNA-binding protein Staufen 2 regulates eye size*. Mol Cell Neurosci, 2012. **51**(3-4): p. 101-11.
118. Takahashi, K., K. Ishii, and M. Yamashita, *Staufen1, Kinesin1 and microtubule function in cyclin B1 mRNA transport to the animal polar cytoplasm of zebrafish oocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2018. **503**(4): p. 2778-2783.
119. Vessey, J.P., et al., *A loss of function allele for murine Staufen1 leads to impairment of dendritic Staufen1-RNP delivery and dendritic spine morphogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(42): p. 16374-9.
120. Bradshaw, K.D., N.J. Emptage, and T.V. Bliss, *A role for dendritic protein synthesis in hippocampal late LTP*. Eur J Neurosci, 2003. **18**(11): p. 3150-2.
121. Tiedge, H. and J. Brosius, *Translational machinery in dendrites of hippocampal neurons in culture*. J Neurosci, 1996. **16**(22): p. 7171-81.
122. Lebeau, G., et al., *Staufen 2 regulates mGluR long-term depression and Map1b mRNA distribution in hippocampal neurons*. Learn Mem, 2011. **18**(5): p. 314-26.
123. Fa-Hui, N., et al., *Characterization of a novel transcript variant of human STAU1 gene*. Acta Biochim Pol, 2008. **55**(3): p. 473-8.
124. Bonnet-Magnaval, F., et al., *Hypoxia and ER stress promote Staufen1 expression through an alternative translation mechanism*. Biochem Biophys Res Commun, 2016. **479**(2): p. 365-371.
125. Hassine, S., et al., *Staufen1 localizes to the mitotic spindle and controls the localization of RNA populations to the spindle*. J Cell Sci, 2020. **133**(14).
126. Gleghorn, M.L., et al., *Staufen1 dimerizes through a conserved motif and a degenerate dsRNA-binding domain to promote mRNA decay*. Nat Struct Mol Biol, 2013. **20**(4): p. 515-24.
127. Peredo, J., et al., *Human Staufen1 associates to miRNAs involved in neuronal cell differentiation and is required for correct dendritic formation*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e113704.
128. Park, E. and L.E. Maquat, *Staufen-mediated mRNA decay*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2013. **4**(4): p. 423-35.
129. Lazzaretti, D., et al., *The crystal structure of Staufen1 in complex with a physiological RNA sheds light on substrate selectivity*. Life Sci Alliance, 2018. **1**(5): p. e201800187.
130. Park, E., M.L. Gleghorn, and L.E. Maquat, *Staufen2 functions in Staufen1-mediated mRNA decay by binding to itself and its paralog and promoting UPF1 helicase but not ATPase activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(2): p. 405-12.
131. Jeck, W.R., et al., *Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats*. Rna, 2013. **19**(2): p. 141-57.
132. Ricci, E.P., et al., *Staufen1 senses overall transcript secondary structure to regulate translation*. Nat Struct Mol Biol, 2014. **21**(1): p. 26-35.
133. Ramos, H., et al., *The double-stranded RNA-binding protein, Staufen1, is an IRES-transacting factor regulating HIV-1 cap-independent translation initiation*. Nucleic Acids Res, 2022. **50**(1): p. 411-429.
134. Kim, Y.K., et al., *Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay*. Cell, 2005. **120**(2): p. 195-208.
135. Kim, K.C. and H.K. Kim, *Role of Staufen in dendritic mRNA transport and its modulation*. Neurosci Lett, 2006. **397**(1-2): p. 48-52.
136. Yadav, D.K., et al., *Staufen1 reads out structure and sequence features in ARF1 dsRNA for target recognition*. Nucleic Acids Res, 2020. **48**(4): p. 2091-2106.
137. Donaldson, J.G. and C.L. Jackson, *Regulators and effectors of the ARF GTPases*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(4): p. 475-82.
138. Kim, Y.K., et al., *Staufen1 regulates diverse classes of mammalian transcripts*. Embo j, 2007. **26**(11): p. 2670-81.

139. Gong, C., et al., *SMD and NMD are competitive pathways that contribute to myogenesis: effects on PAX3 and myogenin mRNAs*. *Genes Dev*, 2009. **23**(1): p. 54-66.
140. Fernández Moya, S.M. and M.A. Kiebler, *CLIPing Staufen to secondary RNA structures: size and location matter!* *Bioessays*, 2015. **37**(10): p. 1062-6.
141. Zheng, D., et al., *3'READS + RIP defines differential Staufen1 binding to alternative 3'UTR isoforms and reveals structures and sequence motifs influencing binding and polysome association*. *Rna*, 2020. **26**(11): p. 1621-1636.
142. Brendel, C., et al., *Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes*. *Biochem J*, 2004. **384**(Pt 2): p. 239-46.
143. Dixit, U., et al., *Staufen1 promotes HCV replication by inhibiting protein kinase R and transporting viral RNA to the site of translation and replication in the cells*. *Nucleic Acids Res*, 2016. **44**(11): p. 5271-87.
144. Chu, J.F., et al., *TDP-43 Regulates Coupled Dendritic mRNA Transport-Translation Processes in Cooperation with FMRP and Staufen1*. *Cell Rep*, 2019. **29**(10): p. 3118-3133.e6.
145. Kadlec, J., E. Izaurralde, and S. Cusack, *The structural basis for the interaction between nonsense-mediated mRNA decay factors UPF2 and UPF3*. *Nat Struct Mol Biol*, 2004. **11**(4): p. 330-7.
146. Hesler, S., et al., *Contribution of dsRBD2 to PKR Activation*. *ACS Omega*, 2021. **6**(17): p. 11367-11374.
147. Hitti, E.G., et al., *Oligomerization activity of a double-stranded RNA-binding domain*. *FEBS Lett*, 2004. **574**(1-3): p. 25-30.
148. Poulsen, H., et al., *Dimerization of ADAR2 is mediated by the double-stranded RNA binding domain*. *Rna*, 2006. **12**(7): p. 1350-60.
149. Chan, J., et al., *Structural and mechanistic insight into stem-loop RNA processing by yeast Pichia stipitis Dicer*. *Protein Sci*, 2021. **30**(6): p. 1210-1220.
150. Martel, C., et al., *Multimerization of Staufen1 in live cells*. *Rna*, 2010. **16**(3): p. 585-97.
151. Lamontagne, B., A. Tremblay, and S. Abou Elela, *The N-terminal domain that distinguishes yeast from bacterial RNase III contains a dimerization signal required for efficient double-stranded RNA cleavage*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(4): p. 1104-15.
152. de Lucas, S., et al., *Human Staufen1 protein interacts with influenza virus ribonucleoproteins and is required for efficient virus multiplication*. *J Virol*, 2010. **84**(15): p. 7603-12.
153. Rao, S., et al., *HIV-1 requires Staufen1 to dissociate stress granules and to produce infectious viral particles*. *Rna*, 2019. **25**(6): p. 727-736.
154. Fang, J., et al., *Staufen1 Interacts with Multiple Components of the Ebola Virus Ribonucleoprotein and Enhances Viral RNA Synthesis*. *mBio*, 2018. **9**(5).
155. Chatel-Chaix, L., et al., *The host protein Staufen1 interacts with the Pr55Gag zinc fingers and regulates HIV-1 assembly via its N-terminus*. *Retrovirology*, 2008. **5**: p. 41.
156. Lee, J.H., et al., *Impairment of the Staufen1-NS1 interaction reduces influenza viral replication*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **414**(1): p. 153-8.
157. Krichevsky, A.M. and K.S. Kosik, *Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation*. *Neuron*, 2001. **32**(4): p. 683-96.
158. Kiebler, M.A., et al., *The mammalian staufen protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport*. *J Neurosci*, 1999. **19**(1): p. 288-97.
159. Ohashi, S., et al., *Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(40): p. 37804-10.
160. Kanai, Y., N. Dohmae, and N. Hirokawa, *Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule*. *Neuron*, 2004. **43**(4): p. 513-25.

161. Thomas, M.G., et al., *Mammalian Staufen 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 4): p. 563-73.
162. Monshausen, M., et al., *The RNA-binding protein Staufen from rat brain interacts with protein phosphatase-1*. J Neurochem, 2002. **81**(3): p. 557-64.
163. Read, A. and M. Schröder, *The Unfolded Protein Response: An Overview*. Biology (Basel), 2021. **10**(5).
164. Zhao, B.S., I.A. Roundtree, and C. He, *Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017. **18**(1): p. 31-42.
165. Vlasova-St Louis, I. and P.R. Bohjanen, *Post-transcriptional regulation of cytokine and growth factor signaling in cancer*. Cytokine Growth Factor Rev, 2017. **33**: p. 83-93.
166. Frey, S. and J.U. Frey, *'Synaptic tagging' and 'cross-tagging' and related associative reinforcement processes of functional plasticity as the cellular basis for memory formation*. Prog Brain Res, 2008. **169**: p. 117-43.
167. Lebeau, G., et al., *Staufen1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(9): p. 2896-907.
168. Ravel-Chapuis, A., et al., *The RNA-binding protein Staufen1 impairs myogenic differentiation via a c-myc-dependent mechanism*. Mol Biol Cell, 2014. **25**(23): p. 3765-78.
169. Wang, J., C. Gong, and L.E. Maquat, *Control of myogenesis by rodent SINE-containing lncRNAs*. Genes Dev, 2013. **27**(7): p. 793-804.
170. Crawford Parks, T.E., et al., *Muscle-specific expression of the RNA-binding protein Staufen1 induces progressive skeletal muscle atrophy via regulation of phosphatase tensin homolog*. Hum Mol Genet, 2017. **26**(10): p. 1821-1838.
171. Gershoni-Emek, N., et al., *Proteomic Analysis of Dynein-Interacting Proteins in Amyotrophic Lateral Sclerosis Synaptosomes Reveals Alterations in the RNA-Binding Protein Staufen1*. Mol Cell Proteomics, 2016. **15**(2): p. 506-22.
172. Meola, G., et al., *Dysfunction of protein homeostasis in myotonic dystrophies*. Histol Histopathol, 2013. **28**(9): p. 1089-98.
173. Ravel-Chapuis, A., et al., *The RNA-binding protein Staufen1 is increased in DM1 skeletal muscle and promotes alternative pre-mRNA splicing*. J Cell Biol, 2012. **196**(6): p. 699-712.
174. Ravel-Chapuis, A., et al., *Staufen1 impairs stress granule formation in skeletal muscle cells from myotonic dystrophy type 1 patients*. Mol Biol Cell, 2016. **27**(11): p. 1728-39.
175. Bondy-Chorney, E., et al., *Staufen1 Regulates Multiple Alternative Splicing Events either Positively or Negatively in DM1 Indicating Its Role as a Disease Modifier*. PLoS Genet, 2016. **12**(1): p. e1005827.
176. Blomen, V.A., et al., *Gene essentiality and synthetic lethality in haploid human cells*. Science, 2015. **350**(6264): p. 1092-6.
177. Ohtani, K., J. DeGregori, and J.R. Nevins, *Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(26): p. 12146-50.
178. Xu, T.P., et al., *SP1-induced upregulation of the long noncoding RNA TINCR regulates cell proliferation and apoptosis by affecting KLF2 mRNA stability in gastric cancer*. Oncogene, 2015. **34**(45): p. 5648-61.
179. Xu, T.P., et al., *E2F1 induces TINCR transcriptional activity and accelerates gastric cancer progression via activation of TINCR/STAU1/CDKN2B signaling axis*. Cell Death Dis, 2017. **8**(6): p. e2837.
180. Damas, N.D., et al., *SNHG5 promotes colorectal cancer cell survival by counteracting STAU1-mediated mRNA destabilization*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 13875.
181. Bridges, M.C., A.C. Daulagala, and A. Kourtidis, *LNCcation: lncRNA localization and function*. J Cell Biol, 2021. **220**(2).

182. Li, Y., et al., *LncRNA SNHG5 promotes the proliferation and cancer stem cell-like properties of HCC by regulating UPF1 and Wnt-signaling pathway*. *Cancer Gene Ther*, 2022. **29**(10): p. 1373-1383.
183. DeBerardinis, R.J., et al., *The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation*. *Cell Metab*, 2008. **7**(1): p. 11-20.
184. Zhong, Y., et al., *STAU1 selectively regulates the expression of inflammatory and immune response genes and alternative splicing of the nerve growth factor receptor signaling pathway*. *Oncol Rep*, 2020. **44**(5): p. 1863-1874.
185. Yamaguchi, Y., T. Naiki, and K. Irie, *Stau1 regulates Dvl2 expression during myoblast differentiation*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012. **417**(1): p. 427-32.
186. Yunchun, L., et al., *Clinical Significance of Myeloid-Related Protein 8/14 as a Predictor for Biological Treatment and Disease Activity in Rheumatoid Arthritis*. *Ann Clin Lab Sci*, 2018. **48**(1): p. 63-68.
187. Arora, H., et al., *The ATP-Binding Cassette Gene ABCF1 Functions as an E2 Ubiquitin-Conjugating Enzyme Controlling Macrophage Polarization to Dampen Lethal Septic Shock*. *Immunity*, 2019. **50**(2): p. 418-431 e6.
188. Chang, G.W., et al., *The Adhesion G Protein-Coupled Receptor GPR56/ADGRG1 Is an Inhibitory Receptor on Human NK Cells*. *Cell Rep*, 2016. **15**(8): p. 1757-70.
189. Hansen, W., et al., *Inflammation in vivo is modulated by GPR83 isoform-4 but not GPR83 isoform-1 expression in regulatory T cells*. *Genes Immun*, 2010. **11**(4): p. 357-61.
190. Chuang, H.C., X. Wang, and T.H. Tan, *MAP4K Family Kinases in Immunity and Inflammation*. *Adv Immunol*, 2016. **129**: p. 277-314.
191. Yuan, X., X. Hua, and K.R. Wilhelmus, *Expression of small leucine-rich proteoglycans during experimental fungal keratitis*. *Cornea*, 2010. **29**(6): p. 674-9.
192. Sun, H., et al., *Inhibition of neddylation pathway represses influenza virus replication and pro-inflammatory responses*. *Virology*, 2018. **514**: p. 230-239.
193. Kong, D.H., et al., *Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(4).
194. Barnault, R., et al., *Hepatic inflammation elicits production of proinflammatory netrin-1 through exclusive activation of translation*. *Hepatology*, 2022. **76**(5): p. 1345-1359.
195. Farrell, A.S. and R.C. Sears, *MYC degradation*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2014. **4**(3).
196. Chen, Y., et al., *Writing and erasing MYC ubiquitination and SUMOylation*. *Genes Dis*, 2019. **6**(4): p. 359-371.
197. Liu, Y., O. Tavana, and W. Gu, *p53 modifications: exquisite decorations of the powerful guardian*. *J Mol Cell Biol*, 2019. **11**(7): p. 564-577.
198. Zhang, Y. and Y. Xiong, *Control of p53 ubiquitination and nuclear export by MDM2 and ARF*. *Cell Growth Differ*, 2001. **12**(4): p. 175-86.
199. Brooks, C.L. and W. Gu, *p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond*. *Mol Cell*, 2006. **21**(3): p. 307-15.
200. Cho, H., et al., *Staufen1-mediated mRNA decay functions in adipogenesis*. *Mol Cell*, 2012. **46**(4): p. 495-506.
201. Choudhury, N.R., G. Heikel, and G. Michlewski, *TRIM25 and its emerging RNA-binding roles in antiviral defense*. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2020. **11**(4): p. e1588.
202. Heikel, G., N.R. Choudhury, and G. Michlewski, *The role of Trim25 in development, disease and RNA metabolism*. *Biochem Soc Trans*, 2016. **44**(4): p. 1045-50.
203. Gack, M.U., et al., *TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity*. *Nature*, 2007. **446**(7138): p. 916-920.
204. Almasi, S. and B.J. Jasmin, *The multifunctional RNA-binding protein Staufen1: an emerging regulator of oncogenesis through its various roles in key cellular events*. *Cell Mol Life Sci*, 2021. **78**(23): p. 7145-7160.

205. May, D.G., et al., *Comparative Application of BioID and TurboID for Protein-Proximity Biotinylation*. *Cells*, 2020. **9**(5).