

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.



Université de Montréal

**Études des modifications post-traductionnelles de Khd1p
et de leur rôle dans la régulation de la traduction de
l'ARNm *ASH1* chez la levure *Saccharomyces cerevisiae***

par

Nicolas Paquin

Département de biochimie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor (Ph.D.)*
en biochimie

Mars 2008

© Nicolas Paquin, 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Études des modifications post-traductionnelles de Khd1p et de leur rôle dans la régulation
de la traduction de l'ARNm *ASH1* chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

présentée par :
Nicolas Paquin

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Luc DesGroseillers
président-rapporteur

Dr Pascal Chartrand
Directeur de recherche

Dr Gerardo Ferbeyre
Membre du jury

Dr Allan Jacobson
Examineur externe

Dr Guy Boileau
Représentant du doyen de la FESP

RÉSUMÉ

La localisation intracellulaire des ARNm permet aux cellules de déterminer le lieu et le temps d'expression de facteurs spécifiques. Ce mécanisme de régulation de la distribution des protéines est critique durant le développement de plusieurs organismes, la division asymétrique, la motilité cellulaire et la plasticité synaptique. Afin d'éviter une expression prématurée des ARNm localisés, la traduction de ces transcrits est généralement réprimée durant leur transport. Chez *S. cerevisiae*, l'ARNm *ASH1* (pour Asymmetric Synthesis of HO) est localisé à l'extrémité du bourgeon à la fin de l'anaphase. Ceci permet à la protéine Ash1 d'être exclusivement distribuée dans le noyau de la cellule fille, où elle inhibe le changement de type sexuel. Ce processus est utilisé comme modèle d'étude pour comprendre les mécanismes contrôlant la localisation de déterminants cellulaires. Il a été montré que la régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* est cruciale pour maintenir la distribution asymétrique d'Ash1p.

Nous avons identifié Khd1p comme étant un répresseur traductionnel de l'ARNm *ASH1* et avons montré que cette régulation de la traduction requiert la liaison de Khd1p à l'élément de localisation E1 présent dans la séquence codante de l'ARNm *ASH1*. Par ailleurs, Khd1p interagit *in vivo* et *in vitro* avec le domaine C-terminal d'eIF4G1 et cette interaction est stimulée par la présence d'ARN. La délétion du domaine C-terminal d'eIF4G1 cause une augmentation de l'expression d'un rapporteur Ash1-luciférase *in vivo*, suggérant que le contrôle de la traduction de l'ARNm *ASH1* par Khd1p est médié par ce domaine. Aussi, nous avons montré que la caséine kinase de type I Yck1p, une kinase ancrée à la membrane, est impliquée dans la régulation de l'expression d'Ash1p. La phosphorylation de Khd1p par Yck1p permet de relâcher l'ARNm *ASH1* et ainsi activer son expression locale. En plus, cette modification de Khd1p induit son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Cette protéolyse de Khd1p mènerait à la déstabilisation de l'ARNm *ASH1*. Finalement, nous proposons un modèle par lequel la régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* et la stabilité de ce transcrit sont contrôlées par les modifications post-traductionnelles de Khd1p.

Mots clés: Régulation traductionnelle, Localisation d'ARNm, ARNm *ASH1*, Khd1p, Yck1p, Phosphorylation, Dégradation de protéine, Levure.

ABSTRACT

The intracellular localization of mRNAs allows the determination of the site and time of expression of specific factors. This tightly regulated protein sorting mechanism is critical during development, asymmetric division, cell motility and synaptic plasticity. In order to avoid any premature expression during mRNA trafficking, the translation of localized mRNA is often repressed during transport. In *S. cerevisiae*, the *ASH1* mRNA (for Asymmetric Synthesis of HO) is localized to the bud tip in late anaphase cells. This allows Ash1p, a transcriptional repressor of HO, to be exclusively sorted to the daughter cell nucleus, where it prevents mating type switching. This serves as a model to study the sorting of cell fate determinants. Regulation of the translation of *ASH1* mRNA during its localization has been shown to be crucial to maintain the asymmetric segregation of Ash1p.

We identified Khd1p as a translational repressor of the *ASH1* mRNA and showed that this translational regulation requires the binding of Khd1p to the localization element E1, which is present within the coding sequence of the *ASH1* mRNA. Interestingly, Khd1p interacts *in vivo* and *in vitro* with the C-terminal domain of eIF4G1, and this interaction is facilitated by RNA. Deletion of the C-terminal domain of eIF4G1 resulted in an increased expression of an Ash1-luciferase reporter *in vivo*, suggesting that the Khd1p-dependent translational control of the *ASH1* mRNA is mediated by this domain. Interestingly, we found that the yeast casein kinase Yck1p, a membrane-localized kinase, is also involved in the regulation of the expression of Ash1p. Phosphorylation of Khd1 by Yck1p triggers the release of the *ASH1* mRNA and activates the local expression of Ash1p. In addition, this modification of Khd1p induces its ubiquitination and degradation by the proteasome. This proteolysis of Khd1p leads to the destabilization of the *ASH1* mRNA. Therefore, we propose a mechanism by which the translational regulation of the bud-localized *ASH1* mRNA and the stability of this transcript are controlled by post-translational modifications of Khd1p.

Keywords: Translation regulation, mRNA localization, *ASH1* mRNA, Khd1p, Yck1p, Phosphorylation, Protein degradation, Yeast.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
DÉDICACE	xiv
REMERCIEMENTS.....	xv
INTRODUCTION	1
1.1 Le transport et la localisation d'ARNm	2
1.1.1 Localisation d'ARNm durant le développement.....	2
1.1.2 Localisation d'ARNm dans les neurones.....	5
1.1.3 Localisation d'ARNm et motilité cellulaire.....	6
1.1.4 Localisation d'ARNm et division cellulaire asymétrique.....	6
1.1.5 Mécanismes de transport et de localisation d'ARNm.....	7
1.2 La levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en tant qu'organisme modèle pour étudier le transport et la localisation d'ARNm	8
1.3 Localisation d'ARNm au bourgeon de la levure <i>S. cerevisiae</i>	8
1.3.1 Localisation de l'ARNm <i>ASH1</i>	11
1.3.2 Les éléments de localisation de l'ARNm <i>ASH1</i>	16
1.3.3 La machinerie de localisation d'ARNm au bourgeon des levures.....	18
1.3.4 Le moteur moléculaire She1p/Myo4p.....	20
1.3.5 She3p, un pont entre le moteur moléculaire et la liaison à l'ARNm	21
1.3.6 Liaison des ARNm localisés par She2p.....	21
1.3.7 She4p, un modulateur du déplacement de myosines	27
1.3.8 Maintenir l'organisation des filaments d'actine grâce à She5p/Bni1p et Bnr1p	28
1.3.9 Loc1p, une protéine du nucléole qui influence la distribution de l'ARNm <i>ASH1</i> et de la protéine Ash1.....	29
1.3.10 Localisation de l'ARNm <i>IST2</i> et distribution de la protéine Ist2.....	29
1.4 Régulation de la traduction de l'ARNm <i>ASH1</i>	30
1.4.1 Effet de la position des éléments de localisation sur la traduction de l'ARNm <i>ASH1</i>	30
1.4.2 Effet de Khd1p sur l'expression d'Ash1p.....	32
1.4.3 Puf6p réprime la traduction de l'ARNm <i>ASH1</i>	33
1.5 Coordination du transport du réticulum endoplasmique cortical et de la localisation d'ARNm chez la levure.....	39
1.6 La traduction des ARNm chez la levure	42
1.6.1 Régulation de la traduction des ARNm	45
1.6.2 eIF4E et la liaison à la coiffe des ARNm.....	45
1.6.3 eIF4G, une protéine d'échafaudage centrale.....	46
1.6.4 Liaison de la queue de poly(A) par Pab1p.....	47
1.7 Régulation de la traduction d'ARNm localisés.....	49
1.7.1 Régulation de la localisation et de la traduction de l'ARNm de la β -actine par ZBP1	49

1.7.2 Effets des modifications post-traductionnelles sur la liaison de protéines à l'ARN	50
1.8 Processus d'ubiquitination	53
1.8.1 Mécanismes d'ubiquitination	53
1.8.2 Rôles biologiques de l'ubiquitination	55
1.9 Questions posées par l'auteur	56
RÉSULTATS	57
CHAPITRE 2: Local activation of yeast <i>ASH1</i> mRNA translation through phosphorylation of Khd1p by the casein kinase Yck1p	58
2.1 ABSTRACT	61
2.2 INTRODUCTION	62
2.3 RESULTS	63
2.3.1 Khd1p regulates the translation of the <i>ASH1</i> mRNA through the localization element E1	63
2.3.2 Deletion of <i>KHDI</i> increases the ribosome load on the <i>ASH1</i> mRNA and decreases the asymmetric distribution of Ash1p	65
2.3.3 Khd1p interacts with the C-terminal domain of eIF4G1	65
2.3.4 Khd1p is phosphorylated by the plasma membrane-anchored casein kinase Yck1p	67
2.3.5 Phosphorylation of Khd1p at its C-terminus reduces its RNA-binding capacity	69
2.3.6 Phosphorylation of Khd1p relieves the translational repression on an <i>ASH1</i> reporter mRNA	69
2.4 DISCUSSION	70
2.4.1 Khd1p: an unconventional translational regulator	70
2.4.2 A role for CK1 in translational control	71
2.5 MATERIAL AND METHODS	73
2.5.1 Growth media and yeast strains	73
2.5.2 Plasmid constructions	73
2.5.3 Luciferase assays	74
2.5.4 Northern Blots	74
2.5.5 Fluorescence in situ hybridization and immunofluorescence	74
2.5.6 GST pulldowns	74
2.5.7 Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)	75
2.6 ACKNOWLEDGEMENTS	75
2.7 REFERENCES	76
2.8 FIGURE LEGENDS	80
2.9 SUPPLEMENTARY DATA	91
2.9.1 MATERIAL AND METHODS	91
2.9.1.1 Ash1p kinetics and Western blots	91
2.9.1.2 Sucrose gradients and dot blots	91
2.9.1.3 Protein expression and purification	92
2.9.1.4 <i>In vitro</i> phosphorylation and purification of Yck1p	92
2.9.1.5 P ³² metabolic labelling	93
2.9.2 SUPPLEMENTARY FIGURES LEGENDS	97
CHAPITRE 3: A PEST-like motif controls the degradation of Khd1p and the decay of the <i>ASH1</i> mRNA	103
3.1 ABSTRACT	106
3.2 INTRODUCTION	107

3.3 RESULTS	108
3.3.1 Khd1p is degraded in a phosphorylation-dependent manner	108
3.3.2 Proteasomal activity and lysine residues in the PEST-like domain of Khd1p are required for its degradation	109
3.3.3 Stabilization of Khd1p impairs the degradation of the <i>ASH1</i> mRNA	110
3.3.4 Khd1p and the <i>ASH1</i> mRNA localize to cytoplasmic processing bodies upon cellular stress	111
3.4 DISCUSSION	112
3.4.1 Phosphorylation of Khd1p by Yck1p triggers its degradation	112
3.4.2 Khd1p links the translational regulation of the <i>ASH1</i> mRNA with the stability of this transcript	113
3.5 MATERIALS AND METHODS	114
3.5.1 Yeast strains and growth media	114
3.5.2 Plasmids construction	115
3.5.3 Protein half-life time course and western blots	115
3.5.4 Yeast three-hybrid assay	115
3.5.5 <i>ASH1</i> mRNA half-life and northern blots	115
3.5.6 Luciferase assays	116
3.6 ACKNOWLEDGEMENTS	116
3.7 REFERENCES	116
3.8 FIGURE LEGENDS	119
DISCUSSION	128
4.1 Mécanismes de régulation de la traduction de l'ARNm <i>ASH1</i>	129
4.1.1 Régulation de la traduction de l'ARNm <i>ASH1</i> par Khd1p et eIF4G1	129
4.2 Phosphorylation de Khd1p par la caséine kinase de type I Yck1p	138
4.2.1 Activation locale de la traduction de l'ARNm <i>ASH1</i>	139
4.2.2 Dégradation de Khd1p suite à sa phosphorylation par Yck1p	140
CONCLUSIONS	145
BIBLIOGRAPHIE	146
ANNEXES	xvi
ANNEXE 1: Knowing when to let go	xvii
ACKNOWLEDGMENTS	xxii
REFERENCES	xxii
FIGURE LEGEND	xxiii
ANNEXE 2: Local Regulation of mRNA translation: new insights from the bud	xxv
ABSTRACT	xxvii
INTRODUCTION	xxvii
mRNA transport and localization in the budding yeast	xxviii
The endoplasmic reticulum couples mRNA trafficking and local translation	xxix
The importance of translation in mRNA anchoring at the bud tip and in protein sorting	xxxi
Translational regulation of <i>ASH1</i> mRNA by Puf6p and Khd1p	xxxii
Translational activation of localized mRNAs by the membrane-associated kinase Yck1p	xxxiii
CONCLUDING REMARKS	xxxiv
ACKNOWLEDGMENTS	xxxv
REFERENCES	xxxv
FIGURE LEGENDS	xxxix

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Liste d'ARNm localisés au bourgeon chez <i>S. cerevisiae</i>	10
Tableau 2 : Facteurs d'initiation de la traduction et leur fonction chez la levure <i>S. cerevisiae</i>	43
Supplementary Table S3: Yeast strains used in this study.....	93
Supplementary Table S4: Plasmids used in this study.....	94
Table 5: Yeast strains used in this study.....	121
Table 6: Plasmids used in this study.....	121

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Exemples d'ARNm localisés à des sites spécifiques dans le cytoplasme.....	4
Figure 2 : Distribution de l'ARNm <i>ASH1</i> et de la protéine Ash1 chez la levure <i>S. cerevisiae</i> en fin d'anaphase.....	12
Figure 3 : Régulation de l'expression de <i>HO</i> par Ash1p et du changement de type sexuel par la protéine Ho.....	14
Figure 4 : Ash1p facilite la formation d'une levure diploïde en inhibant le changement de type sexuel dans la cellule fille.	15
Figure 5 : Schéma des éléments de localisation de l'ARNm <i>ASH1</i> et de leur structure secondaire.....	17
Figure 6 : Description de l'essai génétique basé sur la localisation de la protéine Ash1. ...	19
Figure 7 : Description des essais de double-hybride et triple-hybride chez la levure.....	23
Figure 8 : Motifs de liaison de She2p dans les éléments de localisation de l'ARNm <i>ASH1</i>	25
Figure 9 : Modèle de la localisation de l'ARNm <i>ASH1</i>	26
Figure 10 : Effet d'une traduction prématurée sur la distribution d'Ash1p.....	37
Figure 11 : Distribution de la protéine Ash1 lorsque la traduction de son transcrite est affectée.	38
Figure 12 : Modèle de la coordination du transport du réticulum endoplasmique cortical et de la localisation d'ARNm chez la levure.....	41
Figure 13 : Description de l'initiation de la traduction des ARNm chez les eucaryotes.....	44
Figure 14 : Exemples de régulation de la traduction.....	48
Figure 15 : Localisation et régulation de la traduction de l'ARNm de la β -actine par ZBP1.	52
Figure 16: Mécanisme d'ubiquitination.....	54
Figure 17: Khd1p regulates the translation of the <i>ASH1</i> mRNA through the localization element E1.....	84
Figure 18: Deletion of <i>KHDI</i> results in a redistribution of <i>ASH1</i> mRNA to the higher polysome fractions.....	85
Figure 19: Deletion of <i>KHDI</i> decrease the asymmetric distribution of Ash1p.....	86
Figure 20: Khd1p interacts with the C-terminal domain of eIF4G1.....	87
Figure 21: Khd1p phosphorylation by Yck1p controls its translational repression activity.....	88
Figure 22: Ser/Thr residues at the C-terminal end of Khd1p are phosphorylated by Yck1p and are important for the translational control of an <i>ASH1</i> reporter mRNA.....	89
Figure 23: Model for the regulation of Khd1p-mediated translational repression of the <i>ASH1</i> mRNA.....	90
Supplementary Figure 24: Kinetics of the Ash1 protein synthesized from wild-type <i>ASH1</i> mRNA.....	99
Supplementary Figure 25: Co-sedimentation of Khd1p with ribosomes.....	100
Supplementary Figure 26: CK1 interacts with and phosphorylates GST-Khd1p <i>in vitro</i>	101
Supplementary Figure 27: Characterization of the Khd1-MUT protein.....	102
Figure 28: The C-terminal domain of Khd1p is a PEST-like sequence.....	123
Figure 29: Phosphorylation of Khd1p triggers its degradation.....	124
Figure 30: Proteasome inhibition and mutation of lysines in the C-terminal domain of Khd1p impairs its degradation.....	125
Figure 31: The degradation of Khd1p controls the stability of the <i>ASH1</i> mRNA.....	126

Figure 32: Khd1p and the <i>ASH1</i> mRNA localize to cytoplasmic processing bodies during cellular stress.....	127
Figure 33: Le complexe Khd1p-eIF4G1 n'est pas affecté par la liaison d'autres facteurs d'initiation de la traduction.....	133
Figure 34: Modèle de mécanisme de régulation de la traduction par Khd1p et eIF4G1... ..	136
Figure 35: Modèle de la dégradation de Khd1p et de son effet sur l'ARNm <i>ASH1</i>	144
Figure 36: Model for ZBP1-dependent β -actin mRNA localization and translational control	xxiv
Figure 37: mRNA localization and cortical ER inheritance	xli
Figure 38: Translational regulation of the <i>ASH1</i> mRNA allows the asymmetric segregation of Ash1p.....	xlii
Figure 39: Comparative models for the local activation of mRNA translation by membrane-associated kinases in yeast and mammals.....	xliii

LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C :	degré Celsius
µg :	Microgramme
µL :	Microlitre
µM :	concentration micromolaire
A :	Alanine
Å :	Angstrom
AD :	activation domain
ADN (DNA en anglais) :	acide désoxyribonucléique
APC :	anaphase promoting complex
ARN (RNA en anglais) :	acide ribonucléique
ARNm (mRNA en anglais) :	acide ribonucléique messenger
ARNr :	acide ribonucléique ribosomique
ARNt :	acide ribonucléique de transfert
ATP :	Adénosine triphosphate
C :	Cytosine
CK1 :	caséine kinase de type 1
CPM :	coup par minute
C-terminal :	carboxy-terminal
CTP :	cytidine triphosphate
D :	acide aspartique
DAPI :	4',6-diamidino-2-phenylindole
DBD :	DNA binding domain
dCTP :	désoxycytidine triphosphate
DIC :	differential interference contrast
DO (OD en anglais) :	densité optique
DTT :	Dithiothreitol
E :	acide glutamique
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EMSA :	electrophoretic mobility shift assay
F :	Phénylalanine

g :	constante gravitationnelle
G :	Guanine
GFP :	green fluorescent protein
GST :	glutathione S-transférase
His :	Histidine
HRP :	horseradish peroxydase
IRES :	Internal ribosome entry site
kDa :	Kilodalton
L :	Litre
LUC :	Luciferase
M :	concentration molaire
MCP :	MS2 coat protein
mg :	Milligramme
min :	Minute
mL :	Millilitre
nM :	concentration nanomolaire
N-terminal :	amino-terminal
P ³² :	phosphore 32
PBS :	phosphate buffered saline
PCR :	polymerase chain reaction
PMSF :	Phenylmethylsulfonylfluoride
proA :	protein A
RE (ER en anglais) :	réticulum endoplasmique
RNAse :	Ribonucléase
RNP :	Ribonucléoprotéique
rpm :	révolution par minute
RRM :	RNA recognition motif
RT-PCR :	reverse transcriptase polymerase chain reaction
S :	Sérine
<i>S. cerevisiae</i> :	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCF :	Skp1/Cullin/F-box
Ser :	Sérine

T :	Thréonine
TAP :	tandem affinity purification
Thr :	Thréonine
ts :	thermosensible
Tyr :	Tyrosine
U :	Uracil
UAS :	upstream activation sequence
URS :	upstream regulatory sequence
UTR :	untranslated region
V :	Volt
VF1 :	venus fragment 1
VF2 :	venus fragment 2
WT :	wild type
Y :	Tyrosine

À tous ceux qui ont compris mes efforts...

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier le Dr Pascal Chartrand, mon mentor, pour son aide et son soutien tout au long de mes études graduées dans son laboratoire.

Merci aux membres du mon comité, les Drs Luc DesGroseillers, Gerardo Ferbeyre, Allan Jacobson et Pascal Chartrand pour avoir pris le temps d'évaluer cette thèse.

Merci à Anne-Laure Finoux pour avoir pris le temps de lire cette thèse et pour ses suggestions très utiles.

Aussi, mes remerciements les plus sincères à Pierre-Olivier Héту, un ami dévoué sans qui ces années de travail auraient été beaucoup plus difficiles, mais aussi à Roselyne Castonguay, Véronique Fortin et Naomie Héту. Merci aussi à Patrick Sénéchal pour son aide et son dévouement.

Je n'oublie pas tous les membres du laboratoire du Dr Chartrand, pour les discussions stimulantes et divertissantes. Je pense notamment à Catherine Olivier, Franck Gallardo, Yannick Sylvestre, Anne-Laure Finoux, Emmanuelle Querido, Zhi Fa Shen, Mélissa Beaudoin, Guillaume Poirier, Marie Ménade, Olivia Popescu, Damiane Donato, Amélie Forget et tous ceux qui ont passé quelques mois avec nous.

Merci aux Drs Gerardo Ferbeyre, Luc DesGroseillers, Luis A. Rokeach et James G. Omichinski, ainsi que les membres de leurs laboratoires pour leur aide. Remerciements aussi à Karine Boulay, Samuel Dugré-Brisson, Vincent De Guire, Viviane Calabrese, Emily Manderson et Frédérick-Antoine Malette pour leur soutien et leur aide précieuse.

Finalement, je remercie ma famille, mes parents, mes soeurs et mes amis pour leur soutien et leur patience.

INTRODUCTION

La régulation de l'expression des gènes permet de coordonner les différentes réactions chimiques et voies biochimiques qui agissent dans la cellule en fonction des besoins de celle-ci. Afin d'éviter les effets néfastes sur la cellule de la présence d'une protéine ou d'un ARN exprimé de façon ectopique, divers mécanismes permettent un contrôle fin de l'expression des gènes. Par exemple, la régulation des promoteurs permet de déterminer le moment de la transcription d'un ARNm. Toutefois, ce mécanisme ne permet pas d'assurer une distribution des protéines aux endroits dans la cellule où leur fonction est requise. Certaines protéines contiennent des signaux peptidiques qui déterminent leur distribution, mais ce mécanisme nécessite parfois le maintien des protéines sous une forme inactive. Une façon de palier à ce problème est la localisation d'ARNm. En ciblant un ARNm dans un compartiment cellulaire défini, il sera traduit uniquement en cet endroit, menant à l'accumulation locale d'une protéine, à proximité de son site d'action. Cet avantage biologique permet une réponse rapide à des signaux intracellulaires et extracellulaires.

1.1 Le transport et la localisation d'ARNm

Le transport et la localisation d'ARNm sont impliqués dans de nombreux processus biologiques très importants tels que le développement de plusieurs organismes, la plasticité synaptique, la mémoire, la motilité cellulaire, la réponse à certains stimuli et la division cellulaire asymétrique (St Johnston, 2005). Ce transport dirigé des ARNm est présent et conservé dans de nombreux organismes, d'unicellulaires comme la levure à des organismes multicellulaires tels que les plantes et les mammifères (Du et al., 2007).

1.1.1 Localisation d'ARNm durant le développement

La localisation d'ARNm permet entre autre d'assurer la ségrégation de facteurs déterminant du développement dans des endroits précis de l'organisme. Notamment, la localisation de plusieurs ARNm maternels dans l'ovocyte est essentielle durant le développement de divers organismes (Bashirullah et al., 1998). Par exemple, la localisation de l'ARNm Nanos au pôle postérieur de l'ovocyte chez *Drosophila melanogaster* permet le développement des sections abdominales de cet organisme et s'avère cruciale à l'établissement de la polarité antéro-postérieure (Figure 1A) (Johnstone and Lasko, 2001).

Aussi l'ARNm Oskar est localisé à l'extrémité postérieure de l'ovocyte avec la protéine Staufen durant les stades de développement 8-9 (Brendza et al., 2000). Ce transport dépend des microtubules et d'éléments de localisation présents dans le 3'UTR de l'ARNm (Kim-Ha et al., 1993). Une mauvaise localisation de ce transcrit et l'abolition de sa régulation traductionnelle affectent le développement des segments postérieurs de la mouche (Johnstone and Lasko, 2001). Cet exemple illustre très bien le lien étroit entre la localisation d'un ARNm et la régulation de sa traduction, car le couplage de ces deux mécanismes est crucial à la détermination de l'expression spatio-temporelle d'une protéine. Une accumulation d'ARNm localisés au pôle antérieur de l'ovocyte, notamment l'ARNm Bicoid, permet aussi le développement normal des segments antérieurs, soit la tête et les segments thoraciques (Bashirullah et al., 1998; Johnstone and Lasko, 2001). Récemment, une étude a examiné le nombre d'ARNm qui sont localisé au début de l'embryogenèse chez la drosophile (Lecuyer et al., 2007). Ce travail colossal avait pour but d'estimer l'importance de ce mécanisme par rapport à la distribution de protéines après leur traduction. Alors que 3370 transcrits ont été analysés grâce à des techniques d'hybridation *in situ* à haute résolution, 71% d'entre eux sont localisés dans des compartiments subcellulaires précis, tout comme les protéines pour lesquelles ces transcrits codent, suggérant que le transport et la localisation d'ARNm sont impliqués dans la majorité des processus cellulaires et développementaux (Lecuyer et al., 2007).

Ces mécanismes de localisation d'ARNm ne sont pas propres à la drosophile. Le développement de nombreux organismes, notamment la grenouille *Xenopus laevis* et le poisson zèbre, nécessite un transport d'ARNm (Bashirullah et al., 1998). En effet, plus de trente ARNm localisés ont été identifiés chez le xénope (King et al., 2005). Par exemple, la localisation du transcrit Vgl, qui code pour un facteur de croissance, au pôle végétal de l'ovocyte de *Xenopus laevis* est aussi cruciale à son développement (Mowry and Cote, 1999) alors que l'ARNm Vasa est localisé aux plans de clivage de l'embryon du poisson zèbre (Yoon et al., 1997).

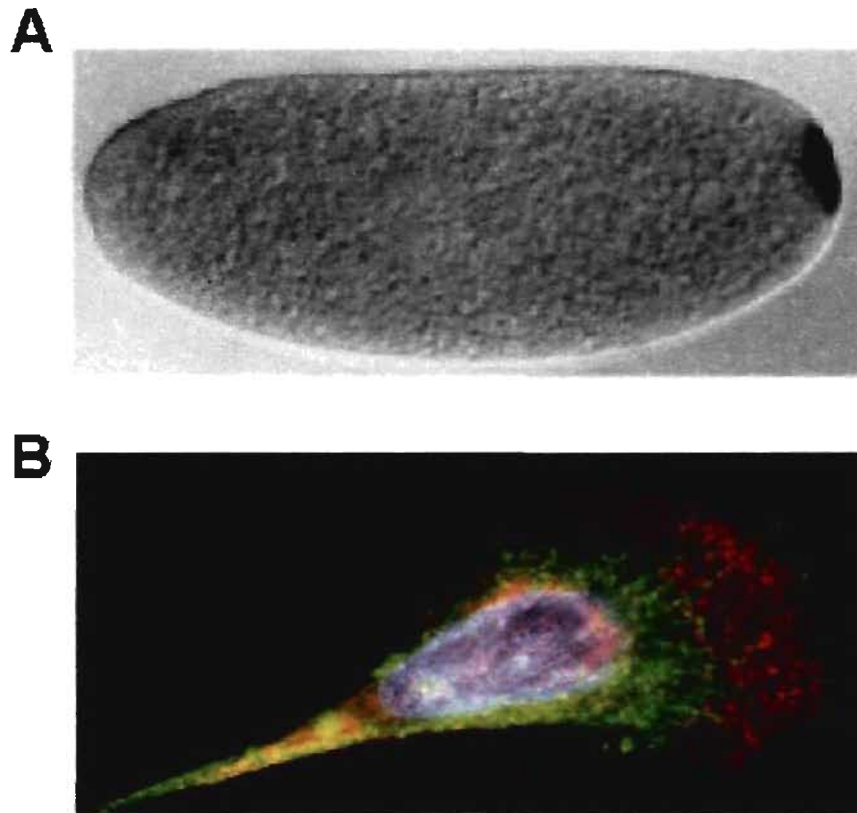


Figure 1 : Exemples d'ARNm localisés à des sites spécifiques dans le cytoplasme.

A) Localisation de l'ARNm Nanos (bleu) au pôle postérieur de l'ovocyte de *Drosophila melanogaster*. B) Localisation de l'ARNm de la β -actine dans les fibroblastes. La localisation de l'ARNm de la β -actine (rouge) au cône de croissance permet d'accroître la quantité de β -actine (vert) disponible et favorise le remodelage du cytosquelette d'actine. Modifiée de (Dahm and Kiebler, 2005; Evans Bergsten et al., 2001)

1.1.2 Localisation d'ARNm dans les neurones

La localisation d'ARNm occupe aussi un rôle important dans les neurones et autres cellules de la névroglie. Par exemple, le transport de l'ARNm MBP (pour myelin basic protein) dans les dendrites des oligodendrocytes permet une accumulation de la protéine MBP dans les feuillettes de myéline qui serviront à enrober les axones du système nerveux central (Ainger et al., 1993). L'ARNm MBP est localisé grâce à deux éléments présents dans son 3'UTR, dont un A2 response element (A2RE), et à hnRNP A2, protéine responsable du transport de ce transcrite (Ainger et al., 1997; Hoek et al., 1998; Munro et al., 1999). D'ailleurs, l'association de hnRNP A2 avec la protéine hnRNP E1 assure la répression de la traduction des ARNm contenant un élément A2RE durant leur transport (Kosturko et al., 2006). Une fonction de MBP sera de stabiliser le cytosquelette des oligodendrocytes durant leur maturation, mais d'autres rôles ont été proposés notamment dans la transduction des signaux cellulaires et dans le maintien de l'intégrité des membranes (Eichberg and Iyer, 1996; Fitzner et al., 2006; M.R. Galiano, 2006).

Aussi, la localisation d'ARNm joue un rôle primordial dans la fonction des neurones. La localisation de l'ARNm de la β -actine dans les dendrites et les cônes de croissance des filopodes dans les neurones favorise la plasticité synaptique en créant un pool d'actine sous la membrane rapidement disponible afin de remodeler le cytosquelette, augmentant la densité des filopodes dendritiques et synaptiques (Eom et al., 2003). La localisation de l'ARNm de la β -actine dépend d'un élément de localisation dans son 3'UTR, appelé « zipcode », et de la protéine ZBP1, elle-même capable de lier le zipcode et d'assurer le transport de ce transcrite de même que sa répression traductionnelle (Huttelmaier et al., 2005; Kislauskis et al., 1994; Ross et al., 1997). Aussi, la localisation de l'ARNm de la β -actine dans les neurones a été liée à la plasticité synaptique et à la capacité des neurones à former des neurites (Eom et al., 2003; Tiruchinapalli et al., 2003). Un autre exemple de localisation d'ARNm neuronal est celui de la Ca^{2+} / calmodulin-dependent kinase II alpha (CamKII α) dans la région post-synaptique des neurones glutamatergiques où elle influence la potentialisation à long terme et la mémoire (Lisman et al., 2002). L'activation de CamKII α lui permet de moduler les récepteur AMPA et NMDA, fortifiant ainsi les synapses et leur capacité à emmagasiner de l'information (Lisman et al., 2002). La

localisation du transcrit de la CamKII α dans les dendrites dépend de deux éléments de localisation dans son 3'UTR (Mori et al., 2000).

1.1.3 Localisation d'ARNm et motilité cellulaire

La motilité cellulaire dépend grandement de la réorganisation du cytosquelette aux cônes de croissance. Tout comme dans les neurones, la localisation de l'ARNm de la β -actine dépend de son « zipcode » et de la protéine ZBP1 (Huttelmaier et al., 2005; Kislauskis et al., 1994; Ross et al., 1997). La localisation de ce transcrit sous la membrane plasmique de fibroblastes favorise la création d'une réserve d'ARNm de β -actine qui sera traduite localement lorsque requise, permettant ainsi de rapidement accroître la concentration de β -actine aux sites de remodelage du cytosquelette et de favoriser la motilité cellulaire (Figure 1B) (Huttelmaier et al., 2005; Kislauskis et al., 1997). Par ailleurs, les sept sous-unités du complexe Arp2/3, un complexe protéique impliqué dans la nucléation et la polymérisation des filaments d'actine, sont enrichis aux cônes de croissance et nécessite à la fois un cytosquelette d'actine et des microtubules intacts (Mingle et al., 2005). Cette accumulation protéique dépend de la localisation de leurs transcrits respectifs aux protusions cellulaires et est régulée par la présence de sérum, suggérant que la localisation de ces sept transcrits est initiée par des signaux extracellulaires (Mingle et al., 2005). La fonction du complexe Arp2/3 est essentielle à la formation de protusions cellulaires lors de la motilité des fibroblastes puisque son inactivation à l'aide d'anticorps empêche la polymérisation de l'actine (Bailly et al., 2001). Ainsi, les ARNm du complexe Arp2/3 et l'ARNm du substrat de ce complexe, soit la β -actine, sont tous activement localisés aux cônes de croissance, permettant une réorganisation rapide du cytosquelette. Ceci met en évidence l'importance de la localisation d'ARNm dans la motilité cellulaire en coordonnant la distribution de facteurs de remodelage du cytosquelette et un constituant de ce dernier.

1.1.4 Localisation d'ARNm et division cellulaire asymétrique

Enfin, la localisation d'ARNm permet aussi d'assurer une division asymétrique à certains types cellulaires dont la levure. La division asymétrique signifie que lors de la division cellulaire, certains déterminants seront exclusivement ségrégués dans l'une ou

l'autre des cellules obtenues. Ce mécanisme peut s'effectuer de plusieurs façons : une protéine peut être ancrée dans une région qui sera héritée exclusivement par une cellule ou le contenu en ARNm peut différer d'une cellule à l'autre suite à la localisation de certains transcrits. Le mollusque *Ilyanassa obsoleta* en est un exemple peu commun. En effet, des ARNm s'associent aux centrosomes des cellules embryonnaires chez cet organisme et leur distribution devient asymétrique durant la division cellulaire (Lambert and Nagy, 2002). Toutefois, la levure *S. cerevisiae* demeure le cas de division asymétrique le mieux caractérisé. Chez cette levure, plusieurs ARNm sont exclusivement localisés à l'extrémité du bourgeon lors de l'anaphase, menant à leur présence uniquement dans la cellule fille suite à la division cellulaire (Chartrand et al., 2001).

1.1.5 Mécanismes de transport et de localisation d'ARNm

Divers mécanismes permettent de localiser un ARNm. Par exemple, la localisation de l'ARNm Nanos chez la drosophile ne dépend pas d'un moteur moléculaire, mais bien des courants cytoplasmiques engendrés par le déversement du contenu des cellules nourricières dans l'ovocyte (Forrest and Gavis, 2003). De plus, une fraction de l'ARNm Nanos qui ne sera pas ancré au pôle postérieur sera dégradé afin d'éviter son expression ectopique (Bashirullah et al., 1998; Bashirullah et al., 1999). Donc, les ARNm localisés peuvent suivre des courants cellulaires avant d'être ancrés à un site précis ou peuvent aussi être simplement stabilisés à ce site alors que la fraction de transcrit qui n'est pas correctement ancrée est dégradée (Lipshitz and Smibert, 2000). Un mécanisme semblable assure la localisation de l'ARNm Hsp83, l'homologue de Hsp90 chez les mammifères, au pôle postérieur de l'ovocyte chez la drosophile (Bashirullah et al., 1999; Ding et al., 1993). Un autre mécanisme permet la localisation active d'ARNm à l'aide de moteurs moléculaires se déplaçant sur le cytosquelette. Ainsi, les myosines assurent un déplacement sur les filaments d'actine alors que les dynéines se déplacent vers l'extrémité négative des microtubules et les kinésines permettent un déplacement vers l'extrémité positive des microtubules (St Johnston, 2005). Dans le cas de l'utilisation d'un moteur moléculaire, l'intégrité du cytosquelette est une condition *sine qua non* au transport d'ARNm par des moteurs moléculaires. Un exemple est la localisation de l'ARNm Oskar au pôle postérieur de l'ovocyte de drosophile, localisation qui nécessite la fonction de Staufén et d'une kinésine (Brendza et al., 2000). Toutefois, l'exemple de localisation

d'ARNm grâce à un moteur moléculaire le mieux caractérisé est celui de l'ARNm *ASH1*, un répresseur traductionnel dont le transcrit est localisé à l'extrémité du bourgeon en fin d'anaphase chez *S. cerevisiae* par la myosine Myo4p (Chartrand et al., 2001). Une grande partie du mécanisme de localisation et de régulation traductionnelle de l'ARNm *ASH1* ainsi que de nombreux facteurs protéiques impliqués ont été identifiés. Ces mécanismes seront décrits en détail dans la suite de cette introduction.

1.2 La levure *Saccharomyces cerevisiae* en tant qu'organisme modèle pour étudier le transport et la localisation d'ARNm

La levure *Saccharomyces cerevisiae*, aussi connue en tant que levure du boulanger, est un organisme unicellulaire souvent utilisé dans l'industrie agroalimentaire afin de produire de l'alcool, de faire lever les pâtes ou simplement en tant que source de nutriments. Cet organisme est aussi couramment utilisé par la communauté scientifique et reste à ce jour un outil très prisé dans l'étude des voies métaboliques et un sujet d'étude très répandu. Contrairement à la bactérie *E. coli*, qui est aussi un organisme unicellulaire, *S. cerevisiae* est un organisme eucaryote, c'est-à-dire que ces cellules possèdent un noyau. En tant qu'eucaryote, la levure est un modèle très intéressant afin d'effectuer des études s'appliquant aux mammifères, dont l'Homme, puisqu'elles ont un fonctionnement cellulaire et biochimique extrêmement semblables. Le temps de génération très court de la levure, soit quelques heures, la disponibilité de puissants outils génétiques et biochimiques, le fait que cet organisme possède un génome haploïde et l'accessibilité d'informations sur son génôme en font un choix attrayant pour les manipulations génétiques et les études fonctionnelles. Les voies métaboliques et signalétiques des levures fonctionnent généralement de la même façon que chez les métazoaires et de nombreuses protéines comptent un homologue entre ces systèmes.

1.3 Localisation d'ARNm au bourgeon de la levure *S. cerevisiae*

La levure *Saccharomyces cerevisiae* reste à ce jour un excellent organisme modèle afin d'étudier la localisation d'ARNm puisque sa machinerie de localisation est bien caractérisée et certains facteurs de cette machinerie sont conservés chez les métazoaires (Chartrand et al., 2001). Plus d'une trentaine d'ARNm sont activement localisés à

l'extrémité du bourgeon chez la levure (Tableau 1) (Aronov et al., 2007; Shepard et al., 2003). Les protéines pour lesquelles codent ces transcrits localisés seront ultimement localisées dans divers compartiments cellulaires tels qu'au noyau de la cellule, au réticulum endoplasmique, à la mitochondrie et à la vacuole (Shepard et al., 2003). La localisation de ces ARNm au bourgeon n'est pas uniquement utilisée pour cibler ces protéines dans la cellule fille, mais aussi pour cibler des protéines au réticulum endoplasmique cortical (Aronov et al., 2007; Schmid et al., 2006), afin de permettre l'expression de certaines protéines à la membrane de la cellule fille (Takizawa et al., 2000).

Tableau 1: Liste d'ARNm localisés au bourgeon chez *S. cerevisiae*

Gènes	Fonctions
<i>ASH1</i>	Répression de la transcription
<i>BRO1</i>	Transduction des signaux de stress
<i>CLB2</i>	Cycline B
<i>CPS1</i>	Carboxypeptidase
<i>DNM1</i>	Fission mitochondriale
<i>EGT2</i>	Cellulase
<i>ERG2</i>	Isomérase de stérol
<i>IST2</i>	Transporteur membranaire
<i>MID2</i>	Récepteur membranaire
<i>MMR1</i>	Inconnue
<i>SRL1</i>	Inconnue
<i>TPO1</i>	Transport des polyamines
<i>WSC2</i>	Récepteur membranaire
<i>KSS1</i>	MAP kinase
<i>YMR171C</i>	Inconnue
<i>LCB1</i>	Synthèse des lipides
<i>MET4</i>	Coactivateur transcriptionnel
<i>MTL1</i>	Inconnue
<i>CDC42</i>	Organisation de la polarité cellulaire
<i>RHO3</i>	Organisation de la polarité et de l'actine
<i>YPT1</i>	Transport vésiculaire
<i>SEC1</i>	Exocytose
<i>SEC3</i>	Exocytose
<i>EXO84</i>	Exocytose
<i>SRO7</i>	Exocytose
<i>SRO77</i>	Exocytose
<i>SEC4</i>	Exocytose

Adapté de (Aronov et al., 2007; Shepard et al., 2003).

1.3.1 Localisation de l'ARNm *ASH1*

La localisation de l'ARNm *ASH1* est probablement l'exemple le mieux caractérisé d'un transcrit localisé. Ce transcrit, exprimé en fin d'anaphase, est localisé à l'extrémité du bourgeon en se déplaçant sur le cytosquelette d'actine avant d'être ancré au cortex d'actine (Long et al., 1997; Takizawa et al., 1997). L'ARNm *ASH1* code pour un répresseur transcriptionnel d'environ 66kDa qui est distribué de façon asymétrique (Bobola et al., 1996; Sil and Herskowitz, 1996). En effet, dans environ 80% des mitoses, Ash1p n'est présente que dans le noyau de la cellule fille, la plupart des cellules mères en étant dépourvues (Figure 2). La distribution asymétrique d'Ash1p est étroitement liée à la localisation de son transcrit, l'abolition de ce mécanisme menant à une distribution symétrique d'Ash1p (Long et al., 1997; Takizawa et al., 1997).

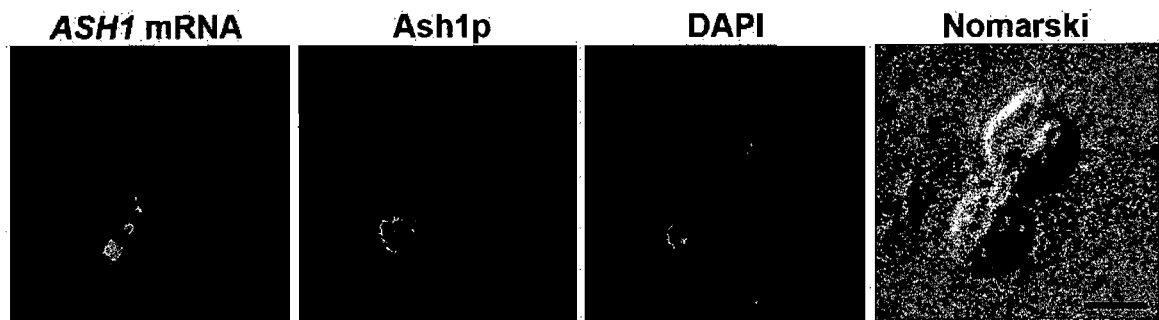


Figure 2 : Distribution de l'ARNm *ASH1* et de la protéine Ash1 chez la levure *S. cerevisiae* en fin d'anaphase.

L'ARNm *ASH1* est localisé à l'extrémité du bourgeon (jaune) alors que la protéine Ash1 est distribuée exclusivement au noyau de la cellule fille (vert). DAPI : coloration de l'ADN cellulaire (bleu). Adaptée de (Long et al., 1997)

Ash1p fonctionne en tant que répresseur transcriptionnel du gène *HO*, lui-même responsable du changement de type sexuel chez la levure (Bobola et al., 1996; Sil and Herskowitz, 1996). La levure *S. cerevisiae* existe sous deux types sexuels, soit « a » et « α » (Amon, 1996). Le mating chez la levure s'effectue grâce à la sécrétion de phéromones qui seront reconnues par des récepteurs spécifiques (Elion, 2000). Lorsqu'une cellule détecte la présence de phéromones venant d'une levure de type sexuel opposé, elle bloque son cycle cellulaire en G1 et se prépare au mating en adoptant une forme allongée, nommée schmoos (Elion, 2000; Rose, 1996). Le type sexuel d'une levure est déterminé par le gène exprimé au locus *MAT* (Haber, 1998). La protéine Ho, une endonucléase, permet d'effectuer une coupure double-brin dans le locus *MAT*, favorisant la recombinaison homologe avec une cassette silencieuse suite au clivage par la protéine Ho. En effet, le locus *MAT* est flanqué de part et d'autre de cassettes silencieuses, nommées *HMLa* à gauche et *HMRa* à droite (Haber, 1998). La recombinaison de la première cassette dans le locus *MAT* suite au clivage par la protéine Ho détermine le type sexuel « α » tandis que la deuxième détermine le type sexuel « a ». Généralement, la recombinaison se fait de façon à privilégier la cassette opposée à celle qui était présente au locus *MAT*, favorisant le changement de type sexuel (Figure 3B) (Haber, 1998; Jensen et al., 1983; Kostriken et al., 1983; Strathern et al., 1982). Le promoteur du gène *HO* contient deux URS (pour upstream regulatory sequences), soit URS1 et URS2 (Sternberg et al., 1987). Swi5p, un activateur transcriptionnel, lie l'élément URS1 et recrute le complexe SWI/SNF afin de mener à l'expression du gène *HO* (Breden and Nasmyth, 1987; Cosma, 2004; Cosma et al., 1999). Toutefois, si Ash1p lie l'élément URS2, il peut évincer Swi5p et donc inhiber l'expression de *HO* (Figure 3A) (Cosma, 2004; Cosma et al., 1999).

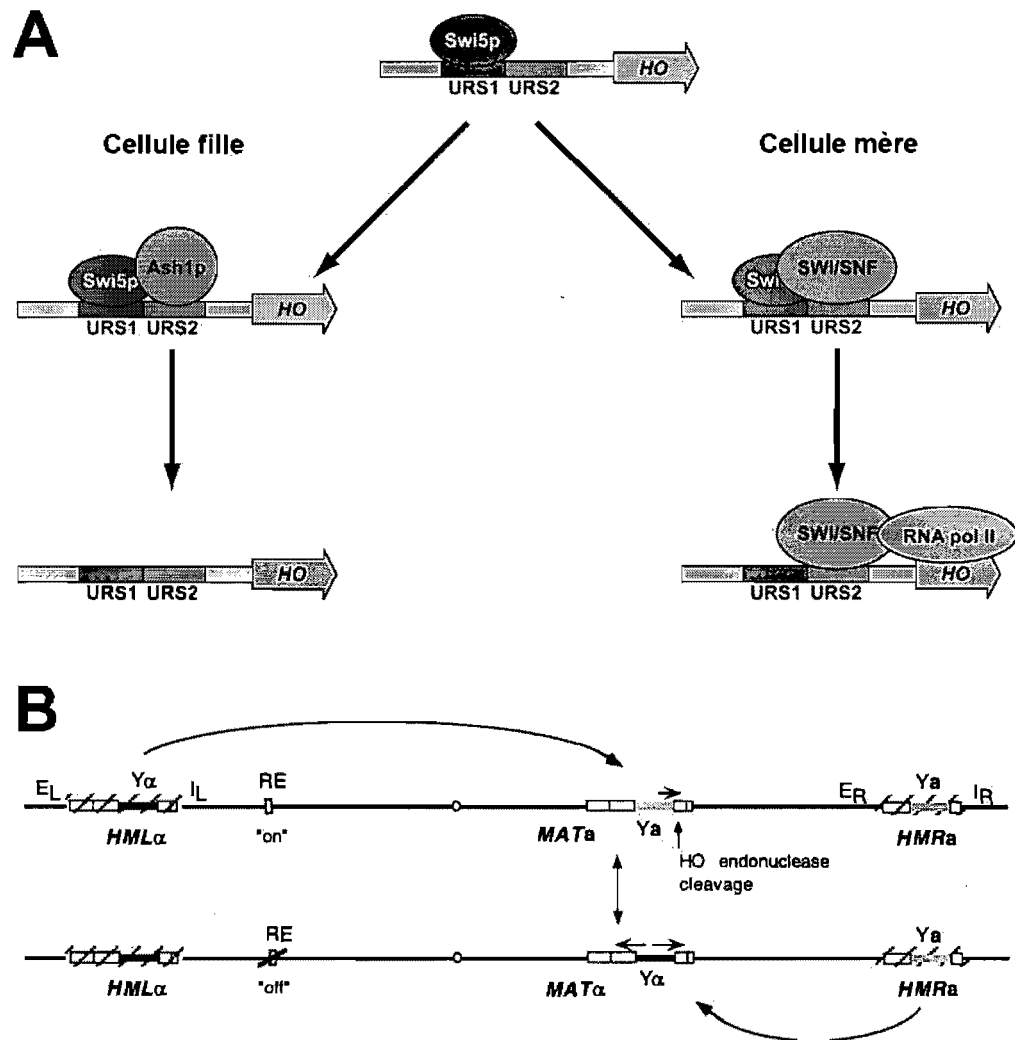


Figure 3 : Régulation de l'expression de *HO* par Ash1p et du changement de type sexuel par la protéine Ho.

A) Dans la cellule mère, la liaison de Swi5p à l'élément URS1 permet le recrutement du complexe SWI/SNF, ce qui amène l'activation de la transcription du gène *HO*. Dans la cellule fille, la liaison d'Ash1p à l'élément URS2 empêche Swi5p de rester lié à l'élément URS1, ce qui inhibe l'expression de *HO*. B) Le locus *MAT* détermine le type sexuel de la cellule alors qu'une coupure double brin induite par l'endonucléase Ho permet une recombinaison avec une des cassettes non-exprimée adjacentes. Modifiée de (Cosma et al., 1999; Haber, 1998)

L'avantage biologique conféré par Ash1p n'est pas négligeable dans la nature. En effet, en inhibant le changement de type sexuel uniquement dans la cellule fille, Ash1p favorise la formation de deux cellules de types sexuels différents à partir d'une cellule unique. Cette proximité entre une cellule « a » et une « α » après la division cellulaire permettra aux deux cellules de fusionner et générer une cellule diploïde. Ainsi, une cellule haploïde qui se retrouve isolée dans la nature sans source de nutriments peut facilement former une cellule diploïde afin de sporuler et ainsi résister aux stress environnementaux. Quand les spores atteignent une source de nourriture, elles peuvent reprendre leur cycle cellulaire normal et proliférer (Figure 4).

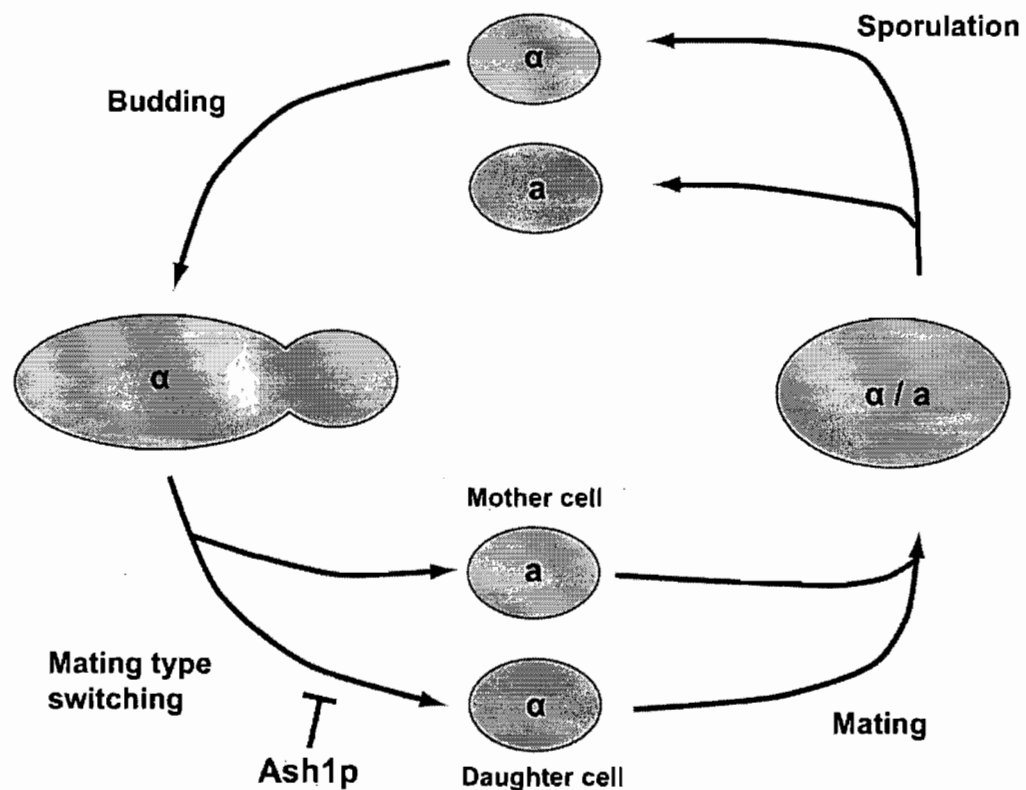


Figure 4 : Ash1p facilite la formation d'une levure diploïde en inhibant le changement de type sexuel dans la cellule fille.

La distribution asymétrique de la protéine Ash1 dépend de la localisation de son transcrite à l'extrémité du bourgeon lors de l'anaphase. Cette localisation dirigée dépend de la présence d'éléments de localisation dans la séquence de l'ARNm *ASH1* par des facteurs *trans* qui recrutent le transcrite et assurent son transport.

1.3.2 Les éléments de localisation de l'ARNm *ASH1*

La localisation de l'ARNm *ASH1* est assurée par la présence de quatre éléments de localisation dans sa séquence. Bien que les éléments de localisation se retrouvent, chez la grande majorité des ARNm localisés, dans leur 3'UTR, *ASH1* présente un cas bien particulier avec trois éléments de localisation dans sa séquence codante et un qui chevauche la séquence codante et le 3'UTR (Figure 5A) (Chartrand et al., 1999; Gonzalez et al., 1999). Il est à noter que la majorité des ARNm de levure localisés à l'extrémité du bourgeon possèdent au moins un élément de localisation dans la séquence codante (Shepard et al., 2003), ce qui semble être une particularité de cet organisme. Les quatre éléments de localisation de l'ARNm *ASH1* se nomment (Figure 5):

- Élément de localisation E1 (nucléotides 600 à 700)
 - Élément de localisation E2A (nucléotides 1100 à 1200)
 - Élément de localisation E2B (nucléotides 1250 à 1450)
 - Élément de localisation E3 (nucléotides 1750 à 1850)
- (leur position est numérotée à partir du codon d'initiation AUG, le A étant +1)

Chacun de ces éléments adopte une structure en tiges-boucles et la destruction de ces structures empêche la localisation du transcrit (Chartrand et al., 2002). Pour identifier ces éléments, plusieurs délétions du gène *ASH1*, en incluant le 5'UTR et le 3'UTR, ont été fusionnées aux gènes rapporteur *LacZ* ou GFP, et leur capacité à localiser un transcrit a été déterminée par hybridation in situ (Chartrand et al., 1999; Gonzalez et al., 1999). Malgré la présence de quatre éléments de localisation, chacun de ces quatre éléments de localisation est suffisant à la localisation d'un transcrit au bourgeon (Chartrand et al., 2002; Chartrand et al., 1999). Un transcrit comportant quatre fois l'élément de localisation E3 est aussi bien localisé qu'un transcrit type sauvage (Chartrand et al., 2002). De plus, la localisation de l'ARNm *ASH1* s'avère dépendante de sa traduction. En effet, un allèle d'*ASH1* contenant un codon de terminaison adjacent au codon d'initiation de la traduction, ce qui empêche sa traduction, induit une délocalisation partielle de l'ARNm *ASH1* (Gonzalez et al., 1999). Ceci suggère que la traduction pourrait être impliquée dans l'ancrage du transcrit à l'extrémité du bourgeon, ou que la protéine Ash1 puisse elle-même jouer un rôle dans son ancrage, soit de façon *trans*, ou bien co-traductionnellement (Gonzalez et al., 1999).

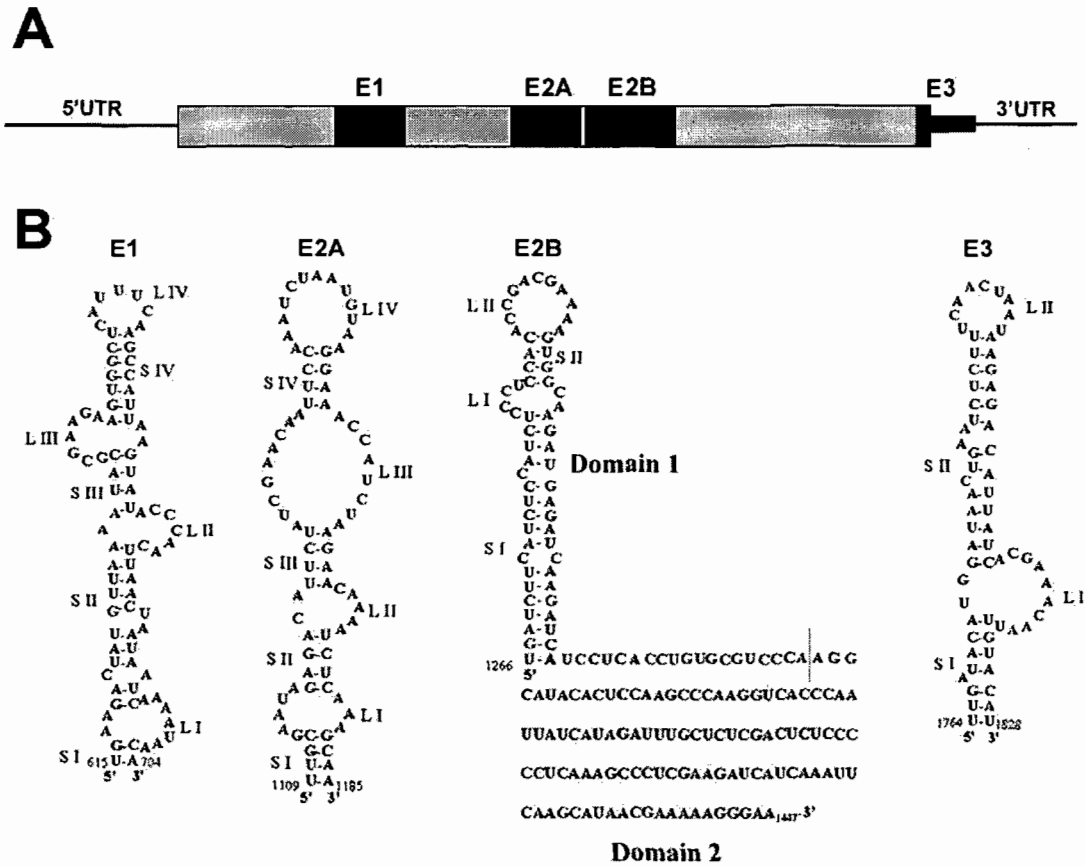


Figure 5 : Schéma des éléments de localisation de l'ARNm *ASH1* et de leur structure secondaire.

A) Position des éléments de localisation dans l'ARNm *ASH1*. B) Les éléments de localisation E1, E2A et E2B sont présents dans la séquence codante du transcrit alors que l'élément de localisation E3 chevauche la séquence codante et le 3'UTR. Adaptée de (Chartrand et al., 2002; Olivier et al., 2005)

1.3.3 La machinerie de localisation d'ARNm au bourgeon des levures

Afin d'identifier les facteurs impliqués dans la localisation de l'ARNm *ASH1* et la distribution de la protéine Ash1 chez la levure, l'équipe de Kim Nasmyth a développé un essai génétique où le promoteur du gène *HO* est inséré en amont du gène *CAN1* (Jansen et al., 1996). Ce dernier code pour l'arginine perméase, une protéine membranaire responsable de l'entrée de l'arginine dans la cellule. En faisant croître les levures sur une gélose contenant de la canavanine, un analogue toxique de l'arginine, cet essai permet d'identifier des mutants affectant la distribution asymétrique de la protéine Ash1 (Figure 6). Donc, dans le cas où Ash1p est localisée exclusivement dans le noyau de la cellule fille, il n'y aura aucune croissance sur un milieu contenant de la canavanine puisqu'à chaque division, une cellule survie et l'autre meurt. Toutefois, si la distribution d'Ash1p devient symétrique, l'expression du gène *CAN1* sera réprimée dans la cellule mère et la cellule fille, menant à une croissance exponentielle même en présence de canavanine. Cette étude a permis d'identifier cinq gènes, nommés *SHE* pour « *S*wi5p *H*O-dependent Expression », impliqués dans la ségrégation de la protéine Ash1 et la localisation de son transcrite (Jansen et al., 1996).

Ces gènes sont *SHE1/MYO4*, qui code pour une myosine de type V capable de se déplacer sur les filaments d'actine, *SHE2*, qui code pour une protéine liant les éléments de localisation de l'ARNm *ASH1*, et *SHE3*, dont la protéine sert de pont entre Myo4p et She2p. Les produits de ces trois gènes forment un complexe appelé le locosome et qui permet de bien localiser l'ARNm *ASH1*. Deux autres gènes ont été identifiés : *SHE4*, codant pour un régulateur des myosines, et *SHE5/BNI1*, une protéine impliquée dans le réarrangement du cytosquelette d'actine dans le bourgeon.

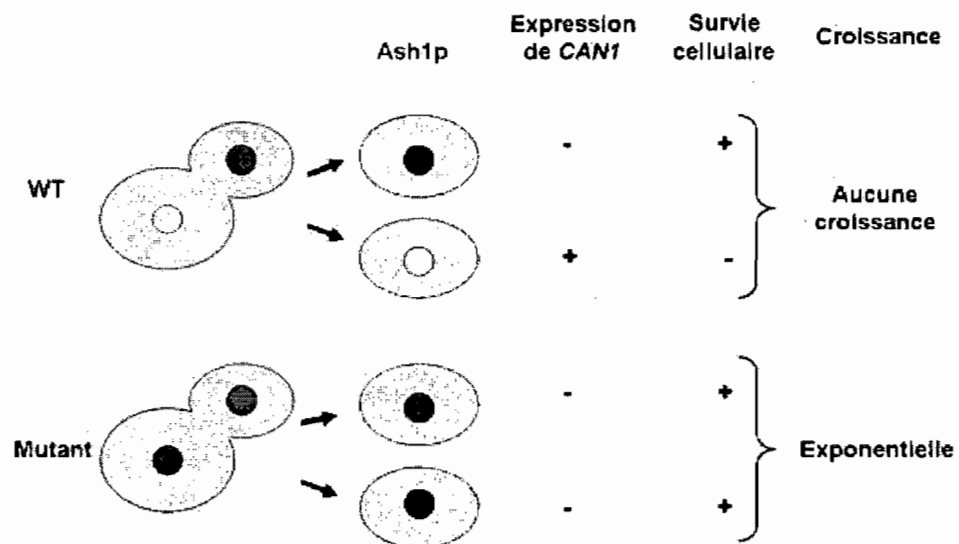


Figure 6 : Description de l'essai génétique basé sur la localisation de la protéine Ash1.

Dans la souche de type sauvage (WT), Ash1p est exclusivement présente dans le noyau de la cellule fille, réprimant *CAN1* dans celle-ci. Ainsi, à chaque division, la cellule fille survit alors que la cellule mère meurt. Il n'y aura donc aucune croissance. Lorsqu'une mutation affecte la localisation d'Ash1p et que cette protéine est présente dans les deux noyaux, *CAN1* est réprimé à la fois dans la cellule mère et la cellule fille permettant une croissance exponentielle des cellules.

1.3.4 Le moteur moléculaire She1p/Myo4p

She1p, communément nommée Myo4p, est une myosine de type V capable de transporter des cargos en se déplaçant sur les filaments du cytosquelette d'actine (Munchow et al., 1999). Ce moteur moléculaire est essentiel à la localisation d'ARNm chez la levure (Long et al., 1997). Il y a deux myosines de type V chez la levure, Myo2p et Myo4p (Reck-Peterson et al., 2000). Alors que Myo4p semble impliquée dans la localisation d'ARNm, Myo2p serait impliquée dans le transport de vésicules, de segments du Golgi et des peroxysomes vers le bourgeon des levures (Pruyne et al., 2004b). De plus, une étude récente a montré que Myo2p s'associe à de nombreux ARNm et certains constituants des P-bodies, des granules cytoplasmiques où on retrouve des ARNm dont la traduction est inactivée et des facteurs impliqués dans la dégradation des protéines (Chang et al., 2008). Ces P-bodies se forment en situation de stress cellulaire, toutefois leur formation est réversible (Sheth and Parker, 2003). Aussi, une mutation affectant la fonction de Myo2p retarde le désassemblage des P-bodies, suggérant que Myo2p participe à la relâche des transcrits des P-bodies vers la dégradation ou la traduction (Chang et al., 2008). Les myosines de type V fonctionnent généralement sous forme de dimère. Toutefois dans le cas de Myo4p, son association avec le domaine N-terminal de She3p lui confère une forme monomérique (Dunn et al., 2007; Heuck et al., 2007; Hodges et al., 2008). Par ailleurs, la queue C-terminale et le domaine coiled-coil de Myo4p sont tous deux requis afin de lier le domaine N-terminal de She3p de façon stable et efficace (Heuck et al., 2007). Des tests de processivité des moteurs moléculaires ont montré que Myo4p doit lier un cargo afin de se déplacer sur le cytosquelette d'actine et que l'ajout de façon artificielle d'un cargo *in vitro* est suffisant à rendre Myo4p mobile (Hodges et al., 2008). Ceci semble confirmé par le fait que Myo4p ne localise pas à l'extrémité du bourgeon en absence de She2p ou She3p (Kruse et al., 2002). De plus, bien que Myo4p forme un monomère, l'oligomérisation de plusieurs moteurs autour d'un cargo permet d'augmenter sa processivité (Dunn et al., 2007). Ensemble, ces résultats suggèrent que l'association de plusieurs complexes Myo4p-She3p-She2p au même transcrit d'*ASH1* à travers les quatre éléments de localisation de cet ARNm induit la processivité de Myo4p. Par ailleurs, Myo4p permet aussi le transport du réticulum endoplasmique cortical au bourgeon d'une manière indépendante de She2p (Estrada et al., 2003). Ce processus sera discuté en détail dans une section ultérieure (section 1.5).

1.3.5 She3p, un pont entre le moteur moléculaire et la liaison à l'ARNm

En plus de moduler l'oligomérisation de Myo4p, She3p sert de pont entre la protéine motrice Myo4p et She2p, une protéine liant l'ARN, interagissant avec le domaine C-terminal de cette dernière (Bohl et al., 2000; Long et al., 2000; Takizawa and Vale, 2000). Le groupe de Ralf-Peter Jansen a pu montrer à l'aide d'essais de double-hybride de levure et de précipitations GST que le domaine N-terminal de She3p lie directement la queue de Myo4p (Bohl et al., 2000). De plus, en utilisant des gradients de densité de sucrose, ils ont montré que She3p et Myo4p cofractionnent de façon indépendante de l'ARN (Bohl et al., 2000). Récemment, des études sur la processivité de Myo4p ont mené à l'hypothèse que She3p modulerait les déplacements et la spécificité de Myo4p pour son cargo en maintenant d'une part sa forme monomérique et en favorisant d'autre part son oligomérisation indirecte en liant plusieurs éléments de localisation à travers la protéine She2 (Dunn et al., 2007; Hodges et al., 2008). Il est aussi possible que l'oligomérisation de Myo4p soit le résultat de l'association de plusieurs ARNm activement localisés dans une même granule compacte, ce qui augmenterait la processivité de Myo4p en favorisant son homo-association.

1.3.6 Liaison des ARNm localisés par She2p

She2p est une protéine liant l'ARN, presque exclusivement formée d'hélices alpha, formant un motif basique en épingle à cheveux, et elle ne compte aucun homologue connu à l'exception de son équivalent chez d'autres levures (Niessing et al., 2004). Tout comme les autres gènes *SHE*, *SHE2* a été identifié grâce au criblage génétique effectué par Ralf-Peter Jansen lors de son stage post-doctoral dans le laboratoire de Kim Nasmyth (Jansen et al., 1996). Bien que ces études basées sur l'essai génétique ont montré l'importance du gène *SHE2* dans la distribution de la protéine Ash1 et la localisation de l'ARNm *ASH1*, la fonction de She2p n'était pas connue. Grâce à des études de changement de mobilité électrophorétique (Electrophoretic Mobility Shift Assay, ou EMSA) ainsi que des études de double-hybride et triple-hybride de levure, de nouvelles informations sur le rôle de cette protéine ont été mises à jour (Bohl et al., 2000; Long et al., 2000; Olivier et al., 2005).

Le double-hybride et le triple-hybride de levure sont des méthodes d'analyse d'interaction entre deux protéines (double hybride) ou entre une protéine et un ARN d'intérêt (triple hybride) (Fields and Song, 1989; SenGupta et al., 1996). Ces techniques se basent sur la fusion d'un des facteurs d'intérêt avec un domaine de liaison à l'ADN (des protéines LexA ou GAL4), ainsi que la fusion de l'autre protéine avec un domaine d'activation de la transcription (GAL4). L'élément de liaison du domaine de liaison à l'ADN est présent dans le promoteur de gènes rapporteurs. Dans l'éventualité où les deux protéines interagissent, le domaine d'activation et le domaine de liaison à l'ADN sont mis en contact et les gènes rapporteurs en aval sont exprimés, ce qui permet de sélectionner les interactions positives (Figure 7A). Pour le triple-hybride de levure, le principe de fonctionnement est très similaire, mais comporte un hybride supplémentaire, soit l'ARN d'intérêt. Dans ce cas, l'ARN en question est exprimé en fusion avec les tiges-boucles de l'ARN viral MS2. Ces structures sont spécifiquement reconnues par la protéine MCP (pour MS2 Coat Protein) qui est fusionnée à un domaine de liaison à l'ADN. Ainsi, si l'ARN d'intérêt interagit avec la protéine étudiée, les gènes rapporteurs seront exprimés (Figure 7B).

La fonction de She2p a été élucidée grâce à un criblage d'une banque de vecteurs d'expression visant à identifier une protéine pouvant lier l'élément de localisation E3 de l'ARNm *ASH1* (Long et al., 2000). La protéine identifiée à l'issue de cette expérience s'est avérée être le domaine C-terminal de She3p. Étrangement, aucun des clones isolés ne contenait la séquence codante complète de *SHE3*. Une version complète de She3p a été testée et bien qu'elle interagissait avec l'élément de localisation E3, la force de l'interaction était de loin inférieure à celle du domaine C-terminal de She3p (Long et al., 2000). Des essais de triple-hybride dans des souches délétées des gènes *SHE* ont montré que *SHE2* est essentiel à l'association entre She3p et l'ARNm *ASH1 in vivo* et que la délétion de *MYO4* augmente par quatre fois l'interaction de la version complète de She3p avec l'élément E3 (Long et al., 2000). Ceci s'explique par le fait que le domaine N-terminal de She3p lie spécifiquement et directement Myo4p, ce qui retient She3p sur le cytosquelette d'actine. Puisque le triple-hybride de levure requiert une étape transcriptionnelle au noyau, ceci empêche le bon fonctionnement du système. L'association entre She3p et l'élément de localisation E3 étant dépendante de She2p, des tests d'interaction par double-hybride de levure entre le domaine C-terminal de She3p et She2p ont montré que les deux protéines

interagissent bien *in vivo* et que cette interaction est indépendante de la présence de l'ARNm *ASH1* (Long et al., 2000). De plus, des précipitations GST ont permis de prouver leur interaction *in vitro* en utilisant des protéines recombinantes (Bohl et al., 2000).

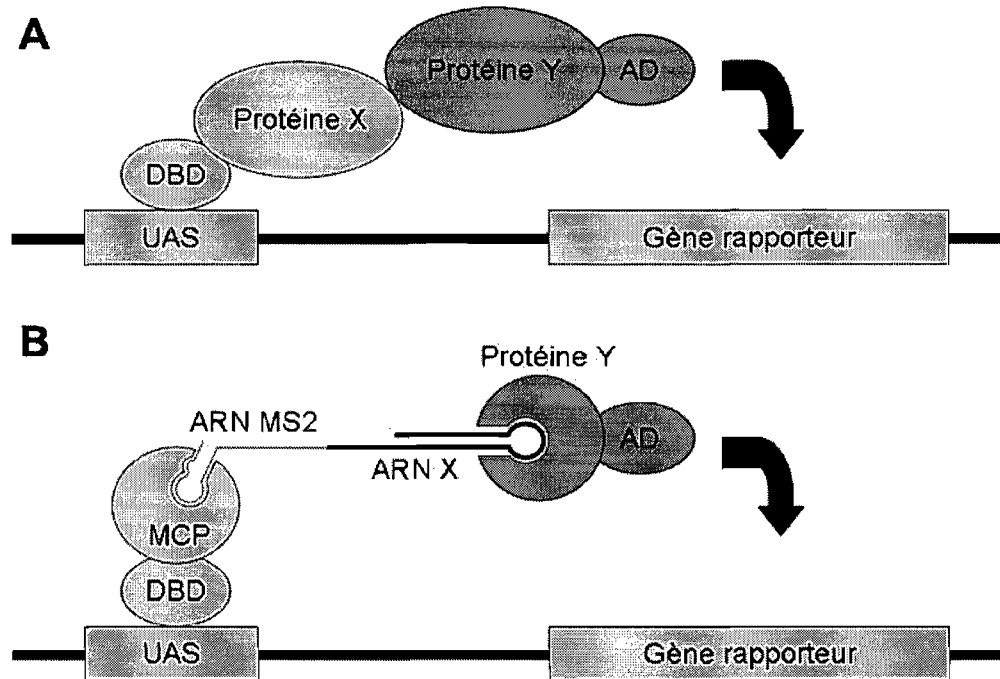


Figure 7 : Description des essais de double-hybride et triple-hybride chez la levure.

A) Double-hybride de levure : L'expression de la fusion de la protéine X avec un domaine de liaison à l'ADN (DBD) spécifique pour l'élément UAS (pour upstream activating sequence) et d'une fusion de la protéine Y avec un domaine d'activation de la transcription (AD) permet l'expression du gène rapporteur seulement si les deux protéines d'intérêt interagissent ensemble. B) Triple-hybride de levure : L'ARN d'intérêt est fusionné avec les tiges-boucles de l'ARN viral MS2 qui sont liées spécifiquement par la protéine MCP fusionnée avec le domaine de liaison à l'ADN (DBD). Si la fusion de la protéine Y avec le domaine d'activation de la transcription (AD) interagit avec l'ARN étudié, le gène rapporteur sera exprimé. Modifiée de (Fields and Song, 1989; SenGupta et al., 1996)

Ainsi, tous ces indices menèrent à l'hypothèse que She2p pourrait bien être la protéine liant l'ARNm *ASH1* et permettrait son association à She3p. Cette idée fut vérifiée à l'aide d'essais de changement de mobilité électrophorétique (EMSA) qui ont montré que She2p lie directement l'élément de localisation E3 et non les mutants qui détruisent la structure secondaire de cet élément (Bohl et al., 2000; Long et al., 2000; Olivier et al., 2005). De plus, ces études d'EMSA montrèrent que She3p ne lie pas l'ARNm *ASH1 in vitro*, mais que She3p favorise la liaison de She2p à l'ARNm *ASH1* (Bohl et al., 2000). Aussi, en utilisant des essais d'hybridation *in situ* (FISH), il fut montré que *SHE2* est nécessaire à la bonne localisation de l'ARNm *ASH1*, mais aussi à celle d'un rapporteur *LacZ* fusionné avec n'importe lequel des quatre éléments de localisation de l'ARNm *ASH1* (Long et al., 2000). Afin de vérifier si le seul rôle de She2p est de faire le lien entre l'ARNm *ASH1* et le complexe moteur She3p-Myo4p, une fusion de She3p-MCP fut utilisée sur un ARNm *ASH1* contenant des tiges-boucles MS2. Ceci mena à la conclusion que la liaison artificielle de She3p à l'ARNm *ASH1* est suffisante à sa localisation à l'extrémité du bourgeon (Long et al., 2000). Par ailleurs, la surexpression de l'ARNm *ASH1* est suffisante pour causer une accumulation de She2p à l'extrémité du bourgeon, indiquant que She2p se déplace au bourgeon de façon dépendante de l'ARNm qu'il lie (Bohl et al., 2000).

Grâce à la résolution de la structure cristalline de She2p et un test de chromatographie d'exclusion de taille, nous savons que She2p lie l'ARNm *ASH1* sous forme de dimère (Niessing et al., 2004). Le motif d'ARN reconnu par She2p a été caractérisé grâce à des expériences de SELEX (pour Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) (Jambhekar et al., 2005; Olivier et al., 2005). Le motif obtenu consiste en une cytosine et un triplet CGA, séparés par une tige de quatre à cinq paires de bases. La distance entre les deux cytosines est cruciale et est d'environ 28Å (Olivier et al., 2005). Ce motif est présent dans les éléments de localisation E1, E2A et E2B alors que le motif de l'élément E3 ne compte que deux cytosines séparées par 28Å (Figure 8). She2p lie tous les ARNm localisés et ce motif a pu être identifié dans les éléments de localisation des ARNm *IST2* et *YMR171C* (Olivier et al., 2005). Toutefois, malgré une compréhension grandissante du motif de localisation reconnu par She2p (Figure 9), la constitution d'un élément de localisation minimal n'a pas encore été possible. She2p localise une trentaine d'ARNm de levure en plus de s'associer avec plus de vingt transcrits dont la localisation n'a pas encore été vérifiée (Oeffinger et al., 2007; Shepard et al., 2003).

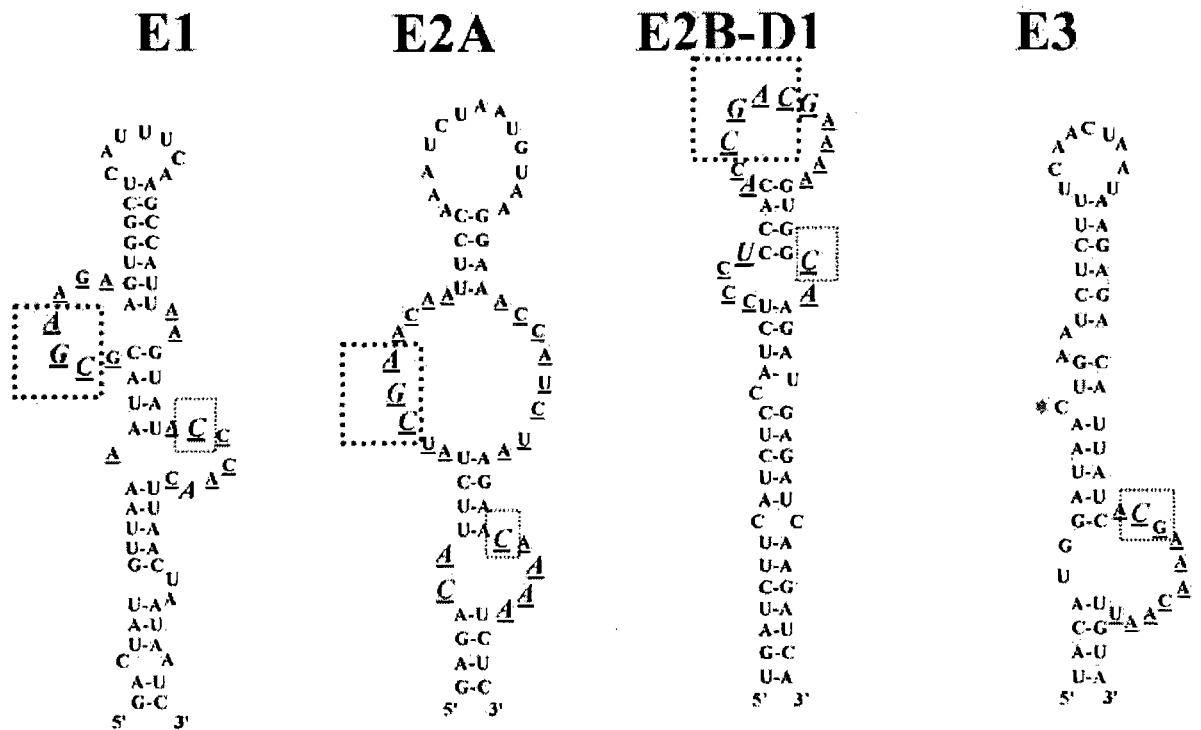


Figure 8 : Motifs de liaison de She2p dans les éléments de localisation de l'ARNm *ASH1*.

Les nucléotides encadrés sont ceux dont la présence est requise afin que She2p puisse lier ces éléments. Dans tous les cas, sauf pour l'élément de localisation E3, il s'agit d'une cytosine séparé d'un triplet CGA par 28Å. Pour l'élément de localisation E3, le même motif est présent, mais ne semble pas être entièrement essentiel à la liaison de She2p. Adaptée de (Olivier et al., 2005)

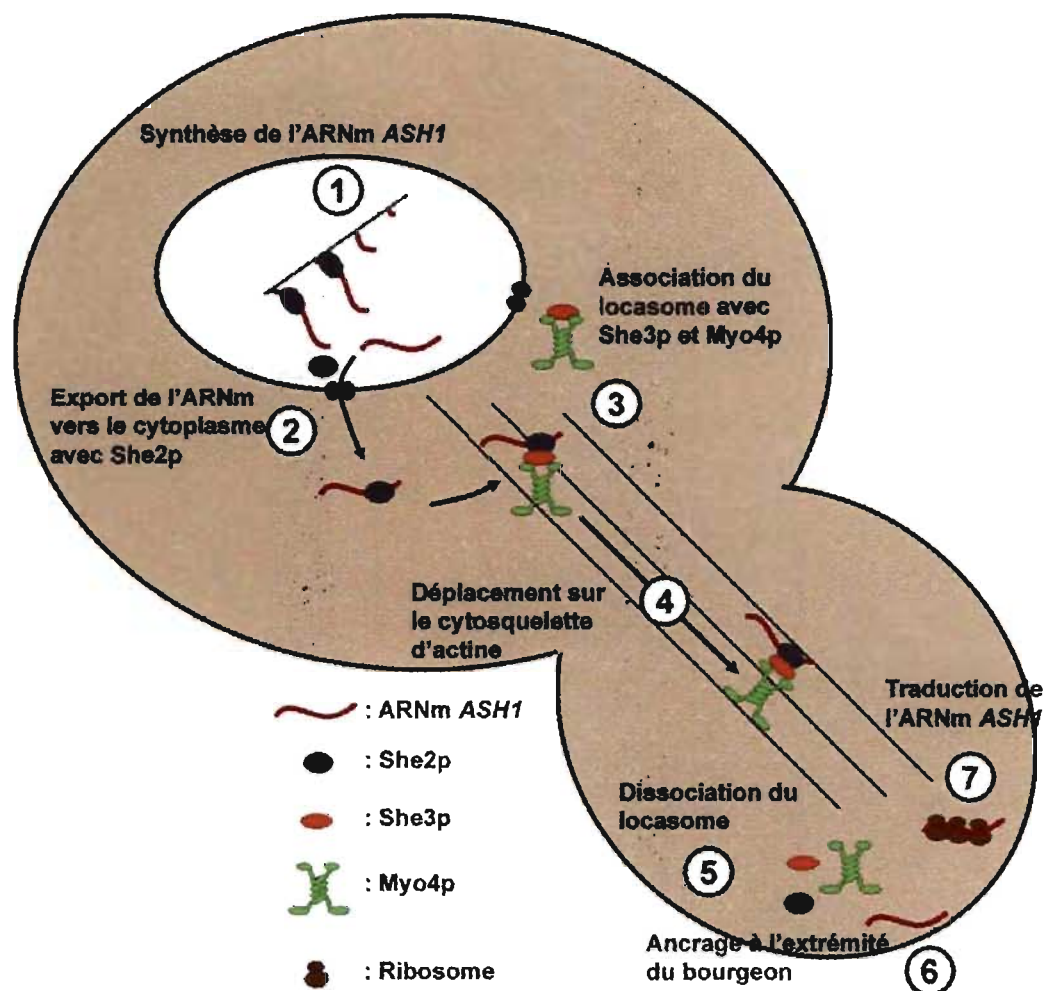


Figure 9 : Modèle de la localisation de l'ARNm *ASH1*.

L'ARNm *ASH1* est transcrit dans le noyau où il est recruté par She2p (1). Le complexe She2p-ARNm *ASH1* est ensuite exporté vers le cytoplasme (2) avant de s'associer avec le reste du locasome (3). Le complexe RNP se déplace vers l'extrémité du bourgeon via le cytosquelette d'actine (4). Une fois arrivé à destination, le complexe se dissocie (5), l'ARNm *ASH1* est ancré au bourgeon (6) où il est traduit de façon locale (7), menant à la présence d'Ash1p uniquement dans le noyau de la cellule fille. Adaptée de (Chartrand et al., 2001)

Les résidus de She2p impliqués dans la liaison à l'ARN ont été identifiés et ne correspondent à aucun domaine de liaison à l'ARN consensus connu (Olivier et al., 2005). Ces résidus sont présents dans la portion N-terminale de She2p et leur mutation empêche non seulement la liaison de She2p à l'ARNm *ASH1*, mais aussi la localisation de ce transcrit (Gonsalvez et al., 2003) sans affecter la localisation nucléocytoplasmique de She2p (Gonsalvez et al., 2003). Les mutations les mieux caractérisées sont les mutants N36S et R63K, qui abolissent tous deux la liaison aux éléments de localisation *in vivo* et *in vitro*, mais conservent toutefois leur liaison à She3p, indiquant que la liaison d'un ARNm n'est pas nécessaire à l'association de She2p et She3p (Gonsalvez et al., 2003). Par ailleurs, dans une souche où She2p ne peut plus lier l'ARNm *ASH1*, ni She3p ni Myo4p ne sont distribués de façon asymétrique, confirmant la nécessité du complexe moteur à lier un cargo afin de se déplacer sur les filaments d'actine (Gonsalvez et al., 2003). Malgré l'interaction de She2p avec le complexe She3p-Myo4p, il semble que l'hétérotrimère She2p-She3p-Myo4p constitue une sous-population minoritaire du complexe She3p-Myo4p (Gonsalvez et al., 2004). La liaison forcée de She2p à l'ARNm *ASH1*, à l'aide du système MCP/tiges-boucles MS2 inhibe l'ancrage de l'ARNm *ASH1* suite à sa localisation (Gonsalvez et al., 2004). En tenant compte de ce résultat et du fait que l'accumulation de She2p à l'extrémité du bourgeon est dépendante de la surexpression de l'ARNm *ASH1*, ceci suggère qu'une réorganisation du complexe She2p-She3p-Myo4p est nécessaire à la bonne localisation et à l'ancrage du transcrit (Bohl et al., 2000; Gonsalvez et al., 2004).

1.3.7 She4p, un modulateur du déplacement de myosines

Des études de double-hybride de levure ont montré que She4p, une protéine contenant un domaine UCS (pour UNC-45/CRO1/SHE4), peut lier plusieurs types de myosines chez la levure. En effet, She4p lie les moteurs moléculaires Myo3p, Myo5p (des myosines de type I) et Myo4p (une myosine de type V), mais pas Myo2p (une myosine de type V), en plus d'être nécessaire au fonctionnement et à la localisation de Myo4p dans la cellule (Toi et al., 2003; Wesche et al., 2003). De plus, un test de double-hybride entre le domaine moteur de Myo3p et l'actine montre que cette interaction est stimulée par la présence de She4p (Toi et al., 2003). Par ailleurs, *SHE4* semble jouer un rôle dans l'organisation du cytosquelette d'actine puisqu'une double délétion entre *SHE4* et des gènes du complexe Arp2/3, impliqués dans la régulation de l'actine, arborent un phénotype

de létalité synthétique (Toi et al., 2003). La délétion de *SHE4* affecte la localisation de l'ARNm *ASH1* et la distribution d'Ash1p, alors que la protéine She4 est elle-même distribuée de façon asymétrique à l'extrémité du bourgeon par Myo2p (Jansen et al., 1996; Long et al., 1997; Wesche et al., 2003). Il semble toutefois que la liaison de She4p aux myosines est indépendante de sa localisation au bourgeon (Wesche et al., 2003).

1.3.8 Maintenir l'organisation des filaments d'actine grâce à She5p/Bni1p et Bnr1p

She5p/Bni1p, aussi identifiée en tant que protéine affectant l'expression normale de *HO* (Jansen et al., 1996), est une formine impliquée dans la stabilité et la maintenance de l'organisation du cytosquelette d'actine au bourgeon. Les formines fonctionnent en nucléant les filaments d'actine non-branchés et participent à la polymérisation des filaments indépendamment du complexe Arp2/3 (Pruyne et al., 2002). Dans une souche *she5*, l'ARNm *ASH1* est localisé au bourgeon, mais est ensuite relocalisé à la jonction de la cellule mère et de la cellule fille (Long et al., 1997). Ceci pourrait être la conséquence d'une dépolymérisation de l'actine dans le bourgeon qui empêcherait l'ancrage de l'ARNm localisé arrivant à l'extrémité du bourgeon. Il existe deux formines chez la levure, soit She5p et Bnr1p (Pruyne et al., 2004a). Bien que ces deux protéines possèdent une activité semblable, elles affichent une distribution cellulaire différente avec She5p présente dans le bourgeon et Bnr1p à la jonction de la cellule mère et de la cellule fille (Pruyne et al., 2004a). Ces distributions permettent à She5p d'assembler les filaments d'actine dans le bourgeon alors que ceux dont la polymérisation est modulée par Bnr1p s'étendent dans la cellule mère (Pruyne et al., 2004a). Aussi, She5p est liée par la protéine Bud6 qui stimule la fonction de cette première (Moseley and Goode, 2005). Par ailleurs, la délétion de Bud6p affecte la localisation de l'ARNm *ASH1* de la même manière que la délétion de She5p, soit en relocalisant la particule de l'ARNm *ASH1* à la jonction de la cellule mère et de la cellule fille (Beach and Bloom, 2001). She5p et Bud6p seraient donc impliqués dans l'organisation du cytosquelette d'actine dans le bourgeon et possiblement dans l'ancrage de l'ARNm *ASH1* à l'extrémité du bourgeon (Beach and Bloom, 2001).

1.3.9 Loc1p, une protéine du nucléole qui influence la distribution de l'ARNm *ASH1* et de la protéine Ash1

Originellement identifiée dans un criblage de triple-hybride de levure comme une protéine pouvant lier l'élément de localisation E3 de l'ARNm *ASH1*, Loc1p s'est avérée être une protéine aux multiples rôles (Long et al., 2001). En effet, bien que Loc1p lie bien l'ARN double brin et s'associe à l'ARNm *ASH1 in vivo*, elle est exclusivement nucléaire et fait partie du complexe de maturation de la sous-unité 60S du ribosome (Harnpicharnchai et al., 2001; Horsey et al., 2004; Long et al., 2001; Urbinati et al., 2006). La délétion de *LOC1* induit la délocalisation de la protéine Ash1 et de son transcrite, en plus d'augmenter de façon significative les niveaux d'expression d'Ash1p (Komili et al., 2007; Long et al., 2001). Récemment, les travaux effectués dans le laboratoire de Roy Long ont montré que Loc1p s'accumule principalement au nucléole et participe à l'export des sous-unités 60S du ribosome en plus d'être importante pour la maturation et la synthèse de l'ARNr 25S (Urbinati et al., 2006). Sa fonction dans la localisation de l'ARNm *ASH1* est encore inconnue.

1.3.10 Localisation de l'ARNm *IST2* et distribution de la protéine Ist2

Plusieurs protéines dont le transcrite est localisé à l'extrémité du bourgeon sont ancrées à la membrane ou contiennent une portion transmembranaire (Shepard et al., 2003). L'exemple le mieux caractérisé chez la levure est possiblement la localisation de l'ARNm *IST2* (pour Increased Sodium Tolerance). Ist2p est une protéine membranaire, très semblable à un transporteur de sodium ou de calcium, impliquée dans la tolérance osmotique de la cellule (Entian et al., 1999; Takizawa et al., 2000). L'ARNm *IST2* est localisé par le locosome tout comme l'ARNm *ASH1*, toutefois la protéine Ist2p n'est pas exclusivement présente dans la cellule fille. En effet, la cellule mère arbore aussi Ist2p à sa membrane. Dans ce cas, la localisation du transcrite permet d'augmenter l'accumulation de la protéine dans la cellule fille puisque les protéines membranaires ne peuvent pas diffuser de la cellule mère à la cellule fille en raison de l'anneau de septine qui agit comme barrière (Takizawa et al., 2000). La délétion de *SHE2*, qui empêche la localisation de l'ARNm *ASH1*, abolit la présence d'Ist2p à la membrane du bourgeon sans affecter sa distribution dans la cellule mère (Juschke et al., 2004; Takizawa et al., 2000). Aussi, il semble que la

protéine Ist2 soit capable d'atteindre la membrane plasmique par une voie indépendante de la voie classique de sécrétion grâce à un signal peptidique présent dans la protéine, mais la caractérisation de cette nouvelle voie reste incomplète (Franz et al., 2007; Juschke et al., 2005). L'élément de localisation de l'ARNm *IST2*, correspondant au motif de liaison de She2p dans les éléments de localisation de l'ARNm *ASH1*, se situe à la fin de la séquence codante du transcrit (Olivier et al., 2005).

1.4 Régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1*

Afin d'éviter une expression ectopique de la protéine Ash1, des mécanismes sont présents afin d'assurer une régulation précise de l'expression d'Ash1p de telle façon que l'ARNm *ASH1* n'est traduit qu'une fois localisé au bourgeon de la cellule fille. Pour ce faire, divers facteurs sont nécessaires.

1.4.1 Effet de la position des éléments de localisation sur la traduction de l'ARNm *ASH1*

Des études de mutagenèse des éléments de localisation de l'ARNm *ASH1* menées par le groupe de Robert H. Singer ont montré que bien que l'ARNm *ASH1* contient quatre éléments de localisation différents, ces éléments ont des fonctions redondantes (Chartrand et al., 2002). Bien que la mutation des quatre éléments de localisation à la fois mène à une délocalisation totale de l'ARNm *ASH1*, la présence d'un seul élément permet une distribution de ce transcrit au bourgeon (Chartrand et al., 2002; Long et al., 2000). La présence de multiples éléments de localisation accentue le phénotype de localisation. Ainsi, un ARNm rapporteur contenant quatre éléments de localisation sera bien localisé à l'extrémité du bourgeon alors qu'un ARNm n'ayant qu'un seul élément sera présent dans la totalité du bourgeon (Chartrand et al., 2002). Aussi, plus le nombre d'éléments de localisation est élevé, plus le phénotype de distribution asymétrique d'Ash1p est fort. Ce résultat est surprenant puisque l'ARNm contenant un seul élément de localisation est localisé au bourgeon de façon efficace, mais la protéine Ash1 en résultant n'affiche une distribution asymétrique que dans environ 40% des cellules, contre 80% pour une souche type sauvage. La présence de deux éléments augmente ce phénotype à environ 45% alors

que l'inclusion de trois éléments affiche une distribution asymétrique dans environ 60% des cellules (Chartrand et al., 2002).

Ceci a mené à l'hypothèse que les éléments de localisation pourraient avoir un effet sur la traduction de l'ARNm *ASH1* en plus d'être essentiels à la localisation par le locosome. Afin de tester cette hypothèse, les quatre éléments de localisation de l'ARNm *ASH1* ont été transposés dans le 3'UTR. Les mutations utilisées afin de détruire les éléments de localisation dans la séquence codante ont été soigneusement choisies afin de conserver non seulement le cadre de lecture, mais aussi la séquence en acides aminés de la protéine. Le transcrit en résultant code donc pour une protéine Ash1 identique à la version de type sauvage en plus de contenir la même quantité de codons rares que la version endogène. Les tests effectués avec cette nouvelle construction ont montré que bien que la présence des quatre éléments de localisation dans le 3'UTR permet une localisation parfaite du transcrit au bout du bourgeon, la distribution de la protéine Ash1 est largement affectée (Chartrand et al., 2002). Ainsi, seulement 40% des cellules affichent une distribution asymétrique d'Ash1p dans cette situation (Chartrand et al., 2002). Ceci a mené à l'hypothèse que la transposition des éléments de localisation dans le 3'UTR pourrait affecter le moment de la traduction de l'ARNm *ASH1* puisque malgré sa bonne localisation, la protéine Ash1 est présente dans le noyau de la cellule mère. Afin de vérifier cette hypothèse, une petite tige-boucle a été introduite dans le 5'UTR de l'ARNm contenant les éléments de localisation dans son 3'UTR. Cette tige-boucle est assez courte pour ne pas complètement inhiber la traduction de l'ARNm *ASH1*, mais forme une structure assez forte pour ralentir le taux de traduction de l'ARNm *ASH1*. L'addition de cette tige-boucle a permis de montrer qu'une diminution de la traduction de l'ARNm est corrélée à une augmentation de la distribution asymétrique d'Ash1p (Chartrand et al., 2002). La possibilité que la liaison de She2p aux éléments de localisation dans la séquence codante puisse affecter la progression du ribosome et ainsi augmenter la distribution asymétrique de la protéine Ash1 a été vérifiée en produisant une souche délétée de *SHE2*, mais cette délétion n'affecte pas les niveaux d'expression d'Ash1p (Chartrand et al., 2002). Il semble donc que la structure des éléments de localisation de l'ARNm *ASH1* présents dans la séquence codante soit suffisante au ralentissement de la progression des ribosomes sur le transcrit, permettant une meilleure distribution d'Ash1p.

1.4.2 Effet de Khd1p sur l'expression d'Ash1p

Afin d'identifier de nouvelles protéines nécessaires à la localisation de l'ARNm *ASH1*, le groupe de recherche d'Ira Herskowitz s'est intéressé à deux familles de protéines liant l'ARN, soit les protéines de la famille PUF et celles qui contiennent des domaines KH (Irie et al., 2002). Les domaines KH sont des domaines de liaison à l'ARN homologues à ceux de la protéine hnRNP K (Siomi et al., 1993). Ces domaines possèdent généralement une affinité pour les régions d'acide ribonucléique simple brin riches en cytosine et en uracile (Denisenko and Bomsztyk, 2002). Tout d'abord, afin d'évaluer l'effet de ces protéines sur la localisation de l'ARNm *ASH1*, des expériences d'hybridation *in situ* ont été réalisées sur l'ARNm *ASH1* dans des souches délétées de l'un des gènes suivant : *PUF1*, *PUF2*, *PUF3*, *PUF4*, *PUF5*, *SCP160*, *PBP2* et *KHD1*. De ces souches, seules les souches *puf5*, *scp160* et *khd1* affichaient un défaut de localisation de l'ARNm *ASH1* (Irie et al., 2002). Aussi, afin de favoriser les chances de trouver une protéine ayant un effet direct sur l'ARNm *ASH1*, la colocalisation de Puf5p, Scp160p et Khd1p avec l'ARNm *ASH1* a été étudiée. En utilisant un système d'hybride permettant d'une part de suivre l'ARNm d'intérêt par fluorescence et d'autre part les protéines contenant un épitope myc par immunofluorescence, les auteurs ont montré que seule Khd1p était présente à l'extrémité du bourgeon avec l'ARNm *ASH1* (Irie et al., 2002). Bien que cette expérience ne permette pas d'exclure que Puf5p et/ou Scp160p affectent l'ARNm *ASH1* avant sa localisation, elle suggérerait fortement que Khd1p joue un rôle dans la distribution de l'ARNm *ASH1*. Des mutants de délétion de l'ARNm *ASH1* ont permis de montrer que les 800 premiers nucléotides de la séquence codante sont nécessaires à la colocalisation de Khd1p et du transcrit. She3p colocalise quant à lui avec tous les fragments de l'ARNm *ASH1*, pourvu qu'ils contiennent au moins un élément de localisation (Irie et al., 2002). Le fait que Khd1p n'interagisse pas avec tous les éléments de localisation suggère que son rôle est distinct de celui du locosome. Après avoir vérifié que Khd1p interagissait bien avec l'ARNm *ASH1* *in vivo* grâce à des essais d'immunoprécipitation et de RT-PCR (Irie et al., 2002), l'effet de Khd1p sur la modulation de l'expression de *HO* a été étudié en utilisant l'essai génétique développé par l'équipe de Kim Nasmyth (Figure 6). Bien que la délétion de *KHD1* n'ait aucun effet sur l'expression des gènes rapporteurs dans cet essai, la délétion dans une souche contenant une version mutante de *MYO4* accentue le phénotype de cette dernière (Irie et al., 2002). De plus, la surexpression de Khd1p antagonise la réduction de

l'expression de HO causée par la délétion de *SHE3* ou de *MYO4* (Irie et al., 2002). Ceci suggère à la fois que *KHDI* affecte l'ARNm *ASH1* d'une façon différente des gènes *SHE* et que *KHDI* interagit génétiquement avec ceux-ci.

La preuve que Khd1p affecte la traduction de l'ARNm *ASH1* est venue d'une expérience de surexpression montrant que l'induction de l'expression de Khd1p sur un promoteur *GALI* cause une diminution de l'expression d'Ash1p sans toutefois réduire les niveaux de l'ARNm *ASH1* (Irie et al., 2002). De plus, le lien entre la localisation de l'ARNm *ASH1* et sa traduction a été également montré grâce à un allèle d'*ASH1* qui ne contient pas de codon initiateur. Bien que cet ARNm ne soit pas traduit, le transcrit est bien présent dans les cellules. Cet allèle est majoritairement dans le bourgeon, mais ne forme pas de croissant à l'extrémité du bourgeon, contrairement à la forme endogène de l'ARNm *ASH1* (Irie et al., 2002). Toutefois, le rôle spécifique de Khd1p demeure spéculatif. Des études récentes explorant la phosphorylation des protéines de levure ont identifié Khd1p comme une phosphoprotéine *in vivo* et *in vitro* (Chi et al., 2007; Li et al., 2007; Ptacek et al., 2005). Toutefois, le rôle de ces modifications post-traductionnelles reste à déterminer. Aussi, il semble que l'ARNm *ASH1* ne soit pas le seul transcrit à être lié par Khd1p, puisque Gerber et collaborateurs rapportent qu'au moins une vingtaine de transcrits seraient ciblés par Khd1p (Gerber et al., 2004).

1.4.3 Puf6p réprime la traduction de l'ARNm *ASH1*

En 2004, le groupe de recherche de Robert H. Singer identifie de nouveaux facteurs présents avec le locosome et l'ARNm *ASH1*. Afin de purifier le complexe ribonucléoprotéique (RNP) de l'ARNm *ASH1*, ils ont utilisé une fusion de She2p avec un étiquette TAP (Gu et al., 2004). L'épitope TAP (pour tandem affinity purification) permet de purifier un complexe protéique d'intérêt grâce à une double chromatographie d'affinité. Les interactants ainsi purifiés sont ensuite traités à la trypsine et séquencés par spectrométrie de masse. Grâce à cette technique, l'association de Puf6p à She2p et son complexe RNP a été montrée (Gu et al., 2004). Des analyses de séquence dans le 3'UTR de l'ARNm *ASH1* ont montré la présence de sites de liaison des protéines PUF, soit la séquence UUGU. Ces séquences sont présentes quelques nucléotides en aval du codon de terminaison et font partie de l'élément de localisation E3, le seul élément de localisation de

l'ARNm *ASH1* à ne pas être entièrement dans la séquence codante (Gu et al., 2004). Afin de vérifier *in vivo* l'association de Puf6p avec ces séquences dans le 3'UTR de l'ARNm *ASH1*, le gène rapporteur *LacZ* a été exprimé en fusion avec l'élément de localisation E1 ou E3. Les analyses de microscopie montrent que l'élément E3 est nécessaire à la colocalisation de Puf6p avec le rapporteur, mais aussi que Puf6p, bien que majoritairement nucléaire, est présente à l'extrémité du bourgeon avec l'ARNm *ASH1* (Gu et al., 2004). La colocalisation de l'ARNm *ASH1* avec Puf6p suggère fortement que Puf6p peut lier l'ARNm *ASH1*, toutefois la possibilité que cette association soit faite par l'intermédiaire de She2p ne peut être exclue. Afin de répondre à cette question, des essais de changement de mobilité électrophorétique (EMSA) ont été réalisés, montrant que Puf6p peut directement lier l'élément de localisation E3 *in vitro* (Gu et al., 2004). L'interaction entre Puf6p et l'ARNm *ASH1 in vivo* a été confirmée par des essais d'immunoprécipitation suivis de réactions de RT-PCR (Gu et al., 2004).

Ainsi, Puf6p lie directement l'ARNm *ASH1* et s'associe avec She2p, mais n'est spécifique qu'à l'élément de localisation E3, suggérant que malgré son association avec She2p, Puf6p a une fonction différente du locosome tout comme Khd1p. Puisque Khd1p affecte les niveaux d'expression d'Ash1p, l'effet de Puf6p sur ces niveaux a été vérifié. La délétion de *PUF6* mène à une augmentation d'environ 250% de l'expression d'Ash1p, un effet qui est égal à celui de la mutation de l'élément de localisation E3 alors que ces mutations n'affectent en rien les niveaux de transcrit *d'ASH1* (Gu et al., 2004). Ainsi, l'effet de Puf6p sur les niveaux d'expression d'Ash1p a lieu à un stade post-transcriptionnel. De plus, la surexpression de Puf6p à l'aide d'un promoteur inductible a le même effet sur les niveaux d'Ash1p que la surexpression de Khd1p, soit une diminution de l'expression d'Ash1p (Gu et al., 2004). Ce résultat suggère fortement que Puf6p agit comme un répresseur traductionnel sur l'ARNm *ASH1*. Puisque Puf6p contient un signal de localisation nucléaire et est majoritairement dans le noyau, il est possible que Puf6p recrute l'ARNm *ASH1* au site de transcription et réprime sa traduction durant la localisation jusqu'à l'extrémité du bourgeon. La répression de la traduction de l'ARNm *ASH1* par Puf6p est appuyée par les résultats de traduction *in vitro* en présence de protéine Puf6 recombinante. Dans ces essais, un excès en molarité de Puf6p par rapport à un rapporteur contenant l'élément de localisation E3 cause une diminution de l'expression du rapporteur

alors que Puf6p n'a aucun effet sur le même rapporteur où les sites UUGU sont mutés (Gu et al., 2004).

Puisque Puf6p affecte les niveaux d'expression d'Ash1p tout comme la transposition des éléments de localisation dans le 3'UTR et que la traduction de l'ARNm *ASH1* est liée à la distribution asymétrique d'Ash1p, l'effet de *PUF6* sur la localisation de l'ARNm *ASH1* et la protéine Ash1 a été vérifié. Alors qu'une souche de type sauvage affiche un phénotype de distribution asymétrique d'Ash1p dans environ 80% des cellules, seulement 30% des cellules ont ce phénotype dans la souche *puf6*, montrant une fois de plus qu'une augmentation du niveau d'expression d'Ash1p mène à une diminution de la distribution asymétrique d'Ash1p (Gu et al., 2004). Ceci est probablement dû à une traduction prématurée de l'ARNm *ASH1* en absence de son répresseur traductionnel (Figure 10). Malgré ce grand effet sur la distribution d'Ash1p, la délétion de *PUF6* n'affecte que légèrement la localisation de l'ARNm *ASH1*, menant à une accumulation plus diffuse dans le bourgeon. De plus, une souche *puf6* montre un léger défaut dans l'expression de *HO* lorsque utilisée dans l'essai génétique du groupe Nasmyth, effet toutefois beaucoup moins prononcé qu'une mutation de *SHE3* (Gu et al., 2004).

Récemment, une étude a montré que *PUF6* joue un rôle dans la maturation des ribosomes (Lee, 2007). À l'aide de gradients de densité de sucrose, les auteurs de cette étude ont établi le profil des polysomes d'une souche délétée de *PUF6* et ont constaté un changement de profil par rapport à une souche de type sauvage (Lee, 2007). Un pic supplémentaire, correspondant possiblement à une sous-unité 48S libre, est visible. Les auteurs suggèrent que *PUF6* serait impliqué dans la maturation de la sous-unité 60S du ribosome et que l'apparition du nouveau pic serait due à une déficience en 60S menant à l'impossibilité de ce nouveau 48S de former un ribosome complet (Lee, 2007). Ce résultat rappelle celui avec Loc1p, une autre protéine nucléaire liant l'élément de localisation E3 de l'ARNm *ASH1* (Komili et al., 2007; Long et al., 2001; Urbinati et al., 2006). Serait-ce possible qu'il y ait un lien entre la biogenèse des ribosomes, la localisation d'ARNm et la régulation de leur traduction? Le groupe de Pamela A. Silver s'est intéressé à la question et bien que la réponse demeure quelque peu floue, il semble y avoir un lien entre la traduction, la synthèse des ribosomes et la localisation de l'ARNm *ASH1* puisque la délétion de plusieurs gènes codant pour des constituant du ribosome affecte la localisation de l'ARNm

ASH1 (Komili et al., 2007). Toutefois, puisque la délétion de *PUF6* n'a aucun effet sur la traduction d'un ARNm qui ne contient pas les motifs UUGU dans son 3'UTR, il est peu probable que Puf6p soit un facteur déterminant de la maturation générale des ribosomes et donc de la traduction en générale.

En conclusion, toutes les mutations qui augmentent les niveaux d'expression d'Ash1p causent une diminution de la distribution asymétrique d'Ash1p, liant ainsi étroitement le taux de traduction de l'ARNm *ASH1*, et non seulement sa localisation dirigée, au ciblage d'Ash1p dans les cellules mères et filles (Figure 11).

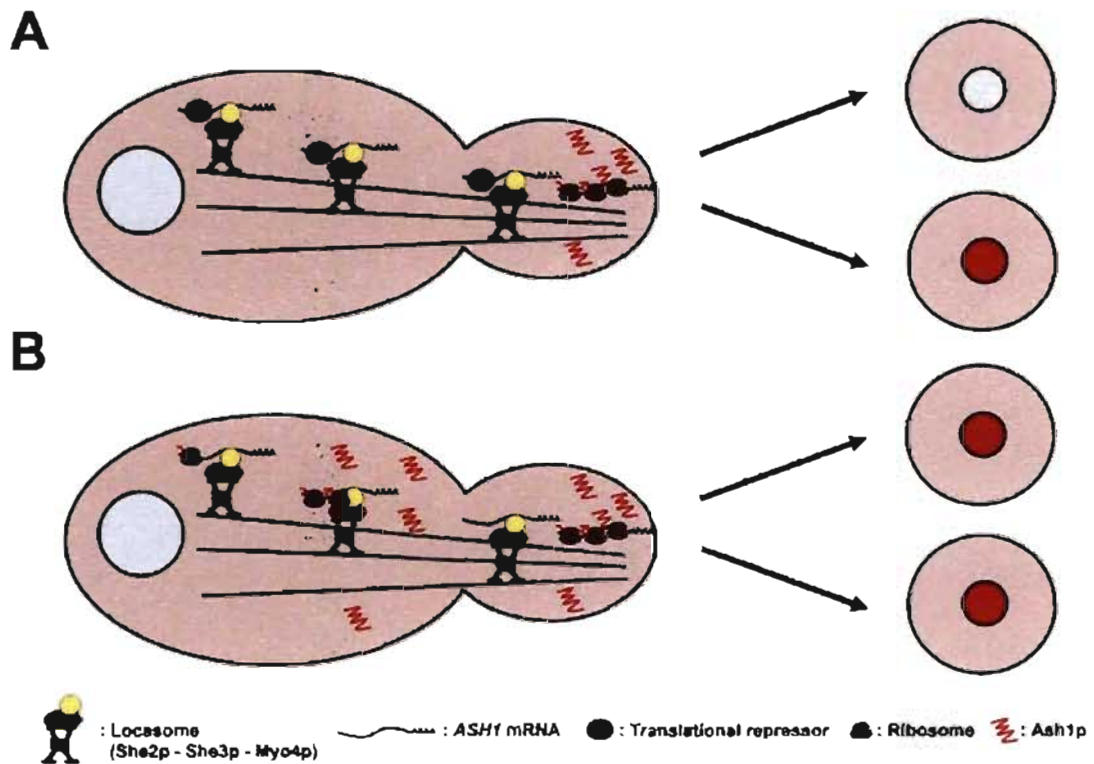


Figure 10 : Effet d'une traduction prématurée sur la distribution d'Ash1p.

A) Dans une souche de type sauvage, la traduction de l'ARNm *ASH1* est réprimée jusqu'à la fin de sa localisation à l'extrémité du bourgeon. Une fois ancré, le transcrit est traduit menant ainsi à la distribution d'Ash1p uniquement dans le noyau de la cellule fille. B) Dans une cellule où la traduction de l'ARNm *ASH1* a lieu trop tôt, la protéine Ash1 est exprimée avant même que le transcrit ne quitte la cellule mère, ce qui cause une distribution symétrique d'Ash1p. Tirée de (Paquin and Chartrand, 2008)

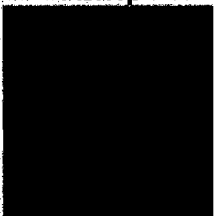

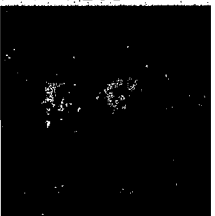
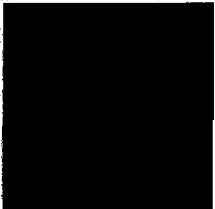


Ash1p	DAPI	DIC	WT	Transposition des éléments de localisation	<i>puf6</i>
			80%	40%	30%
			20%	60%	70%

Figure 11 : Distribution de la protéine Ash1 lorsque la traduction de son transcrit est affectée.

Une souche de type sauvage affiche une distribution d'Ash1p uniquement dans le noyau de la cellule fille dans 80% des cellules. Lorsque les éléments de localisation sont transposés dans le 3'UTR, la distribution asymétrique d'Ash1p est réduite à 40% des cellules alors que la délétion de *PUF6* diminue cette proportion à 30%.

1.5 Coordination du transport du réticulum endoplasmique cortical et de la localisation d'ARNm chez la levure

Comme mentionné préalablement, le transport du réticulum endoplasmique cortical vers le bourgeon nécessite Myo4p et She3p (Estrada et al., 2003). La levure comporte deux types de réticulum endoplasmique, le réticulum endoplasmique périnucléaire, qui entoure le noyau, et le réticulum endoplasmique cortical, qui est situé juste sous la membrane plasmique (Preuss et al., 1991). Le transport du réticulum endoplasmique par une myosine de type V n'est pas exclusif à la levure, cette association ayant été observée dans d'autres organismes (Tabb et al., 1998). Aussi, puisque plusieurs ARNm localisés codent pour des protéines membranaires (Shepard et al., 2003), ces protéines devront subir une translocation au réticulum endoplasmique afin d'être localisées à la membrane plasmique par la voie de sécrétion (Wilkinson et al., 1997), suggérant une association importante entre le transport du réticulum endoplasmique cortical et la localisation d'ARNm. Bien que She2p ne soit pas requise pour le transport du réticulum endoplasmique cortical, elle cofractionne avec le réticulum endoplasmique cortical tout comme Myo4p et She3p, suggérant que ce transport et la localisation d'ARNm pourraient être couplés (Estrada et al., 2003; Schmid et al., 2006). Une étude voulant identifier des transcrits enrichis dans les fractions membranaires a identifié l'ARNm *ASH1* dans les fractions riches en membranes, bien que ce transcrit code pour une protéine nucléaire (Diehn et al., 2000). Par ailleurs, la délétion de plusieurs facteurs impliqués dans l'exocytose affecte la localisation de l'ARNm *ASH1*, possiblement en affectant la polymérisation du cytosquelette d'actine, alors que les transcrits de ces facteurs sont eux-mêmes localisés par le locosome (Aronov et al., 2007; Aronov and Gerst, 2004). Ce résultat est d'autant plus intéressant que dans les fibroblastes, les transcrits de plusieurs protéines membres du complexe Arp2/3, impliqués dans le remodelage du cytosquelette d'actine, sont eux-mêmes localisés sous la membrane plasmique aux sites de motilité avec l'ARNm de la β -actine (Mingle et al., 2005). Ainsi, la coordination de la localisation d'ARNm et du transport du réticulum endoplasmique cortical pourrait faciliter la localisation de protéines membranaires au bourgeon, comme cela a déjà été suggéré (Schmid et al., 2006). Aussi, puisque des analyses du réticulum endoplasmique cortical de levure ont prouvé qu'il est associé à des ribosomes (Misuzu and Masako, 1987), il est possible que ce couplage favorise également l'enrichissement de ribosomes au bourgeon. Toutefois, à savoir si les complexes She3p-Myo4p qui transportent le réticulum

endoplasmique cortical servent aussi à la localisation d'ARNm en association avec She2p à la fois reste encore à déterminer (Figure 12). Il est possible qu'il s'agisse de deux sous-populations distinctes qui sont associées indirectement.

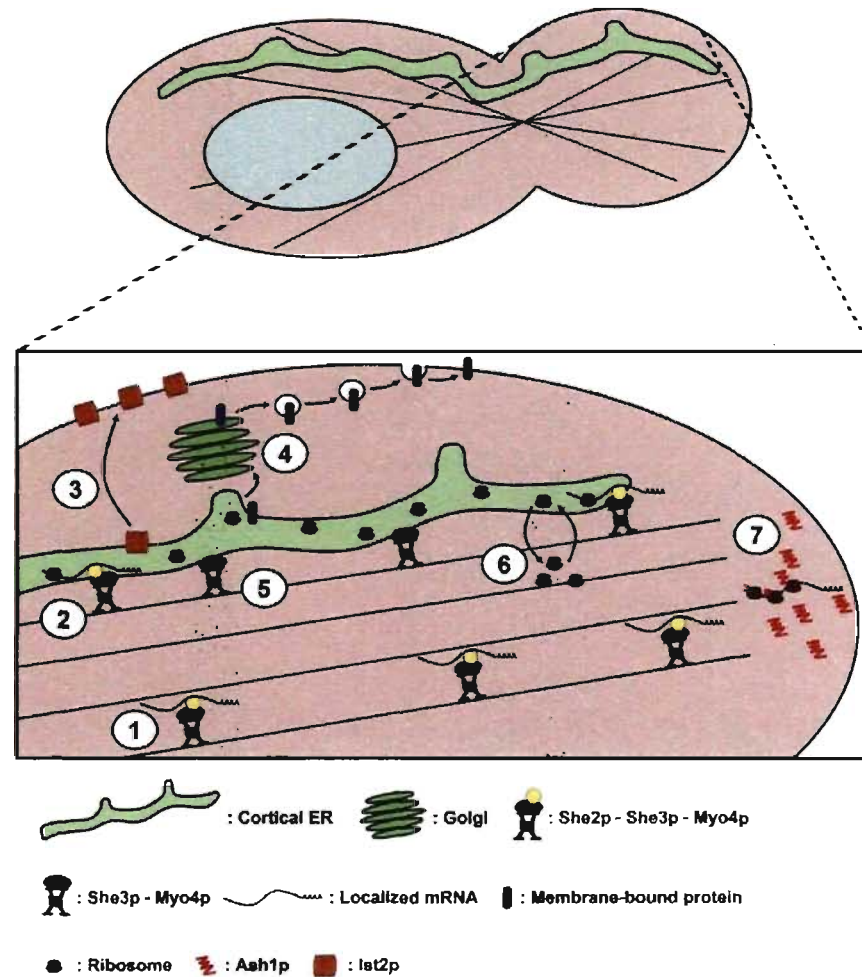


Figure 12 : Modèle de la coordination du transport du réticulum endoplasmique cortical et de la localisation d'ARNm chez la levure.

Les ARNm localisés se déplacent sur les filaments d'actine en association avec le complexe She2p-She3p-Myo4p (1) et en association avec le réticulum endoplasmique cortical (2). Ceci permet aux protéines membranaires d'être sécrétées à la membrane plasmique par diverses voies (3-4). En plus, le réticulum endoplasmique cortical est lui-même transporté par le complexe She3p-Myo4p au bourgeon (5). Ceci résulterait en une augmentation de la quantité de ribosomes présents au bourgeon (6). Le couplage de ces processus permettrait la traduction locale des ARNm localisés à l'extrémité du bourgeon (7). Tirée de (Paquin and Chartrand, 2008)

1.6 La traduction des ARNm chez la levure

L'initiation de la traduction est le résultat de la coopération entre de nombreux complexes qui permettent la synthèse d'une chaîne d'acides aminés (Tableau 2). Le processus commence avec l'association du facteur eIF2 couplé à une molécule de GTP avec l'ARNt-Met. Il s'agit du complexe ternaire. Suite à l'action de eIF1, eIF1A et eIF3, le complexe ternaire se lie à la sous-unité 40S du ribosome, formant ainsi le complexe 43S (Algire and Lorsch, 2006). L'ARNm à traduire est recruté par le complexe eIF4F, lui-même composé des protéines eIF4E, eIF4G et eIF4A. eIF4E lie directement la coiffe de l'ARNm alors que eIF4G sert de protéine d'échafaudage en recrutant aussi Pab1p, la protéine qui lie la queue de poly(A) (Gingras et al., 1999). Cette circularisation d'un transcrit en le liant à la fois au 5'UTR et dans le 3'UTR favorise la traduction de l'ARNm et rend ce processus plus efficace (Wells et al., 1998). Pour sa part, eIF4A possède une activité ARN hélicase et peut donc détruire les structures secondaires présentes dans le 5'UTR de l'ARNm (Gingras et al., 1999). L'association du facteur eIF3 avec eIF4F permet au complexe 43S de balayer le 5'UTR du transcrit à la recherche du codon initiateur. Une fois le complexe fixé sur l'AUG initiateur, eIF2 hydrolyse le GTP en GDP, ce qui dissocie eIF2 du complexe sous l'effet d'eIF5. Finalement, eIF5B favorise l'association de la sous-unité 40S du ribosome avec la sous-unité 60S, formant le complexe 80S, soit un ribosome prêt à traduire un ARNm (Figure 13) (Algire and Lorsch, 2006).

Tableau 2 : Facteurs d'initiation de la traduction et leur fonction chez la levure *S. cerevisiae*

Facteurs d'initiation de la traduction	Fonctions	Noms des gènes chez <i>S. cerevisiae</i>
eIF1	Liaison de l'ARNt-Met et de l'ARNm à la 40S	<i>SUI1</i>
eIF1A	Dissociation du complexe 40S-60S et liaison de l'ARNt-Met	<i>TIF11</i>
eIF2	Sélection de l'AUG initiateur	<i>SUI2, SUI3, GCD11</i>
eIF2B	Échangeur de guanine pour le facteur eIF2	<i>GCN3, GCD7, GCD1, GCD2, GCD6</i>
eIF3	Liaison de l'ARNt-Met et de l'ARNm à la 40S	<i>PRT1, GCD10</i>
eIF4A	Activité hélicase d'ARN	<i>TIF1, TIF2</i>
eIF4B	Promouvoir l'activité d'eIF4A	<i>TIF3</i>
eIF4E	Lier la coiffe de l'ARNm	<i>CDC33</i>
eIF4G1, eIF4G2	Interagir avec eIF4E, Pab1p, eIF4A et CBP80	<i>TIF4631, TIF4632</i>
eIF5	Éjection des eIF	<i>TIF5</i>
eIF5A	Favorise la formation du premier lien peptidique	<i>TIF51A, TIF51B</i>
eIF5B	Promouvoir la liaison de l'ARNt-Met au ribosome et l'association de la sous-unité 40S et de la sous-unité 60S	<i>FUN12</i>

Modifié de (McCarthy, 1998)

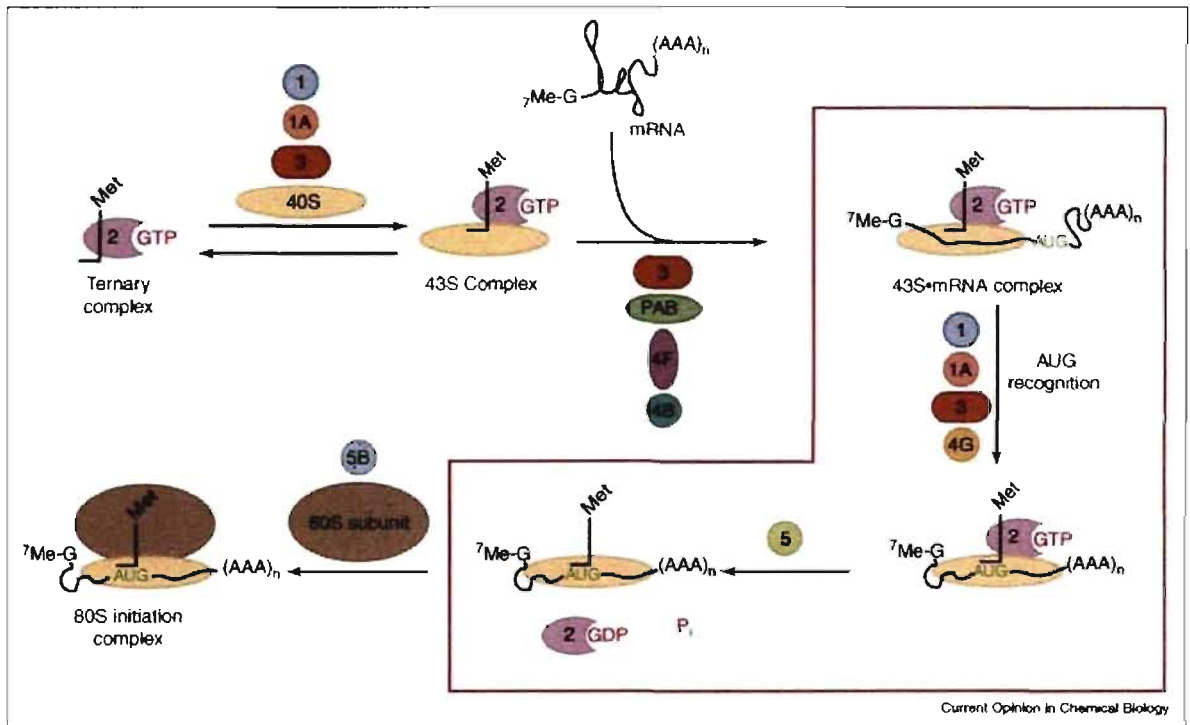


Figure 13 : Description de l'initiation de la traduction des ARNm chez les eucaryotes.

Le balayage du 5'UTR d'un ARNm par le complexe 43S en association avec eIF4E et Pab1p permet l'identification du codon initiateur, ce qui mène à la formation du ribosome 80S et ultimement à la traduction du transcrit. Adaptée de (Algire and Lorsch, 2006)

1.6.1 Régulation de la traduction des ARNm

Bien que la traduction soit un processus général dont la majeure partie des complexes impliqués sont communs à tous les ARNm traduits, certains transcrits sont spécifiquement régulés afin de mieux contrôler leurs niveaux et moments d'expression. De nombreux moyens ont été identifiés permettant une spécificité plus ou moins grande dans le choix des transcrits voyant leur traduction régulée. Puisque ces mécanismes passent généralement par la modulation de protéines liant le facteur eIF4G ou même en agissant directement sur cette dernière, commençons par introduire ces facteurs.

1.6.2 eIF4E et la liaison à la coiffe des ARNm

Tout d'abord, eIF4E est une petite protéine liant la coiffe des ARNm. La coiffe consiste en une guanine méthylée qui est ajoutée aux ARNm durant leur transcription (Shatkin, 1976). La liaison d'eIF4E à la coiffe permet d'augmenter l'affinité du complexe eIF4F pour l'ARNm et ainsi favorise sa traduction (Gingras et al., 1999). eIF4E est une cible de choix pour réguler la traduction d'un ARNm parce qu'en son absence, la traduction est drastiquement diminuée, voire inhibée. Ainsi, la phosphorylation de ce facteur, notamment par les kinases Mnk chez les mammifères (Pyronnet, 2000), permet d'augmenter son affinité pour eIF4G, stimulant ainsi la traduction. Toutefois, afin de pouvoir stimuler la traduction, eIF4E doit interagir avec eIF4G et d'autres protéines associées. L'interaction entre eIF4E et eIF4G est bien caractérisée et est dépendante d'un motif YXXXXL dans eIF4G. Toutefois, ce motif est présent dans de nombreuses protéines qui séquestrent eIF4E et empêchent sa liaison par eIF4G (Mader et al., 1995). Il s'agit d'un mécanisme de répression traductionnelle très répandue. Jumelé à un mécanisme d'interaction spécifique à certains ARNm, ce système permet de maintenir un transcrit en traduction ou bien d'en inhiber l'expression.

Par exemple, la protéine CPEB (pour cytoplasmic polyadenylation element binding protein) lie spécifiquement l'élément CPE (pour cytoplasmic polyadenylation element) qui se trouve dans le 3'UTR de plusieurs ARNm. CPEB interagit aussi avec la protéine Maskin qui lie eIF4E grâce à un motif YXXXXL, compétitionnant ainsi avec eIF4G pour la liaison à eIF4E (Figure 14) (Mendez and Richter, 2001; Richter and Sonenberg, 2005). Ces

transcrits sont donc gardés sous une forme inactive jusqu'à la modification de Maskin, habituellement par un équilibre de phosphorylation / déphosphorylation qui amorce la dissociation du complexe de répression et l'activation de la traduction (Richter and Sonenberg, 2005). De plus, ce mécanisme contrôle l'addition de la queue de poly(A) sur le transcrit, permettant à la fois de réguler la traduction de l'ARNm par le 3'UTR et le 5'UTR. Les protéines qui peuvent séquestrer eIF4E, appelées 4E-BP (pour 4E binding protein) permettent de diminuer l'efficacité de la traduction d'une façon plus générale, c'est-à-dire en affectant tous les transcrits traduits de manière coiffe-dépendante, ou de façon spécifique en étant couplées indirectement à un motif d'ARN présent sur un transcrit particulier (Richter and Sonenberg, 2005).

1.6.3 eIF4G, une protéine d'échafaudage centrale

eIF4G permet de recruter et de rassembler divers facteurs d'initiation de la traduction, notamment eIF4E, Pab1p, Cbp80p, eIF4A, eIF1, eIF5 et eIF3 (Baron-Benhamou et al., 2003; Dominguez et al., 1999; He et al., 2003; Mader et al., 1995; Phan et al., 1998; Tarun and Sachs, 1996). Tous ces facteurs jouent un rôle primordial dans la traduction et leur liaison sur la protéine eIF4G peut entrer en compétition avec d'autres facteurs, ce qui mène à une diminution de l'efficacité de la traduction. Par ailleurs, plusieurs virus expriment des protéases qui induisent le clivage du facteur eIF4G, favorisant ainsi la traduction des ARN viraux plutôt que les transcrits endogènes à la cellule (Lloyd, 2006). Il existe deux isoformes du facteur eIF4G chez la levure; eIF4G1 et eIF4G2, et leur fonction semble redondante puisque la délétion d'une ou l'autre n'affecte pas la viabilité cellulaire alors que leur co-délétion est létale (Goyer et al., 1993). Étant fortement homologues, ces deux isoformes n'ont pas de fonction mutuellement exclusive malgré des niveaux d'expression très différents. Il est à noter que le domaine C-terminal des facteurs eIF4G de levure n'est pas lié par les kinases Mnk, qui phosphorylent eIF4E et favorisent la traduction (Pyronnet, 2000), comme chez les mammifères. Ces kinases ne sont pas présentes chez la levure. Chez *S. cerevisiae*, le domaine C-terminal d'eIF4G a une affinité pour l'ARN et est important à la fonction de la protéine *in vivo* et *in vitro* (Berset et al., 2003). De plus, des criblages à large échelle cherchant des complexes protéiques par chromatographie d'affinité ont montré qu'eIF4G s'associe avec Khd1p (Gavin et al., 2006; Gavin et al., 2002). Le rôle de cette interaction demeure toutefois à explorer.

1.6.4 Liaison de la queue de poly(A) par Pab1p

Pab1p lie la queue de poly(A) qui est ajoutée sur les ARNm et favorise la circularisation des ARNm en s'associant à eIF4G et eIF4E (Wells et al., 1998). Chez les mammifères, l'expression de la protéine virale NSP3 permet d'évincer PABP du facteur eIF4G, ce qui favorise la traduction des ARNm viraux (Piron et al., 1998). Puisque la longueur de la queue de poly(A) influence la stabilité d'un transcrit, la liaison par Pab1p permet de stabiliser cette queue (Caponigro and Parker, 1996). Il est à noter que Pab1p ne lie pas eIF4G à moins d'être liée à une queue de poly(A) (Tarun and Sachs, 1996).

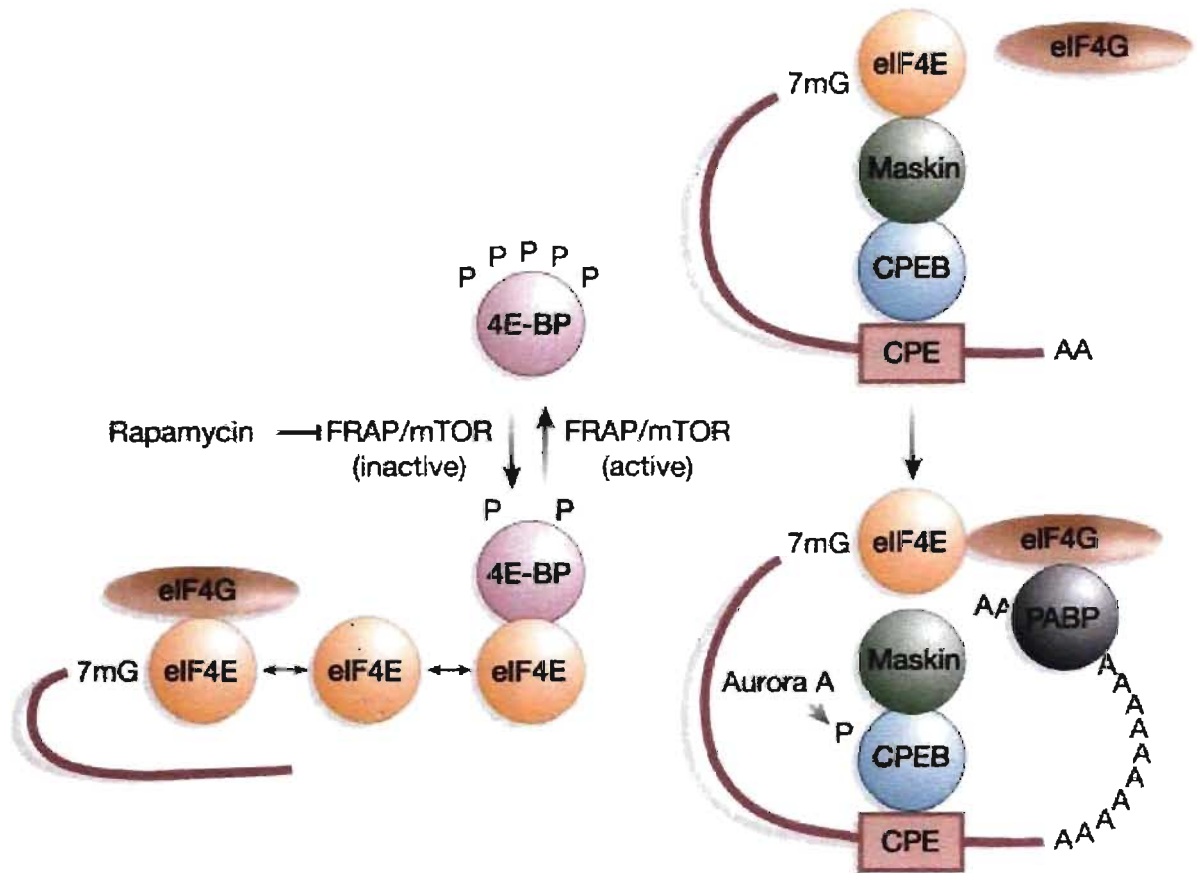


Figure 14 : Exemples de régulation de la traduction.

Dans un premier cas, la protéine 4E-BP lie directement eIF4E et empêche sa liaison à eIF4G. Dans le deuxième exemple, la présence d'un élément spécifique dans le 3'UTR d'un transcrit permet sa reconnaissance par CPEB qui recrute à son tour Maskin. La liaison de Maskin à eIF4E empêche la traduction en plus de contrôler l'élongation de la queue de poly(A). Aussi, la phosphorylation de 4E-BP permet de moduler l'affinité pour eIF4E et ainsi de réguler la traduction. Adaptée de (Richter and Sonenberg, 2005)

1.7 Régulation de la traduction d'ARNm localisés

Durant leur localisation, la traduction de plusieurs ARNm localisés est réprimée afin d'éviter une expression ectopique de leur protéine. Par exemple, la traduction de l'ARNm Oskar chez la drosophile est réprimée par les protéines Cup et Bruno durant sa localisation (Nakamura et al., 2004). L'ARNm Nanos, qui est aussi localisé grâce aux courants créés par le déversement du cytoplasme des cellules nourricières (Forrest and Gavis, 2003), code pour une protéine qui forme un complexe avec Brain tumor et Pumilio afin de réprimer la traduction de nombreux ARNm (Sonoda and Wharton, 2001). Aussi, Puf6p, expliqué préalablement (section 1.4.3) est un bon exemple chez la levure, où Puf6p réprime la traduction de l'ARNm *ASH1* (Gu et al., 2004). Bien que plusieurs répresseurs traductionnels soient connus et bien caractérisés, il existe peu d'information sur les mécanismes permettant l'activation de la traduction des ARNm localisés une fois bien rendus à destination. À ce niveau, l'exemple le mieux caractérisé est le cas de la localisation de l'ARNm de la β -actine, le premier ARNm localisé identifié, dans les fibroblastes et les neurones (Lawrence and Singer, 1986).

1.7.1 Régulation de la localisation et de la traduction de l'ARNm de la β -actine par ZBP1

L'ARNm de la β -actine est activement localisé aux sites de motilité chez les fibroblastes, et dans les neurites des neurones (Eom et al., 2003; Kislauskis et al., 1997; Tiruchinapalli et al., 2003). Cette localisation permet aux cellules de disposer d'une réserve locale d'ARNm de β -actine prête à être traduite en cas de nécessité. Ceci permet un remodelage très rapide et efficace du cytosquelette d'actine et favorise la croissance des neurites dans les neurones (Figure 15A) (Eom et al., 2003; Huttelmaier et al., 2005). La localisation du transcrit de la β -actine nécessite un élément de localisation, nommé « zipcode », présent dans son 3'UTR (Kislauskis et al., 1994). Cet élément est spécifiquement reconnu par la protéine ZBP1 (pour Zipcode binding protein 1), une protéine contenant quatre domaines KH ainsi que deux RRM, deux motifs de liaison à l'ARN bien caractérisés (Ross et al., 1997). Le groupe de Robert H. Singer a cherché la protéine réprimant la traduction de l'ARNm de la β -actine après avoir étudié les facteurs qui influencent la localisation de ce transcrit. Puisque des études de microscopie et

d'immunoprécipitation de chromatine ont montré que ZBP1 recrute l'ARNm de la β -actine au site de transcription, il s'agissait d'un candidat potentiel pour réprimer la traduction du transcrit néo-synthétisé (Oleynikov and Singer, 2003; Pan et al., 2007). En utilisant des essais de traduction *in vitro* à base de réticulocytes, ils ont montré que ZBP1 diminue la traduction de l'ARNm de la β -actine (Huttelmaier et al., 2005). De plus, une déplétion de ZBP1 *in vivo* par ARN interférence a confirmé le rôle de ZBP1 en tant que répresseur traductionnel (Huttelmaier et al., 2005). En analysant les domaines présents dans la protéine ZBP1, ils ont identifié un domaine d'interaction avec la kinase Src. La kinase Src, qui est ancrée à la membrane, phosphoryle la tyrosine 396 de ZBP1, menant à une relâche de la répression de la traduction de l'ARNm de la β -actine (Huttelmaier et al., 2005). Cette étude constitue le premier pas vers la compréhension des mécanismes d'activation des transcrits localisés dont la traduction est réprimée durant leur transport. De plus, une partie du mécanisme d'action de ZBP1 a été mis en lumière. Il semble qu'en liant l'élément de localisation de l'ARNm de la β -actine, ZBP1 empêche la liaison de la sous-unité 60S du ribosome au complexe 43S (Figure 15B) (Huttelmaier et al., 2005).

1.7.2 Effets des modifications post-traductionnelles sur la liaison de protéines à l'ARN

Quelques autres exemples de modulation de la liaison à l'ARN d'une protéine par des modifications post-traductionnelles ont été mis à jour dans les dernières années. D'une part, l'ARNm de la 15-lipoxygénase, codant pour une enzyme importante dans la différenciation des cellules réticulocytes, voit sa traduction réprimée de façon temporaire par les protéines hnRNP E1 et hnRNP K (Ostareck-Lederer and Ostareck, 2004). Toutefois, cette répression traductionnelle est aussi relâchée par une phosphorylation par la kinase Src (Messias et al., 2006). De plus, la phosphorylation de dFxr chez la drosophile, un homologue de la protéine FMRP, module sa liaison à l'ARN (Siomi et al., 2002). Aussi, la phosphorylation de CPEB par la kinase Aurora permet de moduler la traduction de l'ARNm de c-mos, une MAP kinase kinase chez *Xéopus* (Mendez et al., 2000). La découverte de la modulation de la liaison de protéines liant l'ARN à leur substrat par des modifications post-traductionnelles est un élément important dans la compréhension de la régulation de l'activation de la traduction d'ARNm localisés ou régulés de façon temporelle. Toutefois, l'effet de ces phosphorylation sur les protéines cibles reste toujours inconnu. Une possibilité est que la phosphorylation module l'oligomérisation des protéines

et ainsi leur fonction. D'autre part, il est possible que ces modifications post-traductionnelles induisent un changement conformationnel chez la protéine cible, ce qui permettrait de moduler leur activité.

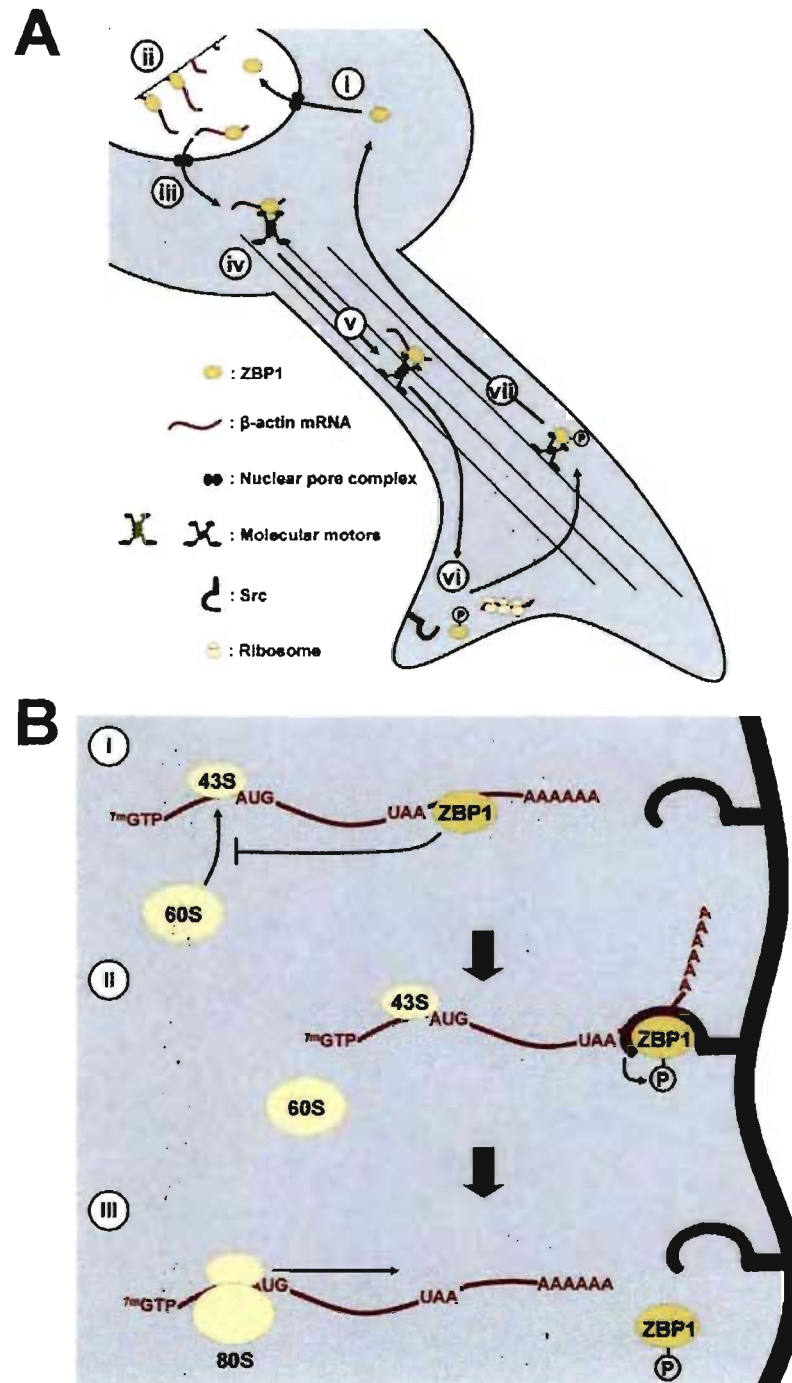


Figure 15 : Localisation et régulation de la traduction de l'ARNm de la β -actine par ZBP1. A) ZBP1 est importée au noyau (i) où elle recrute l'ARNm de la β -actine (ii) avant d'être exportée et de s'associer avec la machinerie de localisation (iii-iv). Le complexe se déplace vers le neurite (v) où ZBP1 est phosphorylée par Src (vi) avant d'être recyclée (vii). B) ZBP1 empêche la sous-unité 60S de s'associer à la 43S (I). Suite à la phosphorylation de ZBP1 par Src (II), le ribosome se forme et la traduction commence. Adaptée de (Huttelmaier et al., 2005)

1.8 Processus d'ubiquitination

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle qui consiste en l'ajout d'une petite protéine, l'ubiquitine, de façon covalente sur un résidu lysine d'une protéine cible. Cette modification joue des rôles biologiques importants, notamment dans la dégradation des protéines (Passmore and Barford, 2004).

1.8.1 Mécanismes d'ubiquitination

L'ubiquitination d'une protéine passe par une cascade de modifications protéiques bien précises. Les enzymes de conjugaison de l'ubiquitine sont divisées en quatre groupes. Tout d'abord, les enzymes ubiquitine ligase de type E1 sont couplées de façon covalente à une molécule d'ubiquitine suite à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Ensuite, cette ubiquitine est transférée à une enzyme ubiquitine ligase de type E2. Ce complexe est ensuite utilisé par une enzyme ubiquitine ligase de type E3 afin de transférer l'ubiquitine sur le substrat final (Figure 16) (Passmore and Barford, 2004). Enfin, un sous-groupe d'enzymes E3, nommé ubiquitine ligase de type E4, peut conjuguer une molécule d'ubiquitine sur une lysine d'une autre molécule d'ubiquitine, menant à une chaîne d'ubiquitine qui peut être linéaire ou contenir des branches d'ubiquitine (Hoppe, 2005).

Deux types principaux d'ubiquitine ligase E3 ont été identifiés, soient les complexes SCF (pour Skp1/Cullin/F-box) et l'APC (pour anaphase promoting complex) (Passmore and Barford, 2004; Reed, 2003). Dans le premier cas, les protéines Skp1p et Cdc53p, la cullin chez la levure, font toujours partie du complexe alors que diverses protéines F-box peuvent s'associer à lui. Le domaine F-box permet l'interaction avec Skp1p et la protéine F-box déterminera la spécificité du complexe pour son substrat (Ho et al., 2006). Le complexe APC est quant à lui responsable de l'ubiquitination et la dégradation des cyclines mitotiques (Page and Hieter, 1999).

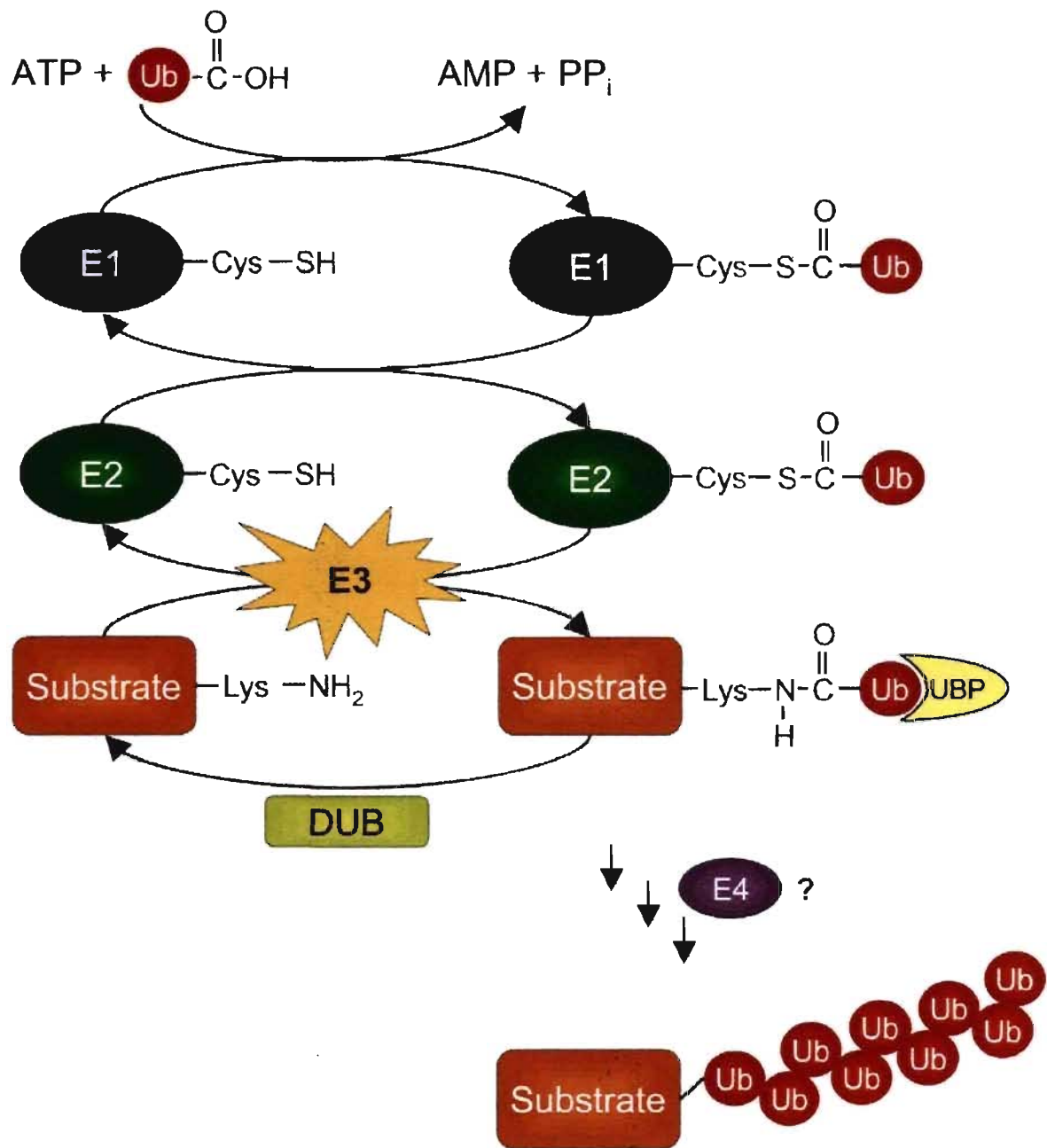


Figure 16: Mécanisme d'ubiquitination.

Une molécule d'ubiquitine est tout d'abord couplée de façon covalente à une enzyme ubiquitine ligase de type E1. Ensuite, cette ubiquitine est transférée de façon covalente sur une enzyme ubiquitine ligase E2. Finalement, le complexe ubiquitine ligase E3 transfère l'ubiquitine sur la protéine substrat ou sur une autre molécule d'ubiquitine. Adaptée de (Passmore and Barford, 2004)

1.8.2 Rôles biologiques de l'ubiquitination

Les fonctions de l'ubiquitination sont nombreuses et les subtilités derrière les critères qui dirigent ces fonctions restent encore aujourd'hui difficiles à comprendre. D'une façon générale, une monoubiquitination est associée à une relocalisation de la protéine substrat. Ce mécanisme s'applique particulièrement aux protéines membranaires qui une fois ubiquitinées sont endocytosées et envoyées à la vacuole (chez la levure) pour être dégradées. Toutefois, la monoubiquitination de certaines protéines peut aussi activer la transcription (Hicke, 2001; Hicke and Dunn, 2003; Muratani and Tansey, 2003; Passmore and Barford, 2004). D'autre part, puisque l'ubiquitine possède elle-même des lysines pouvant être ubiquitinées, il est possible de conjuguer plusieurs ubiquitines en une chaîne sur une protéine substrat (Passmore and Barford, 2004). Ceci mène habituellement à la dégradation de ce substrat par le protéasome 26S, un complexe protéique dont la fonction est de dégrader les protéines ubiquitinées (Abraham, 2000; Passmore and Barford, 2004). L'ubiquitination de plusieurs cyclines, menant à leur dégradation est essentielle à la bonne progression du cycle cellulaire (Reed, 2003; Yew, 2001).

Plusieurs sites d'ubiquitination des protéines dépendent d'une phosphorylation préalablement à l'ajout d'une ubiquitine (Hicke et al., 1998; Marchal et al., 2000; Moriya and Johnston, 2004). Ce double mécanisme permet d'éviter la dégradation trop rapide de certaines protéines. Par exemple, la protéine Fur4 chez *S. cerevisiae*, qui code pour l'uracil perméase, est phosphorylée lorsqu'elle lie son substrat (Marchal et al., 2000). Cette phosphorylation par les caséines kinases de type I Yck1p et Yck2p induit l'ubiquitination de Fur4p et son endocytose (Marchal et al., 2000).

1.9 Questions posées par l'auteur

Puisque nous avons préalablement montré que la destruction des structures secondaires des éléments de localisation de l'ARNm *ASH1* induit une augmentation de l'expression de la protéine Ash1 et que les travaux de l'équipe d'Ira Herskowitz ont montré que l'association entre Khd1p et l'ARNm *ASH1* nécessite les 800 premiers nucléotides de la séquence codante, une région contenant l'élément de localisation E1, serait-ce possible que Khd1p agisse comme un répresseur traductionnel de l'ARNm *ASH1*? Il a été montré que la surexpression de Khd1p inhibe l'expression de la protéine Ash1, et que cette surexpression ne diminue pas les niveaux de l'ARNm *ASH1*. Nos résultats montrent que Khd1p lie directement l'élément de localisation E1 de l'ARNm *ASH1* et que cette association est essentielle à l'effet de Khd1p sur les niveaux d'Ash1p.

Par ailleurs, une fois l'ARNm *ASH1* localisé à l'extrémité du bourgeon, par quel moyen la cellule met-elle fin à la répression de la traduction de l'ARNm *ASH1* et signale-t-elle le moment d'activer l'expression d'Ash1p? Des études sur la localisation et la régulation de la traduction de l'ARNm de la β -actine dans les fibroblastes et les neurones ont montré que la modification post-traductionnelle de ZBP1, la protéine responsable de la localisation et de la répression traductionnelle du transcrite de la β -actine, est responsable de la relâche du transcrite et de l'activation de la traduction de l'ARNm localisé. Dans ce cas précis, la phosphorylation de ZBP1 par la kinase membranaire Src sert de signal d'activation. Puisque les processus de localisation d'ARNm sont conservés entre les métazoaires et la levure, serait-il possible qu'un mécanisme semblable permette l'expression d'Ash1p une fois son transcrite bien localisé? Nous avons observé que Khd1p est phosphorylé *in vivo* et déterminé quel est l'effet de cette phosphorylation sur la traduction de l'ARNm *ASH1*.

Finalement, une fois le cycle de localisation de l'ARNm *ASH1* complété et la répression traductionnelle relâchée, qu'advient-il de Khd1p? Cette protéine peut-elle être recyclée afin de compléter un deuxième cycle de localisation d'ARNm ou bien est-elle dégradée après avoir rempli sa fonction? L'étude de la demie-vie de la protéine Khd1p a été comparée en fonction des modifications post-traductionnelles présentes sur la protéine.

RÉSULTATS

CHAPITRE 2: Local activation of yeast *ASH1* mRNA translation through phosphorylation of Khd1p by the casein kinase Yck1p

NOTE

Contribution des auteurs :

- Nicolas Paquin : Immunobuwardages, buwardages de type Northern, essais luciférase, précipitations GST, marquage métabolique *in vivo*, essai de complémentation protéique de la protéine fluorescente Venus, essais de phosphorylation *in vitro* et gradients de sucrose.
- Marie Ménade : Tests de retards sur gel et précipitation GST.
- Guillaume Poirier : Gradients de sucrose et profils d'ARNm.
- Damiane Donato : Cinétiques d'apparition d'Ash1p.
- Emmanuel Drouet : Superviseur de Marie Ménade.
- Pascal Chartrand : FISH, immunofluorescence, planification et supervision générale.

Article publié dans le journal scientifique *Molecular Cell* (2007) 26 : 795-809

Avec la permission de Cell Press.

© 2007 Cell Press

**Local activation of yeast *ASH1* mRNA translation
through phosphorylation of Khd1p by the casein kinase
Yck1p**

Nicolas Paquin¹, Marie Ménade^{1,2}, Guillaume Poirier¹,
Damiane Donato¹, Emmanuel Drouet² and Pascal Chartrand^{1*}

¹Département de Biochimie, Université de Montréal
Montréal, Qc H3C 3J7 Canada

²Unit for Virus Host-cell Interactions, UMR 5233 UJF-EMBL-CNRS
Université Joseph-Fourier, Grenoble, France



Running title: Spatio-temporal control of *ASH1* mRNA translation

2.1 ABSTRACT

In *S. cerevisiae*, the *ASH1* mRNA is localized at the bud tip of late-anaphase cells, resulting in the exclusive sorting of Ash1p to the daughter cell nucleus. While the mechanism behind the localization of this transcript has been well studied, the regulation of its translation is still poorly understood. We now report that the RNA-binding protein Khd1 interacts with the *ASH1* mRNA localization element E1 and with the C-terminal domain of eIF4G1 to regulate the translation of this transcript. Khd1p reduces translation initiation on the *ASH1* mRNA and diminishes Ash1p leakage into the mother cell nucleus. Furthermore, we show that the casein kinase Yck1p phosphorylates Khd1p at the plasma membrane, disrupting the Khd1p-RNA complex and releasing its translational repression on the *ASH1* mRNA. This study reveals how, by linking mRNA sorting and translational activation, Khd1p and Yck1p regulate the spatio-temporal expression of a cell fate determinant.

2.2 INTRODUCTION

The intracellular localization of mRNAs allows cells to properly define the site and time of expression of specific proteins. This mechanism of protein sorting is essential in biological processes like axis determination during embryonic development, asymmetric cell division, cell motility and neuronal growth (Kindler et al., 2005; St Johnston, 2005). In order to avoid any premature or ectopic expression of the localized proteins, the translation of these transcripts is thought to be tightly regulated. This regulation is often mediated by trans-acting factors which interact with cis-acting elements in the untranslated regions (5' and 3'UTR) of the target mRNAs (Kuersten and Goodwin, 2003). Translation initiation, the rate limiting step in translation, is frequently the target of these factors (Gingras AC, 1999; Richter and Sonenberg, 2005). A recent study has shown that translation onset of the neurite localized β -actin mRNA can occur through the phosphorylation of its translational repressor ZBP1 at the end site of localization, thus providing a spatial regulation of translational activation (Huttelmaier, 2005). How common is this mechanism of spatial regulation is still unclear.

The budding yeast *S. cerevisiae* serves as a model system for studying the asymmetric segregation of cell-fate determinants through mRNA localization (Chartrand et al., 2001; Darzacq et al., 2003). The asymmetric sorting of Ash1p to the daughter cell nucleus correlates with the localization of the *ASH1* mRNA to the distal tip of daughter cells during the anaphase of the cell cycle (Long et al., 1997; Takizawa, 1997) and results in the inhibition of mating-type switching in the daughter cell (Jansen, 1996; Sil, 1996). The core components of the *ASH1* mRNA localization machinery have been identified and were shown to form a complex, called the "locosome", which includes Myo4p, She2p and She3p (Bohl et al., 2000; Long et al., 2000; Takizawa and Vale, 2000). While the factors involved in *ASH1* mRNA sorting are well known, the translational regulation of this transcript is still poorly understood. A previous study has reported that the presence of cis-acting localization elements within the coding sequence of the *ASH1* mRNA plays a role in the regulation of its translation (Chartrand, 2002). Moreover, two trans-acting factors, Puf6p and Khd1p were suggested to participate in *ASH1* mRNA translational control (Gu et al., 2004; Irie et al., 2002), but their specific roles were not determined. Furthermore, how the translation of the *ASH1* mRNA is activated at the bud tip is still unknown.

We now report that Khd1p, a protein with three RNA-binding hnRNP K homology (KH) domains, is a translational regulator of the *ASH1* mRNA that interacts with the C-

terminal domain of eIF4G1 and binds the localization element E1 of this mRNA. Interestingly, deletion of the C-terminal domain of eIF4G1 increases the translation of an *ASH1* reporter mRNA *in vivo*. Furthermore, we show that the yeast casein kinase Yck1p interacts with Khd1p at the plasma membrane and phosphorylates the C-terminal end of Khd1p. This phosphorylation disrupts the interaction between Khd1p and RNA, and relieves the Khd1p-mediated translational control on an *ASH1* reporter mRNA. Our results show that the spatio-temporal regulation of protein synthesis, by which the translational control of a localized mRNA is released only as the transcript reaches its final destination, is an important mechanism for the efficient sorting of a cell fate determinant.

2.3 RESULTS

2.3.1 Khd1p regulates the translation of the *ASH1* mRNA through the localization element E1.

To establish the regulating effect of Khd1p on *ASH1* mRNA translation, the expression of endogenous Ash1p was compared between a wild type (WT) *KHD1* strain and a *khd1* null strain. Deletion of *KHD1* resulted in a 2.5 fold increase in myc-tagged Ash1p expression (Figure 17A). *ASH1* mRNA levels are equal in the WT and *khd1* strains, suggesting that Khd1p acts at a post-transcriptional level to regulate the expression of Ash1p (Figure 17B). To corroborate these results, the kinetics of Ash1p synthesis were measured in WT and *khd1* strains. The *ASH1* mRNA was expressed from a galactose-inducible promoter and the synthesis of Ash1p-myc was measured by Western blot. After one hour of galactose stimulation, the *khd1* yeast strain showed a two to three fold increase in Ash1p synthesis compared to the WT strain (Supplementary Figure 24A). Northern blot analysis showed that *ASH1* mRNA levels were similar in both strains after one hour of galactose induction (Supplementary Figure 24B).

Khd1p was previously reported to bind within the first 800 nucleotides of the *ASH1* mRNA coding sequence, a region which includes the localization element E1 (Irie et al., 2002). This localization element is bound by the RNA-binding protein She2p and is sufficient to target a transcript to the bud of yeast cells (Chartrand et al., 1999). We previously reported that disruption of the four *ASH1* mRNA localization elements results in the increased synthesis of Ash1p (Chartrand, 2002), suggesting the possibility that one of the localization element may be a target site for a translational regulation factor. In order to

show that a possible interaction between Khd1p and the element E1 is involved in the translational regulation of the *ASH1* mRNA, luciferase fusions that contained either the first 900 nucleotides (including the element E1) or the first 621 nucleotides of the coding sequence of *ASH1* (omitting the element E1), were generated (Figure 17C). For both constructions, the *ASH1* coding sequence was in frame with the luciferase, generating Ash1-luc fusion proteins. As shown in Figure 17D-E and Supplementary Figure 24C, the fusion of the first 900 nucleotides of the *ASH1* coding sequence with luciferase resulted in a 1.8 fold increase in luciferase activity in a *khd1* strain compared to a WT strain. In contrast, the luciferase fusion that excluded the localization element E1 showed no difference in activity between WT and *khd1* strains. Moreover, the expression of luciferase alone under the *ASH1* promoter did not show any difference in the presence or absence of Khd1p (data not shown). To rule out the possibility that the mere binding of a protein within the coding sequence of the *ASH1* mRNA would explain such effect on Ash1p synthesis, the same induction of *ASH1* mRNA was performed in a yeast strain deleted of the She2 protein, which also bind within the coding sequence of *ASH1* (Bohl et al., 2000; Long et al., 2000). *SHE2* deletion did not result in increased Ash1p expression, suggesting a specific effect of Khd1p on Ash1p synthesis (Supplementary Figure 24A).

To test the possibility of a direct interaction between Khd1p and the localization element E1, recombinant GST-Khd1p and *in vitro* transcribed localization element E1 RNA were used in an electrophoresis mobility shift assay (EMSA). As shown in Figure 17F, a complex was observed between Khd1p and the E1 RNA. This complex was specific since only a weak shift was observed between GST-Khd1p and the iron responsive element (IRE) RNA (Figure. 17F). Multiple bands were observed at higher protein concentration, suggesting a possible dimerization of Khd1p with RNA. In a competition assay, the main shifted band was efficiently competed by an excess of unlabelled E1 RNA (Figure 17F, lanes 11-13), but weakly competed by an excess of unlabelled IRE RNA (Supplementary Figure 24D), which shows that the observed shifts were caused by the formation of a specific protein-RNA complex. Altogether, these results indicate that Khd1p interacts directly with the localization element E1.

2.3.2 Deletion of *KHD1* increases the ribosome load on the *ASH1* mRNA and decreases the asymmetric distribution of Ash1p.

To determine at which level of *ASH1* mRNA translation Khd1p acts, a sucrose gradient was used to purify the various ribosome fractions from WT or *khd1* yeast cells and reveal the distribution of the *ASH1* mRNA in these fractions using dot blots. As shown in Figure 18A, the *ASH1* mRNA is mostly in the monosome and lower polysomes fractions of the gradient in a wild-type yeast strain, as is Khd1p (Supplementary Figure 25). However, when *KHD1* was deleted, the *ASH1* mRNA was redistributed toward the higher polysome fractions of the gradient (Figure 18B). Deletion of *KHD1* had no impact on the distribution of the *ACT1* mRNA, suggesting that the effect of Khd1p is specific to the *ASH1* mRNA. Similar results were obtained when using RT-PCR for the detection of the *ASH1* mRNA in the fractions of the polysome gradient (data not shown). Altogether, these results show that Khd1p specifically reduces the ribosome load on the *ASH1* mRNA.

Since an increased translation of the *ASH1* mRNA has been shown to decrease the asymmetric distribution of Ash1p (Chartrand, 2002; Gu et al., 2004), the effect of a deletion of *KHD1* on the distribution of Ash1p in late anaphase cells was explored using immunofluorescence. While 80% of late-anaphase WT yeasts showed an asymmetric localization of Ash1p in the daughter cell nucleus, only 40% of *khd1* yeasts still had Ash1p segregated to the daughter cell nucleus (Figure 19A-B). These results are similar to those obtained in strains where all four *ASH1* localization elements were moved to the 3'UTR of this transcript (Chartrand, 2002), or to a *puf6* strain (Gu et al., 2004). To determine if this defective sorting of Ash1p was caused by a decreased localization of the *ASH1* mRNA at the bud tip in a *khd1* strain, the localization of this transcript was assessed by FISH. As shown in Figure 19C-D, *ASH1* mRNA localization was similar in both WT and *khd1* strains, suggesting that the defect in Ash1p asymmetric distribution observed in a *khd1* strain was not due to the mis-localization of its transcript.

2.3.3 Khd1p interacts with the C-terminal domain of eIF4G1

Large scale affinity precipitation assays have shown that Khd1p is associated *in vivo* with several proteins involved in translation initiation: eIF4E, eIF4G1, eIF4G2 and Pabp1 (Gavin et al., 2006; Gavin, 2002). Among these proteins, eIF4E and eIF4G are the two which are the more frequently targeted by translation regulation factors (Gingras AC, 1999). In order to identify the mechanism by which Khd1p regulates the translation of the

ASH1 mRNA, the interaction between Khd1p and these two translation initiation factors was investigated by GST-pulldown assay using a yeast extract containing TAP-tagged Khd1p. Khd1p-TAP from the yeast extract was retained by an immobilized GST-eIF4G1 recombinant protein, but not by GST alone (Figure 20A). Treatment with RNase A disrupted this complex, suggesting that the interaction is facilitated by the presence of RNA. No interaction between Khd1p-TAP and the cap binding protein eIF4E was detected by this approach (data not shown).

Since the interaction between Khd1p and eIF4G1 is RNA-dependent, it could be the result of the two proteins being bound to the same RNA. In order to verify this possibility, the same GST-pulldown assay was performed with myc-tagged She2p. Since both Khd1p and She2p bind the E1 element of the *ASH1* mRNA, one can expect She2p to interact with eIF4G1 if the interaction is solely the result of RNA-binding. Using this assay, She2p and eIF4G1 did not interact in the presence or absence of RNA (Figure 20B), suggesting that indirect protein-RNA interactions do not explain the association of eIF4G and Khd1p. Moreover, the interaction between Khd1p and eIF4G1 was confirmed *in vitro* by using recombinant GST-eIF4G1 and Khd1p-His₆ purified from bacteria (Figure 20C). To identify the Khd1p binding site on eIF4G1, recombinant GST fusions of deletion mutants of eIF4G1 were generated and tested in GST-pulldown assays with the TAP-tagged Khd1 protein. The results show that only the fusions that contain the C-terminal domain of eIF4G1, from amino acids 850 to 952, are capable of binding Khd1p-TAP (Figure 20D).

While these results showed that the C-terminal domain of eIF4G1 interacts with Khd1p, they did not prove that this interaction is involved in the translational control of the *ASH1* mRNA. The implication of the C-terminal domain of eIF4G1 in the translational control of the *ASH1* mRNA was assessed *in vivo* by using a yeast strain knocked out for both *TIF4631* (eIF4G1) and *TIF4632* (eIF4G2) genes, and which only expressed full length eIF4G1 (eIF4G1 WT) or a C-terminal deletion of eIF4G1 (eIF4G1- Δ Cterm) from a single copy vector. Since general translation was decreased in the strain lacking the C-terminal domain of eIF4G1 (Berset et al., 2003), the luciferase activity was normalized on the total protein concentration from the extracts in order to compare the relative luciferase activity of these strains despite the deletion of the C-terminal domain of eIF4G1. As shown in Figure 20E, the expression of the Ash1₁₋₉₀₀-luciferase fusion was increased by 1.7 fold in the strain expressing eIF4G1- Δ Cterm compared to the strain expressing the full length eIF4G1. In comparison, the expression of luciferase alone showed no significant difference

between the two strains (Figure 20F). These results suggest that the C-terminal domain of eIF4G1 is involved in the translational control of the *ASH1* mRNA.

2.3.4 Khd1p is phosphorylated by the plasma membrane-anchored casein kinase Yck1p

The identification of eIF4G1 and Khd1p as key actors in the regulation of *ASH1* mRNA translation raises the question of how the translation of this transcript is activated. As we and others have shown, translational control is important for the proper sorting of Ash1p (Chartrand, 2002; Gu et al., 2004). However, there must be a mechanism to activate the translation of the *ASH1* mRNA as it reaches the bud tip. One possibility is that post-translational modification of Khd1p could remodel the translation regulation complex and trigger the release of *ASH1* mRNA from translational repression, allowing local protein synthesis at the bud tip. Indeed, previous studies have reported that the phosphorylation of tyrosine residues near the KH-domain proteins hnRNP K and ZBP1 modulate their activity as translational regulators (Huttelmaier, 2005; Ostareck-Lederer et al., 2002).

To verify that Khd1p is a phosphoprotein, a metabolic labelling of yeasts expressing Khd1p-GFP or GFP alone was performed using P^{32} -labelled orthophosphate, followed by immunoprecipitation using an anti-GFP antibody. As shown in Figure 21A, P^{32} -labelled Khd1-GFP was detected by autoradiography, which shows that Khd1p is indeed phosphorylated *in vivo*. To identify a candidate kinase involved in Khd1p phosphorylation, we turned toward an *in vitro* large scale phosphorylation study of yeast kinases that reported that Khd1p is a substrate for the serine/threonine kinase Yck1p, a type 1 casein kinase (CK1) (Ptacek et al., 2005). To assess the relevance of Yck1p activity on the translational regulation of the *ASH1* mRNA *in vivo*, the expression of the Ash1₁₋₉₀₀-luciferase reporter was measured in a WT, a *yck1* knockout and in a *khd1 yck1* double knockout strains. As shown in Figure 21B, Ash1-luciferase activity was reduced by 2.5 fold in a *yck1* strain compared to a WT strain. Northern blots indicated that the Yck1p-dependant regulation of Ash1-luciferase expression was not due to variations in mRNA levels (Figure 21C). Normal Ash1-luciferase expression was restored in a *khd1 yck1* double knockout, suggesting that Yck1p is involved in the translational control of the *ASH1*₁₋₉₀₀-*LUC* mRNA and acts through Khd1p.

Yck1p is anchored at the plasma membrane (Babu et al., 2002), while Khd1p accumulates in the cytoplasm (Huh, 2003). To determine if Yck1p interacts with Khd1p *in*

in vivo, a Split-Venus protein complementation assay was used (Michnick et al., 2006). In this assay, based on a split fluorescent protein, Khd1p was fused to fragment 2 of the Venus protein (VF2), while Yck1p harboured an N-terminal Venus fragment 1 (VF1). When both proteins were co-expressed, the fluorescence of the reconstituted Venus protein was observed at the cell periphery, indicating that Khd1p and Yck1p can interact *in vivo* (panel a, Figure 21D). When Khd1p-VF2 was co-expressed with VF1 alone, a diffuse cytoplasmic fluorescence signal was observed (panel c, Figure 21D). Co-expression of VF2 and VF1-Yck1p, or VF2 and VF1 showed no fluorescent signal (panels e and g, Figure 21D). Altogether, these results show that Yck1p can interact with Khd1p at the plasma membrane.

To determine if Khd1p is directly phosphorylated by Yck1p, recombinant GST-Khd1p was expressed and purified from *E. coli*, and used in an *in vitro* phosphorylation assay with yeast purified His-tagged Yck1p (Moriya and Johnston, 2004). This assay showed that full-length GST-Khd1p was readily phosphorylated *in vitro* by Yck1p-His-proA (Figure 22B). Yeast purified Yck1p-His-proA was pulled-down by GST-Khd1p *in vitro*, but not by GST alone, confirming the interaction between these two proteins (Supplementary Figure 26A). Finally, recombinant type 1 casein kinase (CK1) from rat was also found to phosphorylate GST-Khd1p *in vitro*, which supports the observation that Khd1p is a substrate for CK1 (Supplementary Figure 26B). To identify the Yck1p phosphorylation site(s) on Khd1p, deletions mutants of Khd1p were used in the *in vitro* phosphorylation assay (Figure 22A). While *in silico* analysis predicted two perfect CK1 sites within the first 260 amino acids of Khd1p, only a fragment that consists of the last 49 amino acids, next to the third KH domain, was found to be phosphorylated by Yck1p *in vitro* (Figure 22B). Within these 49 amino acids, 4 serines and 2 threonines constitute potential phosphorylation sites and all match the CK1 consensus site: D/E₂₋₄-X₂₋₄-S/T (Kennelly and Krebs, 1991). To confirm that these six residues constitute the Yck1p phosphorylation site of Khd1p, they were all mutated to alanines, and the resulting GST-Khd1p-MUT protein was poorly phosphorylated by Yck1p (Figure 22C). Interestingly, a recent large scale phospho-proteomic analysis in *S. cerevisiae* reported the identification of a phospho-serine residue at position 358 of Khd1p purified from yeast (Chi, 2007). This serine is one of the mutated residues in the GST-Khd1-MUT protein (asterisk in Figure 22A), suggesting that Yck1p might phosphorylate this residue.

2.3.5 Phosphorylation of Khd1p at its C-terminus reduces its RNA-binding capacity

These results raise the question of the impact of Khd1p phosphorylation on its function as an RNA-binding protein and as a translational repressor. Since the phosphorylation of RNA-binding proteins has previously been shown to decrease their affinity for RNA (Ostareck-Lederer et al., 2002), the phosphorylation of Khd1p by Yck1p may affect its interaction with the E1 RNA. To test this possibility, recombinant GST-Khd1p purified from bacteria was phosphorylated *in vitro* by rat CK1 and used in a gel shift assay with the E1 RNA. Rat CK1 was used because of its higher enzymatic activity and the fact that it phosphorylates the same residues on Khd1p as Yck1p (as shown by the poor phosphorylation of the Khd1-MUT protein by the rat CK1; Supplementary Figure 27C). CK1-phosphorylated GST-Khd1p interacted weakly with the E1 RNA compared to the unphosphorylated form of GST-Khd1p (Figure 22D), suggesting that CK1 phosphorylation decrease the RNA-binding capacity of Khd1p.

2.3.6 Phosphorylation of Khd1p relieves the translational repression on an *ASH1* reporter mRNA

Finally, the Khd1 and Khd1-MUT proteins were expressed at near endogenous level in yeast from a single copy plasmid with the *KHD1* promoter (plasmids p*KHD1* and p*KHD1-MUT*). We first established that the mutations at the C-terminal end of Khd1p had no effect on its expression level compared to wild-type Khd1p (Supplementary Figure 27A). Khd1p-MUT was as functional as the wild-type Khd1 protein, since a Khd1p-MUT-GFP was retained by an immobilized GST-eIF4G1 recombinant protein (Supplementary Figure 27B) and recombinant GST-Khd1p-MUT had the same capacity to bind RNA than the WT Khd1p (data not shown). To determine the effect of the mutations of the six C-terminal serine and threonine residues on the phosphorylation of Khd1p *in vivo*, a metabolic labelling of yeasts expressing Khd1p-GFP or Khd1p-MUT-GFP was performed using P³²-labelled orthophosphate, followed by immunoprecipitation using an anti-GFP antibody. As shown in Figure 22E, while P³²-labelled Khd1p-GFP was detected, little phospho-labelled Khd1p-MUT-GFP was present after immunoprecipitation, suggesting that these mutations decrease the phosphorylation of Khd1p *in vivo*.

The significance of the phosphorylation of Khd1p on the translation of the *ASH1*₁₋₉₀₀-*LUC* mRNA was also assessed. A *khd1* yeast strain co-transformed with the WT *KHD1* plasmid and the *ASH1*₁₋₉₀₀-*LUC* reporter had the same luciferase activity than a wild-type

yeast strain (bars 1 and 2, Figure 22F). The translation of the *ASH1*₁₋₉₀₀-*LUC* mRNA was sensitive to the deletion of the *YCK1* gene when the wild-type *KHDI* plasmid was present, as shown by the nearly two-fold decrease in luciferase activity in this strain (bar 3, Figure 22F). Mutations of the S/T residues of Khd1p that are phosphorylated by Yck1p had the same effect on the luciferase activity than the deletion of *YCK1* (compare bars 2 and 3, versus 2 and 4; Figure 22F). Moreover, deletion of *YCK1* had no impact on the luciferase activity in the yeast strain expressing Khd1p-MUT (compare bars 4 and 5, Figure 22F), suggesting that the effect of Yck1p on the translation of the *ASH1*₁₋₉₀₀-*LUC* reporter mRNA is mediated by its phosphorylation of the serine and threonine residues at the C-terminal end of Khd1p. From all these results, we conclude that phosphorylation of the C-terminal serine and threonine residues of Khd1p by Yck1p decreases its activity as a translational repressor by interfering with its binding to the localization element E1 of the *ASH1* mRNA.

2.4 DISCUSSION

2.4.1 Khd1p: an unconventional translational regulator.

Several KH-domain proteins, like hnRNP K, ZBP1 and GLD-1, are known regulators of translation (Huttelmaier, 2005; Jan, 1999; Ostareck-Lederer et al., 2002). But how these factors interact with the translation initiation machinery and repress translation is still unknown. In the current study, we have identified Khd1p as a bona-fide eIF4G1 interacting protein that regulates the translation of the *ASH1* mRNA. First, deletion of *KHDI* enhances the ribosome load on the *ASH1* mRNA, resulting in increased synthesis of the Ash1 protein. Second, Khd1p interacts directly with the localization element E1 of the *ASH1* mRNA, and with the C-terminal domain of eIF4G1. Third, deletion of the C-terminal domain of eIF4G1 increases the translation of an *ASH1-LUC* mRNA reporter, suggesting that this domain of eIF4G1 is involved in the translational control of this transcript. Previous evidence of a role for Khd1p in the control of *ASH1* mRNA translation came from the overexpression of this factor, which results in a reduced Ash1p level in yeast (Irie et al., 2002). There is also genetic evidence that Khd1p regulates the asymmetric activation of the *HO* promoter, which is repressed by Ash1p. Overexpression of Khd1p suppresses *myo4* and *she3* deletions in a genetic assay based on the asymmetric activation of the *HO* promoter, pointing toward a role of Khd1p in the regulation of the *ASH1/SHE* pathway (Irie et al., 2002; Tadauchi et al., 2004).

The finding that the deletion of *KHDI* results in increased accumulation of Ash1p in the mother cell nucleus, even if the *ASH1* mRNA is still properly localized at the bud tip, underlines the importance of combining translational control to mRNA transport in order to avoid any premature protein synthesis before the transcript reaches its final destination. In the absence of Khd1p, early Ash1p synthesis during the transport of the *ASH1* mRNA results in the ectopic accumulation of Ash1p in the mother cell nucleus. As Puf6p is also implicated in the translational control of the *ASH1* mRNA (Gu et al., 2004), this double control of Ash1p synthesis may reduce any undesirable leakage of this factor to the mother cell before cytokinesis, which would be detrimental to the asymmetry in mating type switching.

This study also reveals that Khd1p is an unconventional regulator of translation. First, most known translational repressors or activators interact with mRNAs in their 5' or 3' untranslated regions (Moor et al., 2005; Pickering and Willis, 2005). Surprisingly, Khd1p is instead recruited within the coding sequence of the mRNA it regulates. To our knowledge, this is the only known translational regulator to do so. Since Khd1p has been reported to interact with several other mRNAs beside *ASH1* (Gerber, 2004), it will be interesting to find if it binds these transcripts in their coding sequences and repress their translation. Second, Khd1p interacts with the C-terminal domain of eIF4G1, a domain not usually targeted by translation regulation factors. Unlike the mammalian eIF4G, the yeast eIF4G C-terminal domain does not recruit the kinase Mnk1, but binds RNA instead (Berset et al., 2003). The C-terminal end contains one of the three RNA-binding domains of eIF4G1 and it is important for its function since its deletion reduces protein synthesis in yeast. However, its specific role is not clear yet. While recombinant Khd1p and eIF4G1 were found to interact *in vitro*, their association may be enhanced by the interaction with the localization element E1, as suggested by the RNA-dependency of their interaction in the GST pulldown assays. Our data support a model in which Khd1p bound to the localization element E1 interacts with eIF4G1 and affects its capacity to promote translation initiation on the *ASH1* mRNA (Figure 23A). The mechanism by which the Khd1p-eIF4G1 interaction inhibits translation initiation remains to be elucidated.

2.4.2 A role for CK1 in translational control

Type 1 casein kinase (CK1) is a ubiquitous kinase in the eukaryotic kingdom and is involved in processes as various as cell division, apoptosis and membrane transport

(Knippschild et al., 2005). It is also implicated in the regulation of the Wnt and hedgehog pathways, which play crucial roles in many aspects of development in vertebrate and invertebrate (Price, 2006). In this study, we have identified a function for this kinase in the translational control of a specific mRNA and in regulating the spatio-temporal expression of a cell fate determinant.

Our results show that the yeast casein kinase Yck1p is important for relieving the Khd1p-mediated translational control on the *ASH1* mRNA. First, Yck1p interacts with Khd1p at the plasma membrane and phosphorylates its C-terminal end. Second, this phosphorylation decreases the affinity between Khd1p and the localization element E1. Third, mutagenesis of the CK1-phosphorylated residues at the C-terminal end of Khd1p and the deletion of *YCK1* decrease the translation of an *ASH1* reporter mRNA, suggesting that Yck1p is important for the activation of *ASH1* mRNA translation. Data from epifluorescence microscopy show that while Khd1p is present in the cytoplasm, Yck1p and Khd1p interact only at the plasma membrane. Since Khd1p co-localizes with the *ASH1* mRNA at the bud tip (Irie et al., 2002), this would restrict the location where the *ASH1* mRNA/Khd1p complex comes in proximity with Yck1p to the bud cortex. From these results, we propose that the translation of *ASH1* mRNA is controlled by the Khd1p/eIF4G1 complex during its transport (Figure 23B). As the *ASH1* mRNA/Khd1p/eIF4G1 complex reaches the bud tip, Khd1p is phosphorylated by Yck1p anchored at the plasma membrane, relieving its interaction with the *ASH1* mRNA and activating its translation locally. In this model, the localization machinery controls the location where the *ASH1* mRNA is to be translated (the bud tip), while the Khd1p/Yck1p interaction controls both the location and the time when the *ASH1* mRNA is to be translated (as it reaches the bud tip). In the absence of Yck1p, Khd1p maintains its repression on the translation of the *ASH1* mRNA, which would explain the decreased level of Ash1-luciferase protein in a *yck1* strain. But why is there a need for a rapid activation of *ASH1* mRNA translation when it reaches the bud tip? One explanation comes from the finding that insertion of a stop codon after the initiation codon of the *ASH1* mRNA reduces its tight localization at the cortex (Gonzalez et al., 1999; Irie et al., 2002), implicating translation in the process of cortical anchoring of this mRNA.

Interestingly, another kinase known to regulate the translation of a localized transcript is Src, a membrane-anchored kinase that promotes translation of the neurite localized β -actin mRNA (Huttelmaier, 2005). Since most localized mRNAs in species

studied so far are targeted close to the plasma membrane, membrane-associated kinases like Src and CK1 may be key regulators of the local translation of these transcripts or in releasing these mRNAs from their localization machinery, through their capacity to phosphorylate the RNA-binding proteins associated with these transcripts.

2.5 MATERIAL AND METHODS

2.5.1 Growth media and yeast strains

Yeast cells were grown in either synthetic growth media lacking the nutrients indicated or rich media (Rose, 1990). Transformation was performed according to the protocol of Gietz and Schiestl (Schiestl, 1989). Yeast gene disruption cassette was created by PCR amplification of the *loxP*-KAN-*loxP* construct in plasmid pUG6 and primers specific for the gene of interest (Guldener et al., 1996). Specific disruption was confirmed by PCR analysis of genomic DNA. Yeasts strains used in this study are described in the Supplementary Table 1.

2.5.2 Plasmid constructions

Plasmid YIP128-*GAL1prom-ASH1-MYC* is described in Chartrand et al. (2002). Plasmids containing *ASH1*-luciferase fusions were made from the *Firefly* luciferase of the pGL3 plasmid (Promega). All luciferase fusions are in-frame with the Ash1 protein. The luciferase fusion under the endogenous *ASH1* promoter containing the *ASH1*₁₋₉₀₀ fragment was obtained by subcloning the SacI-NcoI fragment of C3319 in pGL3 Basic (Promega). The SacI-SalI fragment from the resulting vector was subcloned in YCP33. *ASH1*₁₋₆₂₁-*FLuc* and *FLuc* were cloned under *ASH1* endogenous promoter in YCP33 by recombination in yeast. All *KHD1* in fusion with GST were cloned in pGEX-4T-1 or pGEX-5X-3 (GE Healthcare) plasmids as EcoRI-XhoI PCR fragments. GST fusions of eIF4G were generated by PCR amplification. For Venus PCA fusions, *KHD1* was cloned as a XbaI-BspEI fragment in p415-linker-VF2 and *YCK1* was cloned as a EcoRI-BamHI fragment in p416-VF1-linker (kind gifts from Emily Manderson and Stephen W. Michnick). pPC3 and pPC4 were obtained by cloning a BspEI-XhoI GFP fragment in pPC1 and p415-VF2. Endogenous *KHD1* promoter, was cloned as SacI-PstI fragment in pPC4 to obtain pPC5. pKHD1 and pKHD1-MUT were cloned as XbaI-XhoI fragments in pPC5. Plasmids used in this study are described in Table 4 of Supplementary Data.

2.5.3 Luciferase assays

Overnight cell cultures were diluted to $OD_{600} = 0.1$ and grown to $OD_{600} = 0.8$ in 5mL cultures. Cells were resuspended in 150 μ L PBS 1X, 6mM NaN_3 , aprotinin, leupeptin, pepstatin, and PMSF and broken with glass beads. Extracts were cleared and 20 μ L of the extract was used with 80 μ L of LAR (Promega) for the luciferase assay and the results were normalized on the total protein concentration obtained by Bradford. All luciferase assays are the average of at least four independent experiments.

2.5.4 Northern Blots

RNA was purified from yeast cultures according to (Schmitt et al., 1990). Northern Blots were performed according to Sambrook and Russell (Sambrook, 2001). *ASH1*, *FLUC* and *ACT1* probes were labelled with [α - ^{32}P] dCTP using Ready-To-Go DNA Labelling Beads - dCTP (Amersham).

2.5.5 Fluorescence in situ hybridization and immunofluorescence

Yeast cells were processed for fluorescent in-situ hybridization and immunofluorescence according to the protocols described in (Chartrand, 2000). For in-situ hybridization, yeast spheroplasts were hybridized with a pool of Cy3-conjugated *ASH1* DNA oligonucleotide probes. For immunofluorescence, a 1:50 dilution of a mouse anti-myc 9E10 antibody (Roche) was used as primary antibody. For the secondary antibody, a 1:1000 dilution of a Donkey anti-Mouse Oregon Green-conjugated antibody (Jackson Laboratories) was used.

2.5.6 GST pulldowns

GST fusions of eIF4G1 were purified according to (Tarun, 1996). Briefly, transformed BL21 cells were grown to an OD_{600} of 0.6 in 1L and induced with 0.5 mM IPTG for 4 hours. Cells washed with Buffer C (150mM NaCl, 16mM Na_2HPO_4 , 4mM NaH_2PO_4), resuspended in 10mL and aliquoted in 2mL and frozen at $-80^\circ C$. Aliquot containing recombinant GST-eIF4G1 was thawed, brought to 0.1% Triton X-100, 87.5 μ g/mL PMSF, 5 μ g/mL pepstatin, 5 μ g/mL aprotinin, 5 μ g/mL leupeptin and sonicated 10 sec then put on ice 5 times. Extract was cleared and supernatant was incubated 1.5 hours at $4^\circ C$ with glutathion-sepharose-4B (Amersham) and washed three times with buffer C, 0.1% Triton X-100. Strains S288C-Khd1-TAP and K699-She2-myc were grown to an OD_{600} of 1, and 100 OD_{600} were broken with glass beads in 1 ml of buffer A (PBS 1X, 0.1% triton X-100,

87.5 µg/mL PMSF, 5 µg/mL pepstatin, 5 µg/mL aprotinin, 5 µg/mL leupeptin). Extract was cleared and the supernatant was applied on immobilised GST-eIF4G1 for 2 hours at 4°C. Beads were washed 5 times in buffer A and eluted by boiling in loading buffer for 3 min. Eluted proteins were loaded on a 10% SDS-PAGE gel and transferred to Hybond-ECL nitrocellulose membrane (Amersham). The membrane was first incubated with a Goat anti-mouse-HRP (1:1000) (Amersham) and secondly with a Rabbit anti-Goat-HRP (1:1000) (Sigma) and revealed with the ECL-kit (Amersham).

2.5.7 Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)

To produce *in vitro* transcribed RNA, plasmids pGEM-E1 and pGEM-IRE were linearized with EcoR1, and transcribed with T7 RNA polymerase in the presence of [α -³²P]CTP (Jorgen, 1998). The transcripts were purified on 6% denaturing polyacrylamide gels, then extracted, and desalted on G25 Sephadex spin columns (Roche). For unlabelled RNAs, the transcripts were purified, after treatment with DNase1, by phenol/chloroform extraction, ethanol precipitation and desalting on G25 Sephadex spin columns. GST-Khd1p was expressed and purified according to the protocol published by Pharmacia. For EMSA, the ³²P-labelled RNA was denatured by heating at 85°C for 2 minutes in the binding buffer and allowed to fold at room temperature for 10 minutes. A total of 10 000 CPM of labelled RNA (~ 1 ng) were added to the binding buffer (10 mM Hepes pH. 7.4, 150 mM KCl, 1 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 4 % glycerol, 15 U RNase Inhibitor (Pharmacia)) prior to the addition of various concentration of recombinant protein, up to a final volume of 20 µl. The reactions were incubated at 4°C for 30 minutes, then 2 µl of 10 mg/ml heparin was added and incubated for 10 more minutes at 4°C to prevent non-specific interactions. The samples were separated on a 4% non-denaturing gel at 120V for 4hrs at 4°C, dried and exposed overnight with Kodak films. For competition experiments, unlabelled RNAs were added prior to the addition of the protein.

2.6 ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Emily Manderson and Stephen W. Michnick for the split-Venus complementation assay yeast vectors, John E. G. McCarthy for anti-eIF4G antibody, Tobias von der Haar for recombinant GST-eIF4G1, Michael Altmann and Hans Trachsel for recombinant deletions of eIF4G1 in fusion with GST, Gerardo Ferbeyre for Goat anti-mouse-HRP and Rabbit anti-Goat-HRP antibodies, Jon Lorsch for recombinant eIF4E,

Mark Johnston for Yck1p-proA-His vector, Jon Warner for anti-Rpl3 antibody and Yannick Sylvestre for technical support. We also thank Emmanuelle Querido, Gerardo Ferbeyre, Luc DesGroseillers and Léa Brakier-Gingras for their advices on the manuscript. This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) and the Fond de Recherche sur la Nature et les Technologies du Québec (NATEQ). M.M was supported by a EURODOC fellowship. P.C was supported by fellowships from NATEQ and the Fond de Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

2.7 REFERENCES

- Babu, P., Bryan, J. D., Panek, H. R., Jordan, S. L., Forbrich, B. M., Kelley, S. C., Colvin, R. T., and Robinson, L. C. (2002). Plasma membrane localization of the Yck2p yeast casein kinase 1 isoform requires the C-terminal extension and secretory pathway function. *J Cell Sci* 115, 4957-4968.
- Berset, C., Zurbriggen, A., Djafarzadeh, S., Altmann, M., and Trachsel, H. (2003). RNA-binding activity of translation initiation factor eIF4G1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 9, 871-880.
- Bohl, F., Kruse, C., Frank, A., Ferring, D., and Jansen, R.-P. (2000). She2p, a novel RNA-binding protein tethers ASH1 mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p. *EMBO J* 19, 5514-5524.
- Chartrand, P., Meng, X.-H., Singer, R. H., and Long, R. M. (1999). Structural elements required for the localization of ASH1 mRNA and of a green fluorescent protein reporter particle in vivo. *Current Biology* 9, 333-336.
- Chartrand, P., Meng, X., Huttelmaier, S., Donato, D., Singer, R.H. (2002). Asymmetric sorting of Ash1p in yeast results from inhibition of translation by localization elements in the mRNA. *Mol Cell* 10, 1319-1330.
- Chartrand, P., Singer, R. H., and Long, R. M. (2001). RNP localization and transport in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 297-310.
- Chartrand, P., Singer, R.H., and Long, R.M. (2000). Sensitive and high-resolution detection of RNA in situ. *Methods in Enzymol* 318, 493-506.

- Chi, A., Huttenhower, C., Geer, L.Y., Coon, J.J., Syka, J.E.P., Bai, D.L., Shabanowitz, J., Burke, D.J., Troyanskaya, O.G., Hunt, D.F. (2007). Analysis of phosphorylation sites on proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry. *PNAS* *104*, 2193-2198.
- Darzacq, X., Powrie, E., Gu, W., Singer, R. H., and Zenklusen, D. (2003). RNA asymmetric distribution and daughter/mother differentiation in yeast. *Current Opinion in Microbiology* *6*, 614-620.
- Gavin, A.-C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L. J., Bastuck, S., Dumpelfeld, B., *et al.* (2006). Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* *440*, 631-636.
- Gavin, A.-C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., *et al.* (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* *415*, 141-147.
- Gerber, A. P., Herschlag, D., Brown, P.O. (2004). Extensive Association of Functionally and Cytotopically Related mRNAs with Puf Family RNA-Binding Proteins in Yeast. *PLoS Biology* *2*, 342-354.
- Gingras AC, R. B., Sonenberg N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* *68*, 913-963.
- Gonzalez, I., Buonomo, S. B. C., Nasmyth, K., and von Ahsen, U. (1999). ASH1 mRNA localization in yeast involves multiple secondary structural elements and Ash1 protein translation. *Current Biology* *9*, 337-340.
- Gu, W., Deng, Y., Zenklusen, D., and Singer, R. H. (2004). A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses ASH1 mRNA translation and is required for its localization. *Genes Dev* *18*, 1452-1465.
- Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J., and Hegemann, J. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucl Acids Res* *24*, 2519-2524.

- Huh, W. K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., O'Shea, E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686-691.
- Huttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Lorenz, M., Dichtenberg, J., Meng, X., Bassell, G. J., Condeelis, J., Singer, R. H., (2005). Spatial regulation of beta-actin mRNA translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* 438, 512-515.
- Irie, K., Tadauchi, T., Takizawa, P. A., Vale, R. D., Matsumoto, K., and Herskowitz, I. (2002). The Khd1 protein, which has three KH RNA-binding motifs, is required for proper localization of ASH1 mRNA in yeast. *EMBO J* 21, 1158-1167.
- Jan, E., Motzny, C.K., Graves, L.E., Goodwin, E.B. (1999). The STAR protein, GLD-1, is a translational regulator of sexual identity in *Caenorhabditis elegans*. *Embo J* 18, 258-269.
- Jansen, R.-P., Dowzer, C., Michaelis, C., Galova, M., and Nasmyth, K. (1996). Mother cell-specific HO expression in budding yeast depends on the unconventional myosin Myo4p and other cytoplasmic proteins. *Cell* 84, 687-697.
- Jorgen, K., Egebjerg, J., Christiansen, J. (1998). Analysis of RNA-protein complexes in vitro (Amsterdam, Elsevier).
- Kennelly, P. J., and Krebs, E. G. (1991). Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J Biol Chem* 266, 15555-15558.
- Kindler, S., Wang, H., Richter, D., and Tiedge, H. (2005). RNA transport and local control of translation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21, 223-245.
- Knippschild, U., Gocht, A., Wolff, S., Huber, N., Lohler, J., and Stoter, M. (2005). The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cellular Signalling* 17, 675-689.
- Kuersten, S., and Goodwin, E. B. (2003). The power of the 3'UTR: translational control and development. *Nature Reviews Genetics* 4, 626-637.

- Long, R. M., Gu, W., Lorimer, E., Singer, R. H., and Chartrand, P. (2000). She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to ASH1 mRNA. *EMBO J* *19*, 6592-6601.
- Long, R. M., Singer, R. H., Meng, X., Gonzalez, I., Nasmyth, K., and Jansen, R.-P. (1997). Mating Type Switching in Yeast Controlled by Asymmetric Localization of ASH1 mRNA. *Science* *277*, 383-387.
- Michnick, S. W., MacDonald, M. L., and Westwick, J. K. (2006). Chemical genetic strategies to delineate MAP kinase signaling pathways using protein-fragment complementation assays (PCA). *Methods* *40*, 287-293.
- Moor, C. H. d., Meijer, H., and Lissenden, S. (2005). Mechanisms of translational control by the 3' UTR in development and differentiation. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *16*, 49-58.
- Moriya, H., and Johnston, M. (2004). Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. *PNAS* *101*, 1572-1577.
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D. H., Cans, C., Neubauer, G., Bomszyk, K., Superti-Furga, G., and Hentze, M. W. (2002). c-Src-Mediated Phosphorylation of hnRNP K Drives Translational Activation of Specifically Silenced mRNAs. *Mol Cell Biol* *22*, 4535-4543.
- Pickering, B. M., and Willis, A. E. (2005). The implications of structured 5' untranslated regions on translation and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *16*, 39-47.
- Price, M. A. (2006). CKI, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling. *Genes Dev* *20*, 399-410.
- Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., Guo, H., Jona, G., Breitkreutz, A., Sopko, R., *et al.* (2005). Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* *438*, 679-684.
- Richter, J. D., and Sonenberg, N. (2005). Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* *433*, 477-480.

- Rose, M. D., Winston, F., and Hieter, P. (1990). *Methods in yeast genetics. A laboratory course manual* (Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sambrook, J., Russel, D. (2001). *Molecular Cloning, Vol 3, Third Edition edn* (Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Schiestl, R., Gietz, RD. (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Current Genetics* 16, 339-346.
- Schmitt, M. E., Brown, T. A., and Trumpower, B. L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl Acids Res* 18, 3091-3092.
- Sil, A., and Herskowitz, I. (1996). Identification of asymmetrically localized determinant, Ash1p, required for lineage-specific transcription of the yeast HO gene. *Cell* 84, 711-722.
- St Johnston, D. (2005). Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6, 363-375.
- Tadauchi, T., Inada, T., Matsumoto, K., and Irie, K. (2004). Posttranscriptional Regulation of HO Expression by the Mkt1-Pbp1 Complex. *Mol Cell Biol* 24, 3670-3681.
- Takizawa, P. A., Sil, A., Swedlow, JR., Herskowitz, I., Vale, RD. (1997). Actin-dependent localization of an mRNA encoding a cell-fate determinant in yeast. *Nature* 389, 90-93.
- Takizawa, P. A., and Vale, R. D. (2000). The myosin motor, Myo4p, binds Ash1 mRNA via the adapter protein, She3p. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 5273-5278.
- Tarun, S. Z., Sachs, A.B. (1996). Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *Embo J* 15, 7168-7177.

2.8 FIGURE LEGENDS

Figure 17: Khd1p regulates the translation of the *ASH1* mRNA through the localization element E1. (A) Detection of endogenous levels of Ash1p-myc and Pkg1p in a WT, *khd1* null, and *ash1* null strains by Western blot. (B) Endogenous levels of *ASH1* mRNA and *ACT1* mRNA in a WT, *khd1* null, and *ash1* null strain, detected by Northern blot. (C)

Schematic representation of the constructions used for the luciferase assays. Constructions are on single copy vectors and under the endogenous *ASH1* promoter. Numbers represent *ASH1* mRNA coding sequence nucleotides in frame with luciferase. (D) Luciferase assay for the Ash1₁₋₉₀₀-Luc fusion protein in WT, *khd1* and control strains normalized on total protein concentration. (E) Luciferase assay for Ash1₁₋₆₂₁-Luc protein in WT, *khd1* and control strains normalized on total protein concentration. (F) Electrophoresis mobility shift assay (EMSA) for GST-Khd1 with localization element E1 and the IRE RNA. Increasing concentration of recombinant GST-Khd1p (0, 0.3, 0.64, 1.6, 3.2 μ M in lanes 1 to 5 and 6 to 10; and 9.6 μ M in lanes 11 to 13) was added to P³² labelled RNA. The free RNA is indicated by an asterisk. Competition of the Khd1p-E1 RNA complex with unlabelled E1 RNA (10x, 50x and 150x excess, lanes 11 to 13). Paired t-test: * $P < 0.005$. Error bars indicate mean \pm standard deviation from at least four independent experiments.

Figure 18: Deletion of *KHD1* results in a redistribution of *ASH1* mRNA to the higher polysome fractions. (A) Sucrose gradient and relative distribution of *ASH1* mRNA and *ACT1* mRNA in a WT strain. (B) Sucrose gradient and relative distribution of *ASH1* mRNA and *ACT1* mRNA in a *khd1* strain. These results are representative of two independent experiments using dot blots, and a third using RT-PCR.

Figure 19: Deletion of *KHD1* decrease the asymmetric distribution of Ash1p. (A) Phenotypes of Ash1p-myc distribution in late-anaphase yeasts. DAPI: DNA marker. DIC: Nomarski. (B) Levels of asymmetric versus symmetric distribution of Ash1p in WT and *khd1* yeast strains. (C) Phenotypes of *ASH1* mRNA localization scored by fluorescent in-situ hybridization. (D) Levels of bud tip versus bud localized *ASH1* mRNA in WT and *khd1* yeast strains. Over 100 cells were counted and both phenotypes (localized and delocalized) were scored. Error bars indicate mean \pm standard deviation.

Figure 20: Khd1p interacts with the C-terminal domain of eIF4G1. (A) GST pulldown assays of yeast extract containing Khd1p-TAP with recombinant GST-eIF4G1. Lane 2: 1/16th of the extract was loaded on the gel. Lane 5: the extract was treated with RNase A prior to pulldown with GST-eIF4G1. (B) GST pulldown assays of yeast extract containing She2p-myc with recombinant GST-eIF4G1. Lane 5: the extract was treated with RNase A prior to pulldown with GST-eIF4G1. (C) GST pulldown assay of recombinant Khd1p-

His6x and GST-eIF4G1 purified from bacteria. (D) GST pulldown assays of yeast extract containing Khd1p-TAP with various deletions of recombinant GST-eIF4G1. eIF4G1 and its interaction domains are schematically represented. Numbers represent amino acids of eIF4G1 in fusion with GST. (E) Luciferase assay for Ash1₁₋₉₀₀-Luc fusion expressed in eIF4G1 WT and eIF4G1- Δ Cterm strains normalized on total protein concentration. Paired t-test: * $P < 0.001$. (F) Luciferase assay for WT firefly luciferase in eIF4G1 WT and eIF4G1- Δ Cterm strains normalized on total protein concentration. Error bars indicate mean \pm standard deviation from at least five independent experiments.

Figure 21: Khd1p phosphorylation by Yck1p controls its translational repression activity. (A) Khd1p is a phosphoprotein. Immunopurification of GFP or Khd1p-GFP from yeasts grown on P³²-labelled orthophosphate. Left panel, western blot using anti-GFP antibody. Right panel, autoradiography. (B) Luciferase assay for Ash1₁₋₉₀₀-Luc in WT, *yck1*, *khd1* *yck1* and *ash1* strains normalized on total protein concentration. Paired t-test: * $P < 0.005$. Error bars indicate mean \pm standard deviation from at least three independent experiments. (C) Levels of *ASH1*₁₋₉₀₀-*LUC* mRNA and *ACT1* mRNA in a WT, *yck1* null strain, *yck1* *khd1* double knockout strain, and *ash1* strain, as detected by Northern blot. (D) Split-Venus protein complementation assay between Khd1p and Yck1p.

Figure 22: Ser/Thr residues at the C-terminal end of Khd1p are phosphorylated by Yck1p and are important for the translational control of an *ASH1* reporter mRNA. (A) Description of the deletion fragments generated as GST-Khd1 fusion proteins. The last 34 amino acids of Khd1p are displayed. Underlined amino acids were mutated to alanine in the Khd1-MUT protein. *: Ser₃₅₈ was identified as a phospho-serine by Chi et al., (2007). (B) *In vitro* phosphorylation of GST-tagged fragments of Khd1p by the yeast purified Yck1p-proA-His. Left panel, Coomassie blue staining of the GST-Khd1p fragments used in the phosphorylation assay. Right panel, autoradiography of P³²-phosphorylated GST-Khd1 fragments. (C) *In vitro* phosphorylation of GST, GST-Khd1p and GST-Khd1-MUT proteins with yeast purified Yck1p. Left panel, Coomassie blue stained gel of the GST tagged proteins. Right panel, autoradiography of the P³²-phosphorylated GST-Khd1 proteins. (D) EMSA for GST-Khd1 or CK1-phosphorylated GST-Khd1 with localization element E1. Increasing concentration of recombinant GST-Khd1p (100, 250 and 500 nM in lanes 2 to 4, and 5 to 7) was added to P³² labelled RNA. The free RNA is indicated by

an asterisk. Unphosphorylated GST-Khd1 was incubated with CK1 without ATP. (E) Immunopurification of Khd1p-GFP or Khd1p-MUT-GFP from yeasts grown on P^{32} -labelled orthophosphate. Left panel, western blot using anti-GFP antibody. Right panel, autoradiography. (F) Luciferase activity from the Ash1₁₋₉₀₀-Luc protein expressed in: WT strain + control plasmid, *khd1* strain + pKHD1, *khd1 yck1* strain + pKHD1, *khd1* strain + pKHD1-MUT, *khd1 yck1* strain + pKHD1-MUT normalized on total protein concentration. Paired t-test: * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$. Error bars indicate mean \pm standard deviation from at least four independent experiments.

Figure 23: Model for the regulation of Khd1p-mediated translational repression of the *ASH1* mRNA. (A) Khd1p binds the localization element E1 of the *ASH1* mRNA and associates with eIF4G1 in order to repress the translation of this transcript. (B) Spatio-temporal regulation of the translation of *ASH1* mRNA. The *ASH1* mRNA is recruited by the Khd1p-eIF4G1 complex, which represses its translation (1), and associates with the localization machinery (2). The resulting RNP complex moves towards the bud through the actin cytoskeleton (3). Upon reaching the bud, Khd1p is phosphorylated by the membrane-anchored Yck1p (4) which leads to the local activation of *ASH1* mRNA translation (5).

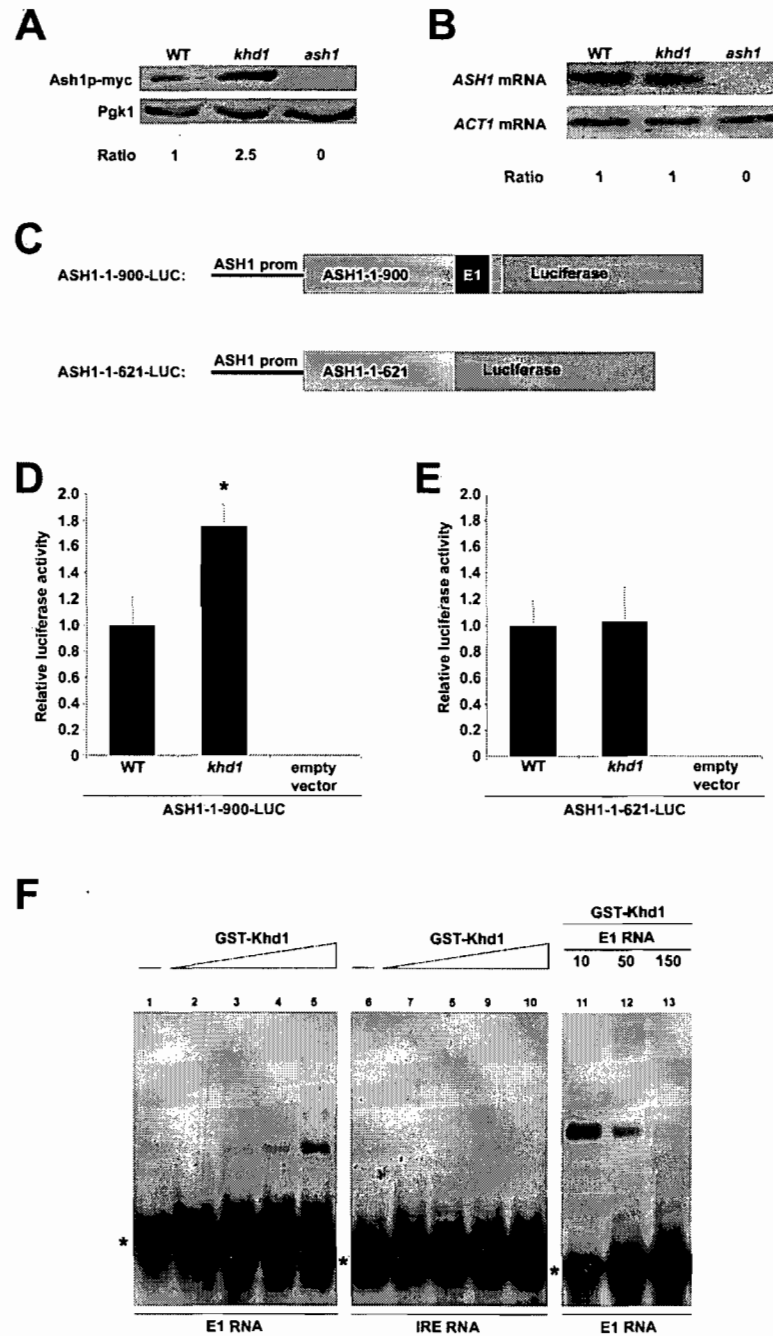


Figure 17: Khd1p regulates the translation of the *ASH1* mRNA through the localization element E1

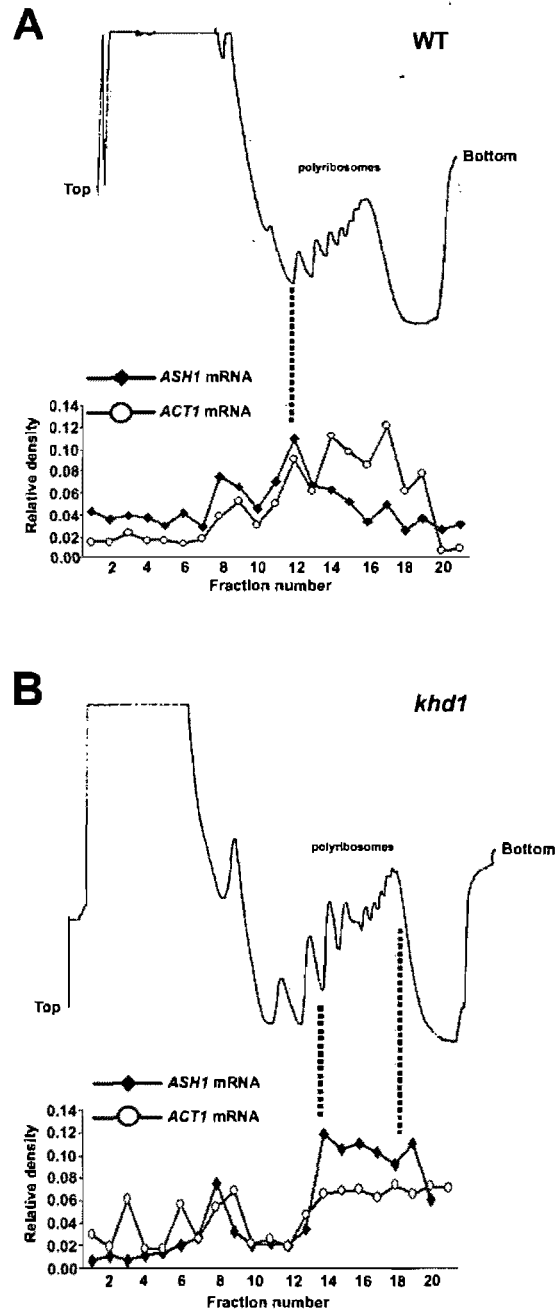


Figure 18: Deletion of *KHD1* results in a redistribution of *ASH1* mRNA to the higher polysome fractions

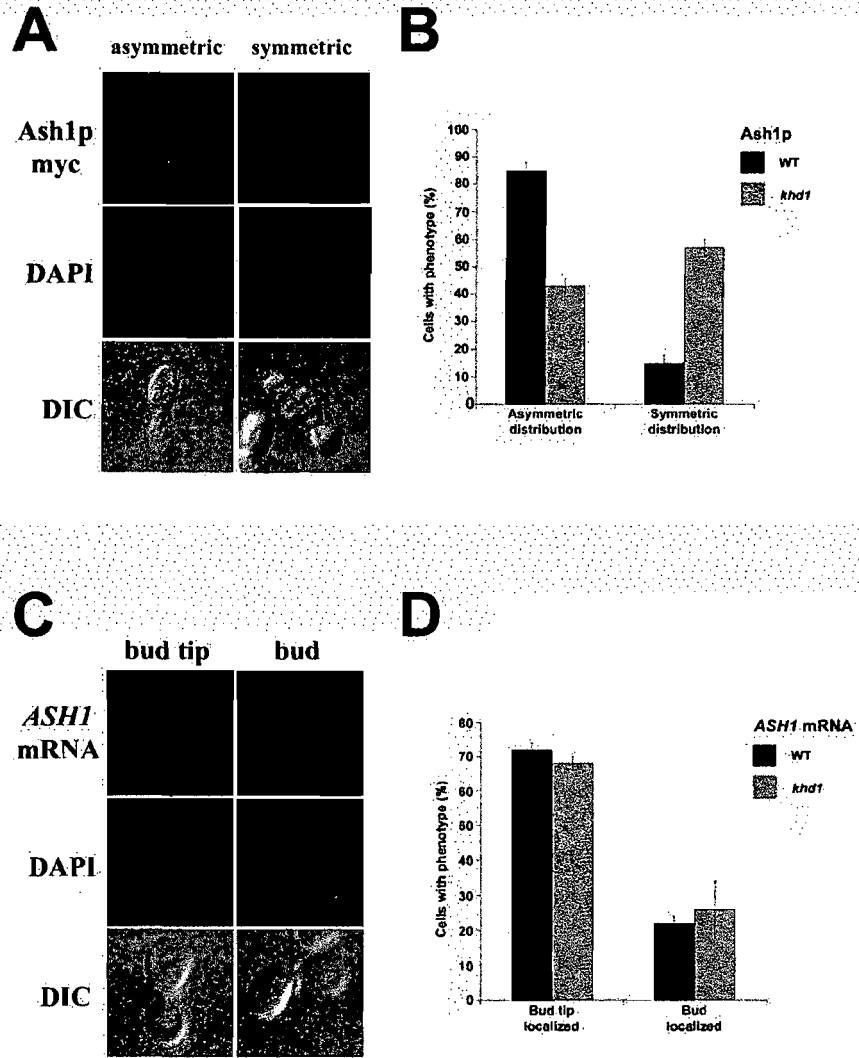


Figure 19: Deletion of *KHDI* decrease the asymmetric distribution of Ash1p

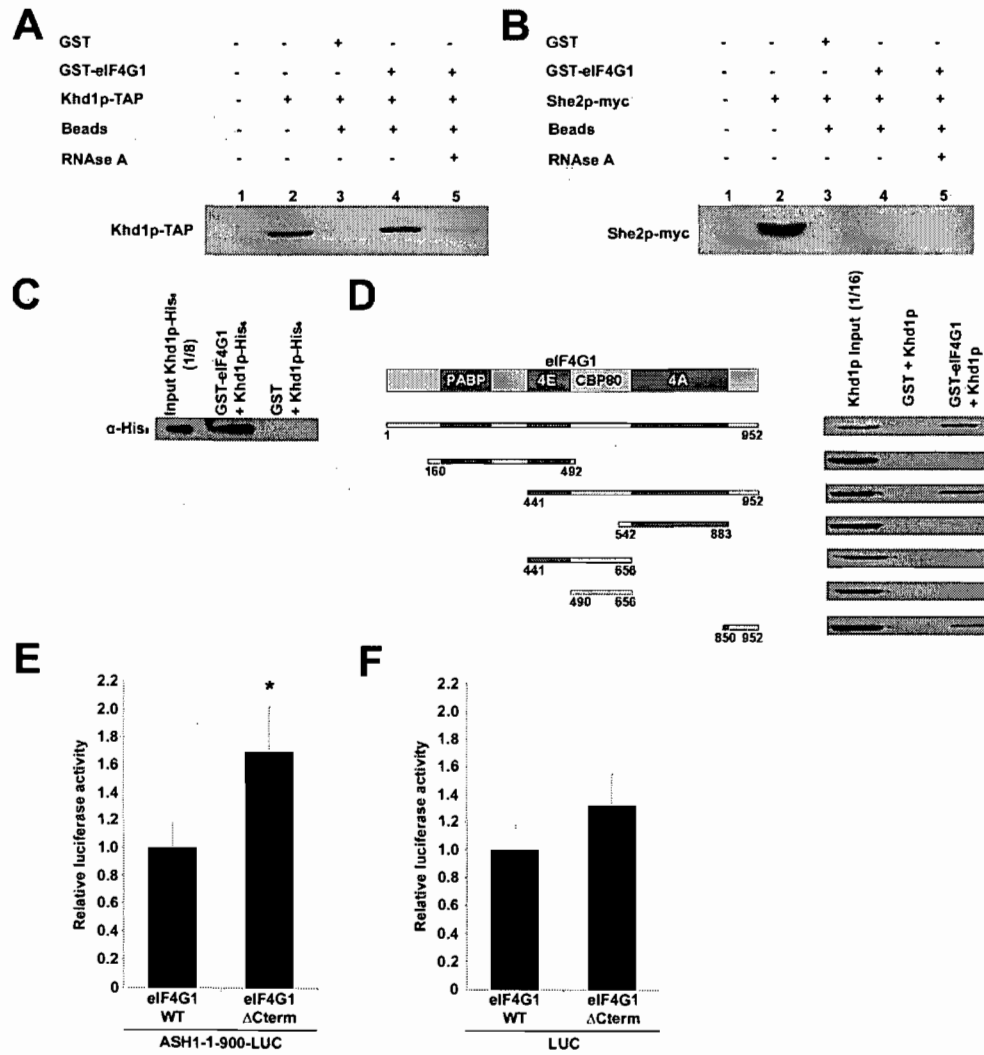


Figure 20: Khd1p interacts with the C-terminal domain of eIF4G1

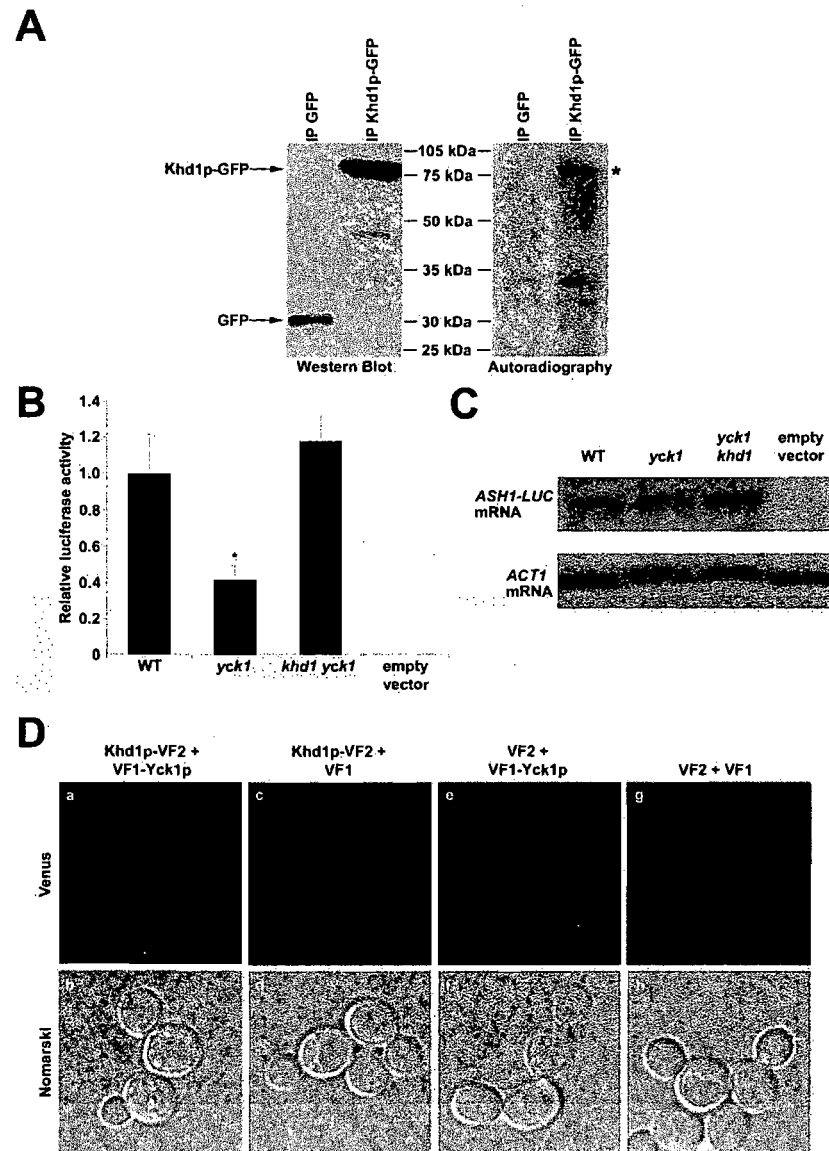


Figure 21: Khd1p phosphorylation by Yck1p controls its translational repression activity

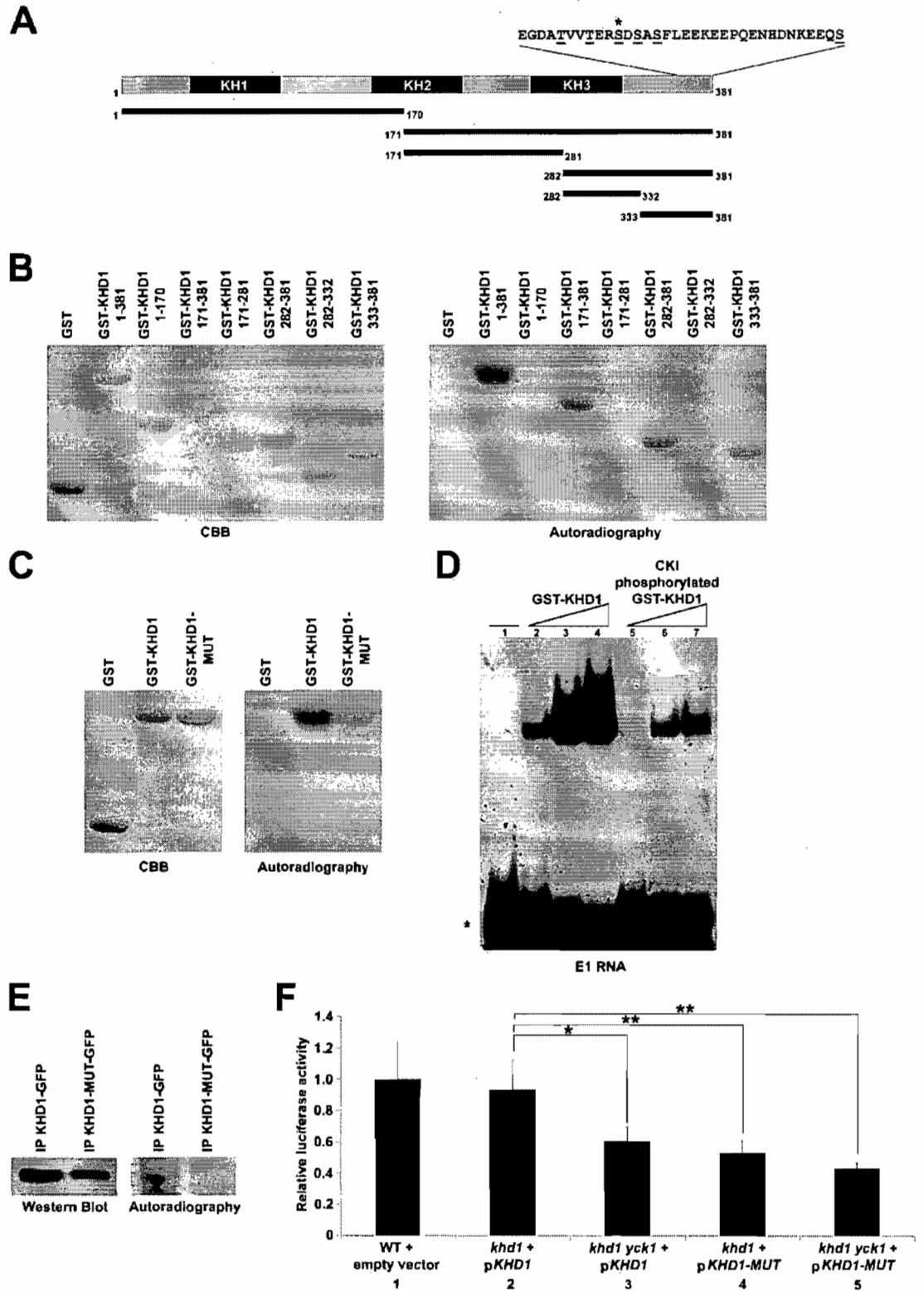


Figure 22: Ser/Thr residues at the C-terminal end of Khd1p are phosphorylated by Yck1p and are important for the translational control of an *ASH1* reporter mRNA

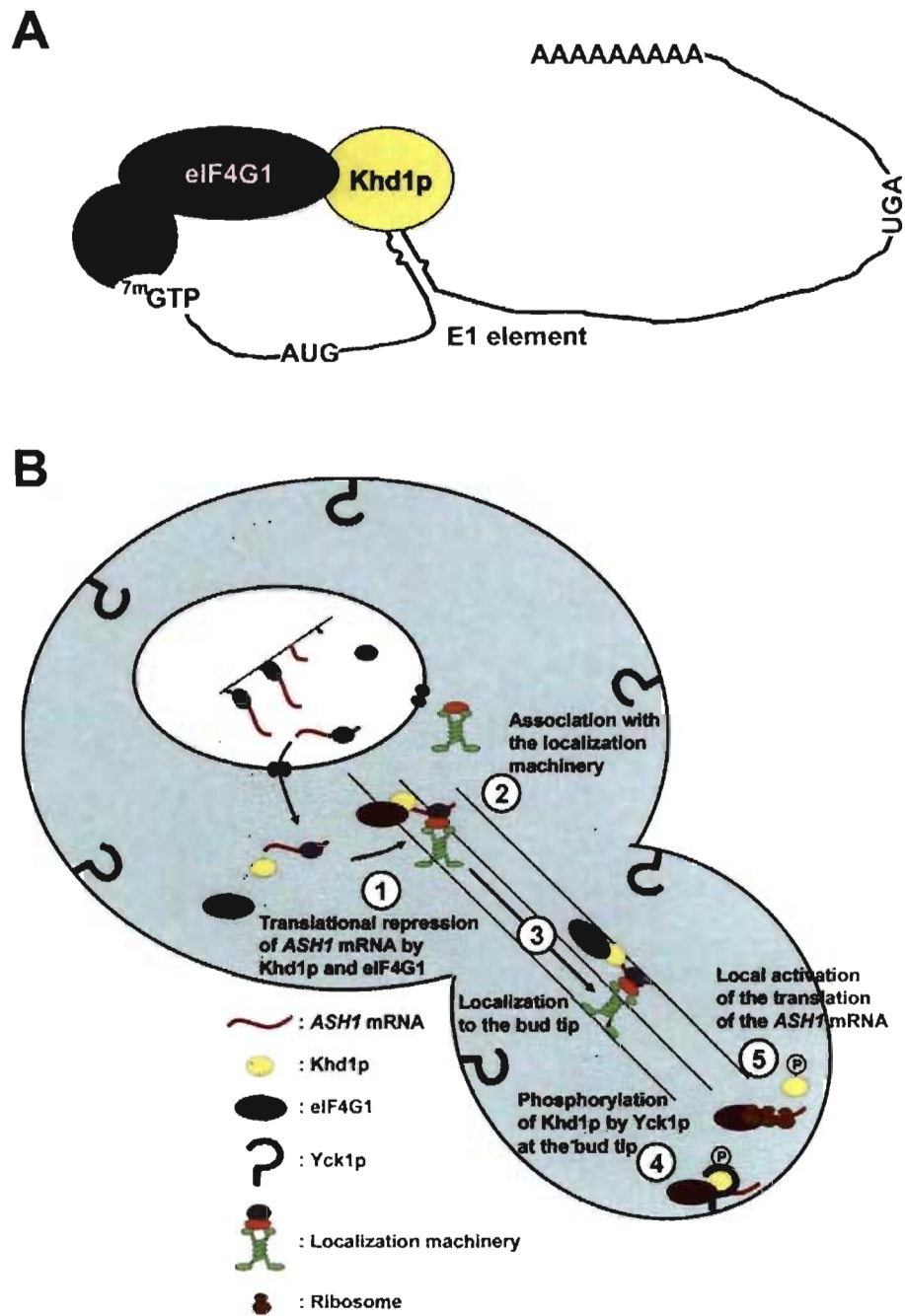


Figure 23: Model for the regulation of Khd1p-mediated translational repression of the *ASH1* mRNA

2.9 SUPPLEMENTARY DATA

2.9.1 MATERIAL AND METHODS

2.9.1.1 Ash1p kinetics and Western blots

For endogenous expression of Ash1p, cells were grown in YPD to an OD₆₀₀ of 0.8. For Ash1p kinetics, yeast cells were grown in 600 ml of non-inducible, non-repressive medium (2% lactic acid, 3% glycerol) up to an OD₆₀₀ of 0.2-0.4, induced with galactose and 50 ml samples were taken at different time points, to which NaN₃ (6 mM final concentration) was added to stop all reactions. Yeast cells were processed with 500 µl of glass beads mixed with 500 µl of sample buffer (60 mM Tris pH 6.8, 0.5mM PMSF, 0.5 mM Benzamidine, pepstatin, leupeptin, aprotinin, 10% glycerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol and 0.0025% Bromophenol Blue). The tubes were vortex 45 seconds and put on ice 45 seconds, repeated 4 times. After a centrifugation of 5 minutes, the supernatant was recovered. For the Western blot, yeast extracts was loaded on a 10% SDS-PAGE gel and transferred to a nitrocellulose membrane. Ash1p-myc was detected using a mouse anti-myc antibody (9E10; Roche) and Pgk1p was detected with a mouse anti-Pgk1 antibody (Molecular Probes), following by a HRP-labelled goat anti-mouse secondary antibody (Jackson Laboratories) and revealed with the ECL kit (AmershamPharmacia). Western blots were quantified using the Scion Image software (NIH Image). The results are the average of at least three independent experiments.

2.9.1.2 Sucrose gradients and dot blots

Yeast cultures were grown in the selection medium and reached stationary phase (D.O.₆₀₀ 1.0 to 1.5). Polysome disassembly was inhibited by adding 100µg/ml cycloheximide (Sigma) for 15 minutes on ice. Cells were harvested by centrifugation 10 minutes at 4000 rpm, washed twice with water (10 ml) containing 100µg/ml cycloheximide and lysed with glass beads and 1X lysis buffer (25mM Tris HCl pH 7.2, 50mM KCl, 30mM MgCl₂, 5mM β-mercaptoethanol, 200µg/ml cycloheximide, 2µg/ml aprotonin, 1mM PMSF, 0,5µg/ml leupeptin, 2,9 µg/ml E64, 1 µg/ml antipaine, 0.2 µg/ml chymostatine and 20mM VRC). Cells supernatant was transferred into an Eppendorf tube and centrifuged 10 minutes at 6500 rpm. at 4°C, and a second time at 14000 rpm. Finally, 300 µl to 500 µl of supernatant were loaded on a 10-50 % sucrose gradient (10 mM Tris pH 7.4, 70 mM NH₄Cl, 4mM MgOAc) and centrifuged at 36000 rpm. for 2.5 hours at 4°C with a Beckman SW41 rotor

(210 000G). For each gradient, 21 fractions of 500 μ l were collected in Eppendorf tubes while the gradient profile was monitored at OD₂₅₄. Each fraction was phenol extracted and the RNA was precipitated with ethanol.

Dot blot assay was performed on sucrose gradient fractions. Briefly, samples were first denatured at 65°C for 5 minutes and then applied on Hybond-N membrane (Amersham). Samples crosslinked by UV were washed 2 hours at 68°C with hybridization solution (0,5M NaHPO₄, 7% SDS, 1mM EDTA). Finally, the probe was added for 12 hours at 68°C with hybridization solution.

2.9.1.3 Protein expression and purification

Recombinant protein GST-Khd1 was overproduced in *Escherichia coli* BL21 (Rosetta 2) transformed with pGEX-4T-1-Khd1 (plasmid pPC13). The cells were harvested 3 hours after induction with 1mM IPTG at 30°C, resuspended in PBS-TritonX100 0,1%, 1M NaCl, 1mg/ml lysozyme and antiproteases cocktail (PMSF + pepstatine + leupeptin + aprotinine) for 30min on ice and sonicated. The lysate was cleared by centrifugation for 15min at 15000g, 4°C, to yield the supernatant with the overexpressed soluble protein. The GST fusion protein was purified by affinity chromatography with Glutathione-Sepharose 4B (GE Healthcare). The GST-fusion protein was eluted with 10mM reduced glutathione in PBS. The recombinant protein fractions were dialysed overnight in PBS and concentrated using a 10-kDa molecular weight cut-off filter unit (Centricon-Millipore). The Khd1-6xHis recombinant protein was produced as GST-Khd1-6xHis from the plasmid pPC18 in BL21 bacteria and purified as above. For the elution, the GST tag was cleaved with Factor Xa overnight at room temperature.

2.9.1.4 *In vitro* phosphorylation and purification of Yck1p

GST fusions proteins were purified as for GST-pulldowns and *in vitro* phosphorylation assays were carried out as described in Moriya et al. (2004). The GST-Eluted GST-Khd1 was phosphorylated in 50mM Tris pH 7.5, 10mM MgCl₂, 5mM DTT with rat Casein Kinase CKI (NEB) supplemented with 200uM ATP, 30 minutes at 30°C. The unphosphorylated GST-Khd1p was treated the same way, but without ATP.

2.9.1.5 P³² metabolic labelling

An overnight culture of yeast in selective media was diluted in 1L of low phosphate YPD and grown to an OD = 0.8. Cells were centrifuged, washed with low phosphate YPD, resuspended in 40mL of low phosphate YPD, supplemented with 333 μ Ci of P³² orthophosphate and incubated at 30°C for 1 hour. Cells were then washed with PBS 1X, resuspended in lysis buffer (PBS 1X, 0.1% triton X-100, 87.5 μ g/mL PMSF, 5 μ g/mL pepstatin, 5 μ g/mL aprotinin, 5 μ g/mL leupeptin, 50mM NaF, 20mM 2-glycerol-phosphate and 1mM Na₃VO₄) and lysed with glass beads. The lysate was cleared by centrifugation. Immunoprecipitation was carried out with polyclonal anti-GFP antibody (Rockland) overnight at 4°C. Protein A-Sepharose was added for 2 hours and beads were washed with PBS 1X, 0.1% Triton X-100. Purified proteins were eluted, resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose for autoradiography and western blotting.

Supplementary Table S3: Yeast strains used in this study

strain	genotype	source
K6278- <i>cla4</i>	<i>Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1, ash1::TRP1, cla4Δ</i>	Chartrand, 2002
K6278- <i>cla4, khd1</i>	K6278, <i>khd1::KAN</i>	this study
K699	<i>Mat a, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1</i>	Jansen, 1996
K699- <i>khd1</i>	K699, <i>khd1::KAN</i>	this study
K699- <i>yck1</i>	K699, <i>yck1::KAN</i>	this study
K699- <i>khd1, yck1</i>	K699, <i>khd1::loxP, yck1::KAN</i>	this study
K699- <i>she2</i>	K699, <i>she2::KAN</i>	this study
K699-She2-Myc	K699, <i>SHE2-myc13</i>	Takizawa, 2000
K5552	K699, <i>ASH1::ASH1-myc9</i>	Long, 1997
K5552- <i>khd1</i>	K5552, <i>khd1::KAN</i>	this study
S288C	<i>Mat a, his3Δ1, leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Open Biosystem
S288C-Khd1-TAP	S288C <i>KHD1-TAP::HIS3</i>	Open Biosystem
YMK328	<i>Mat a, ade2, his3, leu2, trp1, ura3,</i>	Mark P. Ashe

tif4631::LEU2, tif4632::ura3
p[TIF4632-URA3-CEN]

Supplementary Table S4: Plasmids used in this study

Plasmid	Features	Source
C3319	YEPlac181 with <i>ASH1</i> under endogenous promoter	Jansen, 1996
p415-VF2	pRS415 containing Venus Fragment 2 under <i>ADHI</i> promoter	Emily Manderson
p416-VF1	pRS416 containing Venus Fragment 1 under <i>ADHI</i> promoter	Emily Manderson
pGEM	Vectors for <i>in vitro</i> transcription	Promega
pGEX	Vectors for GST fusion proteins expression	Amersham
YCP33	Single copy yeast vector with URA3 selectable marker	Gietz, 1988
YEPlac181	Multicopy yeast vector with LEU2 selectable marker	Gietz, 1988
YIPlac128	Yeast integrative vector with LEU2 selectable marker	Gietz, 1988

pAS466	pGEX-2T containing eIF4G1 (amino acids 1 to 952)	Tarun, 1996
pBM4536	pRS426 expressing <i>YCK1</i> -7xHis-ProA (amino acids 1 to 536) under <i>ADHI</i> promoter	Moriya, 2004
pDD-01	YIP128 containing <i>ASH1</i> -myc (9x) under <i>GALI</i> promoter	Chartrand, 2002
pKHD1	pRS415 expressing <i>KHD1</i> under endogenous promoter	This study
pKHD1-MUT	pRS415 expressing <i>KHD1-MUT</i> under endogenous promoter	This study
pPC1	p415-VF2 containing <i>KHD1</i>	This study
pPC2	p416-VF1 containing <i>YCK1</i>	This study
pPC3	pRS415 expressing GFP under <i>ADHI</i> promoter	This study
pPC4	pRS415 expressing <i>KHD1-GFP</i> under <i>ADHI</i> promoter	This study
pPC5	pRS415 expressing <i>KHD1-GFP</i> under endogenous promoter	This study
pPC6	pRS415 expressing <i>KHD1-MUT-GFP</i> under endogenous promoter	This study
pPC8	pGEM-4z containing element E1	Olivier, 2005
pPC9	pGEM-4z containing IRE	Olivier, 2005
pPC10	pGEX-1 λ T containing eIF4G1 (amino acids 160 to 492)	Dominguez, 1999
pPC11	pGEX-1 λ T containing eIF4G1 (amino acids 542 to 883)	Dominguez, 1999
pPC12	pGEX-3X containing eIF4G1 (amino acids 441 to 952)	Dominguez, 1999
pPC13	pGEX-4T-1 containing <i>KHD1</i>	This study
pPC14	pGEX-5X-3 containing eIF4G1 (amino acids 441 to 656)	This study
pPC15	pGEX-5X-3 containing eIF4G1 (amino acids 490 to 656)	This study
pPC16	pGEX-5X-3 containing eIF4G1 (amino acids	This study

	850 to 952)	
pPC17	pGEX-5X-3 containing <i>KHDI</i> (amino acids 1 to 381)	This study
pPC18	pGEX-5X-3 containing <i>KHDI</i> -6xHis	This study
pPC19	pGEX-5X-3 containing <i>KHDI</i> -MUT	This study
pPC20	pGEX-5X-3 containing <i>KHDI</i> (amino acids 1 to 170)	This study
pPC21	pGEX-5X-3 containing <i>KHDI</i> (amino acids 171 to 381)	This study
pPC22	pGEX-5X-3 containing <i>KHDI</i> (amino acids 171 to 281)	This study
pPC23	pGEX-5X-3 containing <i>KHDI</i> (amino acids 282 to 381)	This study
pPC24	pGEX-5X-3 containing <i>KHDI</i> (amino acids 282 to 332)	This study
pPC25	pGEX-5X-3 containing <i>KHDI</i> (amino acids 333 to 381)	This study
pPC30	Single copy vector with TRP1 selectable marker expressing <i>TIF4631</i> under <i>TIF4632</i> promoter	Mark P. Ashe
pPC31	Single copy vector with TRP1 selectable marker expressing <i>TIF4631</i> (nt 1-2600) under <i>TIF4632</i> promoter	This study
pPC32	YCP33 containing <i>ASH1</i> (nt 1-621)- <i>LUC</i> under endogenous promoter	This study
pPC33	YCP33 containing <i>ASH1</i> (nt 1-900)- <i>LUC</i> under endogenous promoter	This study
pPC34	YCP33 containing <i>LUC</i> under <i>ASH1</i> endogenous promoter	This study
pXR193	YIP128 containing <i>ASH1</i> -myc (9x) under endogenous promoter	Chartrand, 2002

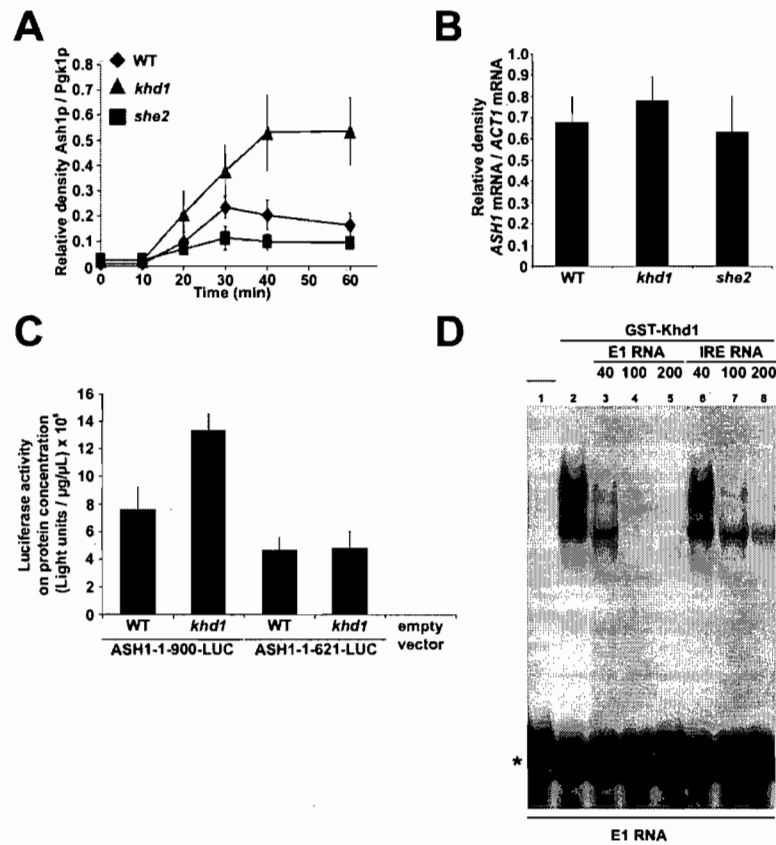
2.9.2 SUPPLEMENTARY FIGURES LEGENDS

Figure S24: Kinetics of the Ash1 protein synthesized from wild-type *ASH1* mRNA. (A) Kinetics of Ash1p synthesis after galactose induction of a *GAL1prom-ASH1-MYC* gene (pDD-01) in a wild-type yeast strain (\blacklozenge), in a *SHE2* knockout strain (*she2* \blacksquare), in a *KHD1* knockout strain (*khd1* \blacktriangle). (B) *ASH1* mRNA levels in the three yeast strains normalized to *ACT1* mRNA after one hour of induction. Error bars indicate mean \pm standard deviation from three independent experiments. (C) Absolute luciferase activity from the Ash1₁₋₉₀₀-Luc and Ash1₁₋₆₂₁-Luc fusion proteins in WT, *khd1* and control strains. Luciferase activity was normalized on total protein concentration. Since their absolute luciferase activity reflect both their expression level and the intrinsic activity of the luciferase fusion protein, they cannot be directly compared. However, the effect of a *KHD1* deletion on their relative activity can be compared. Hence, luciferase activity in the WT strain was normalized to 1 for each construct and displayed in two separate graphs (Figures 17D and 17E). Error bars indicate mean \pm standard deviation from at least four independent experiments. (D) Electrophoresis mobility shift assay for GST-Khd1 with localization element E1 competed by unlabelled E1 RNA and IRE RNA. Lane 1: P³² labelled E1 RNA. Lane 2: P³² labelled E1 RNA with 0.63 μ M GST-Khd1. Competitions of the Khd1p-E1 RNA complex with 40X, 100X, and 200X unlabelled E1 RNA (lanes 3 to 5) and with 40X, 100X, and 200X unlabelled IRE RNA (lanes 6 to 8).

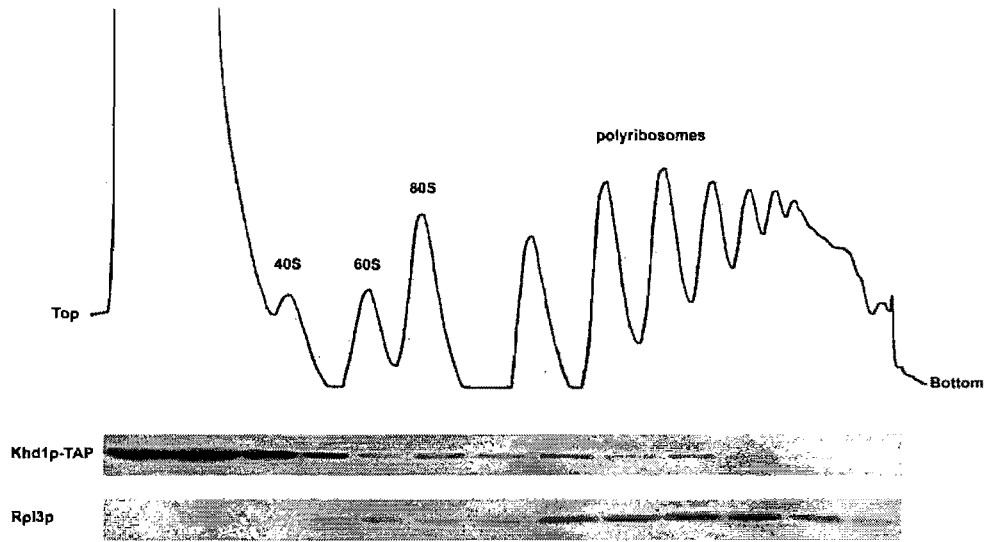
Figure S25: Co-sedimentation of Khd1p with ribosomes. Sucrose gradient and distribution of Khd1p-TAP and Rpl3p, a protein of the large subunit of the ribosome, in the various fractions of the gradient.

Figure S26: CK1 interacts with and phosphorylates GST-Khd1p *in vitro*. (A) GST pulldown assay of yeast purified Yck1p-His₇-proA with GST-Khd1p purified from bacteria. (B) *In vitro* phosphorylation of GST-Khd1p by the rat purified CK1. Left panel, Coomassie blue staining of the GST and GST-Khd1 proteins. Right panel, autoradiography of P³²-phosphorylated GST-Khd1p.

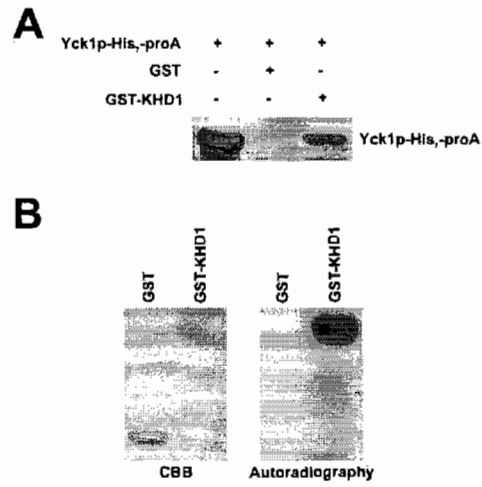
Figure S27: Characterization of the Khd1-MUT protein. (A) Detection of levels of Khd1-GFP and Khd1-MUT-GFP expressed in a *khd1* yeast strain from the plasmids pPC5 and pPC6, respectively, by Western blot. (B) GST pulldown assays of yeast extract containing Khd1-MUT-GFP with recombinant GST-eIF4G1. Lane 4: extract was treated with RNase A prior the pulldown with GST-eIF4G1. (C) *In vitro* phosphorylation of GST, GST-Khd1p and GST-Khd1-MUT proteins with rat CK1. Left panel, Coomassie blue stained gel of the GST tagged proteins. Right panel, autoradiography of the P³²-phosphorylated GST-Khd1 proteins.



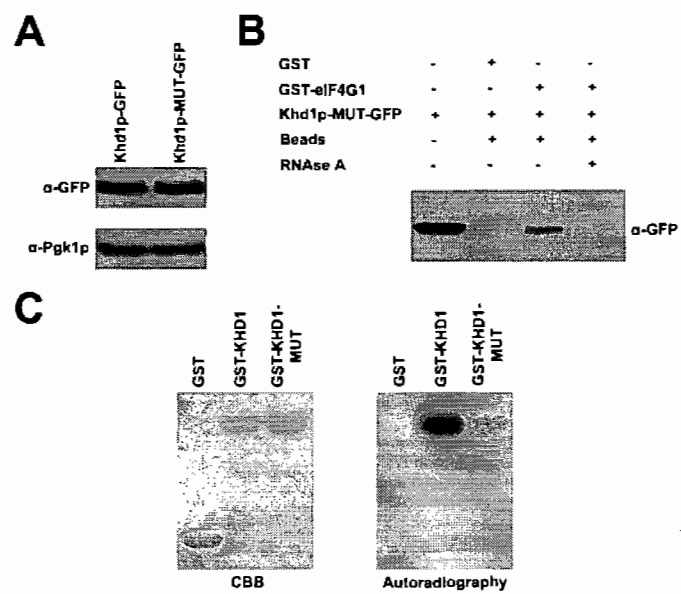
Supplementary Figure 24: Kinetics of the Ash1 protein synthesized from wild-type *ASH1* mRNA



Supplementary Figure 25: Co-sedimentation of Khd1p with ribosomes



Supplementary Figure 26: CK1 interacts with and phosphorylates GST-Khd1p *in vitro*



Supplementary Figure 27: Characterization of the Khd1-MUT protein

**CHAPITRE 3: A PEST-like motif controls the degradation of
Khd1p and the decay of the *ASH1* mRNA**

NOTE**Contribution des auteurs :**

Nicolas Paquin : Réalisation des expériences, planification, écriture.

Pascal Chartrand : Écriture, planification et supervision générale.

Article en préparation

© 2008

**A PEST-like motif controls the
degradation of Khd1p and the decay of the
ASH1 mRNA**

Nicolas Paquin and Pascal Chartrand*

Département de Biochimie, Université de Montréal
Montréal, Qc H3C 3J7 Canada



Running title: Targeted degradation of Khd1p controls the stability of the *ASH1* mRNA

3.1 ABSTRACT

The trafficking of the *ASH1* mRNA to the bud tip in *S. cerevisiae* relies on a ribonucleoprotein complex and leads to the exclusive segregation of Ash1p to the daughter cell nucleus, where it prevents mating type switching. Khd1p, a three KH domain protein, regulates the translation of the *ASH1* mRNA during its localization by reducing ribosome loads on this transcript. Upon arriving at the bud tip, Khd1p is phosphorylated by the membrane anchored casein kinase Yck1p, which triggers the release of the *ASH1* mRNA and local expression of Ash1p. We now report that phosphorylation of Khd1p by Yck1p within a PEST-like motif also induces the degradation of Khd1p through the ubiquitin proteasome pathway. Furthermore, mutation of the lysine residues present within the PEST-like sequence impairs the degradation of Khd1p, suggesting direct ubiquitination of Khd1p after being phosphorylated by Yck1p. In addition, our results show that the degradation of Khd1p does not affect the RNA-binding affinity of Khd1p for the localization element E1 nor the level of expression of an Ash1-luciferase fusion, but affects the stability of the *ASH1* mRNA. This study sheds light on the central role of Khd1p in linking translation regulation and mRNA stability of the *ASH1* mRNA.

3.2 INTRODUCTION

Direct mRNA localization is an efficient way for cells to limit the site of expression of specific proteins to or near their site of action. This mechanism is involved in organism development, asymmetric cell division, synaptic plasticity and cell motility [1]. By tightly coupling mRNA trafficking to translation regulation, cells can control the spatio-temporal expression of specific proteins which allows for quicker response to intracellular and extracellular signals [2, 3]. An example is the localization of the β -actin mRNA to the leading edge of fibroblasts and dendrites in neurons [4, 5]. The protein ZBP1 mediates the localization and the translational repression of the β -actin mRNA by recruiting this transcript at its transcription site [2, 6, 7]. Upon reaching the leading edge of the cell, ZBP1 is phosphorylated by the tyrosine kinase Src, which leads to the release of the translational repression on the β -actin mRNA and to the local synthesis of β -actin protein [2]. This locally produced pool of β -actin allows to rapidly modify the actin cytoskeleton under the plasma membrane, which favours fibroblasts movements [2].

We have been using the budding yeast as a model organism to study the mechanisms of mRNA trafficking and translational regulation of the *ASH1* mRNA [8]. This transcript is actively localized to the bud tip during late anaphase, which leads to the exclusive segregation of the Ash1 protein to the daughter cell nucleus [9, 10]. Ash1p is a transcriptional repressor of *HO*, a gene coding for an endonuclease responsible for mating type switching in yeast [11, 12]. Thus, the asymmetric distribution of the cell fate determinant Ash1p prevents mating type switching in the daughter cell after each cell division. The localization of the *ASH1* mRNA depends on three proteins: She1p/Myo4p, a type V myosin that carries the *ASH1* mRNA along the actin cytoskeleton, She2p, a RNA-binding protein which directly binds to the four localization elements of the *ASH1* mRNA and She3p which acts as a bridge between Myo4p and She2p [9, 13-16]. These proteins, which are essential for the direct trafficking of all identified localized mRNAs in the budding yeast, form a complex known as the locosome [8].

Recently, we identified Khd1p as a translational repressor of *ASH1* mRNA [3]. Indeed, by binding the localization element E1, present within the coding sequence of the *ASH1* mRNA, Khd1p reduces ribosome initiation on this transcript, which leads to decreased expression levels of Ash1p [3]. Upon reaching the bud tip, Khd1p is

phosphorylated in its C-terminal domain by the membrane-anchored type I casein kinase Yck1p, which triggers the release of the *ASH1* mRNA and allows local expression of Ash1p [3]. However, the fate of Khd1p after this translational repression release is still unclear. Two of the possibilities are that Khd1p could be recycled for a second round of localization or that Khd1p could be degraded after being phosphorylated at the bud tip.

We now report that Khd1p is degraded in a phosphorylation-dependent manner and that mutations of lysine residues within a PEST-like motif in the C-terminal domain of Khd1p impairs its degradation. Moreover, while mutations that stabilize Khd1p have no effect on its RNA-binding affinity nor do they affect the level of expression of an Ash1-luciferase reporter, we show that impaired degradation of Khd1p results in a stabilization of the *ASH1* mRNA. Therefore, we propose a model where upon releasing the *ASH1* mRNA, Khd1p is targeted for degradation through the ubiquitin proteasome pathway in order to allow the degradation of the *ASH1* mRNA after its local translation.

3.3 RESULTS

3.3.1 Khd1p is degraded in a phosphorylation-dependent manner

Since several substrates of the type I casein kinase Yck1p are ubiquitinated in a phosphorylation-dependent manner and targeted for degradation [17-19], we wanted to determine the fate of Khd1p after its phosphorylation by Yck1p. For example, the uracil permease Fur4p is phosphorylated and ubiquitinated within a PEST-like sequence, an instability motif involved in protein degradation [20], which leads to its internalization and degradation in the vacuole [17]. Ste3p, the yeast "a" pheromone receptor, undergoes a similar fate through another PEST-like domain [19, 21]. The phosphorylation site of Khd1p within its C-terminal domain is very similar to the PEST-like motifs in Fur4p and Ste3p (Figure 28A) and contains high levels of P-E-S-T residues (Figure 28B). Thus, it suggests that the C-terminal domain of Khd1p may be a PEST-like motif. In order to assess the fate of Khd1p after its phosphorylation by Yck1p, we measured the half-life of Khd1p in a wild type and in a *yck1* background. We proceeded by using constructions of Khd1p fused in frame with GFP under the *KHD1* endogenous promoter on a single copy vector, expressed in a *khd1* strain, and verified that these constructions complement the deletion of endogenous *KHD1* (data not shown). To measure the half-life of the Khd1p-GFP protein, cells were taken every 30 minutes after the addition of 100µg/mL of

cycloheximide, and we performed western blots against the GFP moiety of the fusion protein (Figure 29A). While the normal half-life of Khd1p-GFP is about 80 minutes in a WT strain, deletion of *YCK1* strongly impaired the degradation of Khd1p-GFP, with not significant degradation observed after 150 minutes (Figure 29B). In addition, we tested a mutated form of Khd1p (termed Khd1-MUT) in which the serines and threonines of its C-terminal domain were replaced by alanines. We have previously reported that these mutations inhibit the phosphorylation of Khd1p by Yck1p *in vivo* and *in vitro* [3]. Mutation of the phosphorylation sites in Khd1p resulted in a significant stabilization of Khd1p-GFP with relative protein levels still around 80% after 150 minutes (Figure 29B). These mutations did not completely recapitulate the *YCK1* deletion phenotype, suggesting that other Yck1p phosphorylation sites may still be present in the Khd1p-MUT protein. From these results, we conclude that phosphorylation within the PEST-like motif in the C-terminal domain of Khd1p promotes the degradation of this protein.

3.3.2 Proteasomal activity and lysine residues in the PEST-like domain of Khd1p are required for its degradation

Other substrates of Yck1p phosphorylation are degraded via ubiquitination in a phosphorylation dependent manner [17, 18]. We first wanted to verify whether the degradation of Khd1p is dependent on the activity of the proteasome. Hence, we used a *cim5-1* strain containing a thermosensitive allele of *CIM5*, which codes for a regulatory subunit of the proteasome [22]. Accumulation of ubiquitinated proteins at restrictive temperature has been verified in this strain [23]. While growing the strain at room temperature did not affect the degradation of Khd1p-GFP, shifting it to 37°C completely impaired the degradation of Khd1p-GFP, suggesting that Khd1p-GFP is degraded via the ubiquitin proteasome pathway (Figure 30A). The lysines adjacent to the phosphorylated residues in Fur4p are ubiquitinated, which leads to the internalisation of this protein and to its degradation in the vacuole [17]. To test whether Yck1p has a similar effect on Khd1p, we mutated two lysine residues next to the phosphorylation site of Khd1p, within the PEST-like sequence, to alanines (Figure 28A), and verified the effect of these mutations on the half-life of Khd1p-GFP. These lysines have an environment rich in glutamic acid similar to the ones involved in the degradation of Ste3p and Fur4p (Figure 28A). Hence, we tested the mutation of each lysine individually and in combination by western blot after the addition of cycloheximide (Figure 30B). We found that the mutation K367A of Khd1p

strongly affected the degradation of Khd1p-GFP, while the mutation K377A completely inhibited the degradation of Khd1p-GFP with no observable decrease in relative protein levels within 150 minutes (Figure 30C). Moreover, combinatory mutations, yielding Khd1-K366/367A, completely blocked the degradation of Khd1p-GFP, which strongly suggests that these lysines residues are essential for the degradation of Khd1p (Figure 30D). Taken together with the requirement of proteasomal activity for degradation of Khd1p, these results strongly suggest that Khd1p is ubiquitinated upon phosphorylation by Yck1p and then undergoes proteolysis.

3.3.3 Stabilization of Khd1p impairs the degradation of the *ASH1* mRNA

To determine if the stabilization of Khd1p affects its role in the regulation of *ASH1* mRNA translation, we tested the effect of mutations K366/367A on the RNA-binding affinity of Khd1p using a yeast three-hybrid assay. In this system, Khd1p was expressed in fusion with the Gal4p transcription activation domain while the RNA elements of interest were expressed in fusion with tandem MS2 stem-loops. These MS2-stem loops are specifically recognized by the MS2-coat protein (MCP) which is itself expressed in fusion with LexA. If the protein and RNA element of interest interact, the association of LexA with the Gal4p activation domain triggers the expression of the reporter gene *HIS3*, allowing cell growth on a media lacking histidine [24]. In this assay, Khd1p and Khd1p-K366/367A displayed the same affinity for the localization element E1 (Figure 31A), which we showed previously to be a RNA target of Khd1p [3]. Khd1p did not bind the D1 domain of the localization element E2B, which was used as negative control. Hence, impairment of the degradation of Khd1p did not affect its RNA-binding activity and specificity.

Next, we wanted to verify the effect of the stabilization of Khd1p on the expression levels of Ash1p. One possibility is that if Khd1p does not undergo targeted degradation, it can be dephosphorylated and further inhibit the local synthesis of Ash1p by binding this transcript at the bud tip. We previously showed that deletion of *YCK1* decreases the level of expression of an Ash1-luciferase fusion containing the localization element E1 and that this effect depends on the phosphorylation of Khd1p. We used the same method described in our previous work and expressed WT Khd1p and Khd1p-K366/367A from their endogenous promoter on a single copy vector in a *khd1* strain [3]. While the expression of

WT Khd1p rescued the deletion of endogenous *KHD1*, deletion of *YCK1* decreased the level of the Ash1-luciferase reporter. Interestingly, the mutant K366/367A did not show significant differences in the expression level of the reporter gene in a WT and a *yck1* background, indicating that impaired degradation of Khd1p does not regulate the level of expression of Ash1p (Figure 31B).

Another possibility is that Khd1p may stabilize the *ASH1* mRNA during its localization in order to prevent the degradation of this transcript. In order to test this possibility, we determined the half-life of the *ASH1* mRNA in strains expressing the WT or stabilized Khd1 protein. We used a single copy plasmid expressing *ASH1* under the control of the inducible *GALI* promoter in the presence of WT Khd1p and Khd1p-K366/367A. We evaluated the stability of the *ASH1* mRNA by extracting the total RNA from cells each minute after the addition of glucose to shut off the expression of *ASH1* and submitted them to Northern blots. We measured a half-life for the *ASH1* mRNA of about 1 minute, which makes this mRNA one of the less stable in yeast [25, 26]. Interestingly, we repeatedly observed an increase in *ASH1* mRNA half-life to over 2 minutes in the presence of Khd1p-K366/367A (Figure 31C). This result is supported by the observation that overexpression of Khd1p from a *GALI* promoter results in increased levels of *ASH1* mRNA and decreased levels of Ash1p [27]. These results suggest that the stabilization of Khd1p increases the half-life of the *ASH1* mRNA and that Khd1p may participate in the regulation of *ASH1* mRNA degradation.

3.3.4 Khd1p and the *ASH1* mRNA localize to cytoplasmic processing bodies upon cellular stress

If Khd1p is involved in the regulation of *ASH1* mRNA degradation, it should be associated with factors involved in mRNA decay. Large scale protein-protein interaction assays have identified several components of P-bodies as Khd1p associated proteins [28, 29] (and personal communication from S.W. Michnick). P-bodies are cytoplasmic granules that form under cellular stress where mRNAs are kept inactive or degraded, and contain several proteins involved in mRNA decay like Dhh1p; a RNA helicase, Dcp1p-Dcp2p; two decapping enzymes, and Xrn1p, a 5'-3' exonuclease [30, 31]. In order to verify whether Khd1p localizes to P-bodies upon cellular stress, we assessed the distribution of mCherry-tagged Khd1p before, during, and after glucose deprivation. While both Khd1-mCherry

and Dhh1-GFP show a cytoplasmic distribution, a fraction of Khd1-mCherry and the totality of Dhh1-GFP localize to P-bodies when glucose is removed from the growth media (Figure 32A). The foci disappear upon addition of glucose, confirming that P-bodies are dynamic granules [32]. Similar results were obtained using a GFP tagged version of Dcp1p, another marker of P-bodies (Figure 32B). With the observation that a stabilized Khd1p reduces the degradation of the *ASH1* mRNA, this raises the possibility that Khd1p may have a similar effect on this transcript as ZBP1 on the β -actin mRNA. It has been shown that ZBP1 stabilizes the β -actin mRNA during cellular stress, probably as a mean of delaying its degradation until the end of the stress source [33]. We next inquired about the distribution of the *ASH1* mRNA during carbon source deprivation using a galactose-inducible *ASH1* mRNA containing 6xMS2 binding sites in yeasts expressing the MS2 coat protein fused to the RedStar fluorescent protein [34]. We observed that while the *ASH1* mRNA was normally localized at the bud tip, it was relocalized to P-bodies upon carbon source deprivation (Figure 32C). When glucose was added to the growth media after 10 minutes of deprivation, the *ASH1* mRNA was relocalized to the bud tip. This shows that the *ASH1* mRNA also accumulates in P bodies after carbon deprivation and can resume its localization after stress.

3.4 DISCUSSION

3.4.1 Phosphorylation of Khd1p by Yck1p triggers its degradation

Several Yck1p phosphorylation substrates are subsequently ubiquitinated and degraded through a PEST-like motif. The uracil permease Fur4p is a membrane-bound protein involved in uracil uptake which is phosphorylated by Yck1p [17]. This leads to its ubiquitination near the phosphorylation site, endocytosis and targeting to degradation by the vacuole. This mechanism allows the cell to tightly control the amount of uracil it uptakes. Yck1p and Yck2p also control glucose sensing in yeast through the phosphorylation of Mth1p and Std1p, two proteins associated with the cytoplasmic domain of the glucose sensors Rgt2p/Snf3p [18]. Upon phosphorylation by Yck1/2p, Mth1p and Std1p are ubiquitinated and degraded via the ubiquitin proteasome pathway which leads to the derepression of the expression of glucose transporters [18]. Hence, type I casein kinase phosphorylation are key proteins in the integration of extracellular and intracellular signals. Recently, we reported that phosphorylation of Khd1p by Yck1p triggers the release of the *ASH1* mRNA and the local expression of Ash1p at the bud tip. We now report that Yck1p

also triggers the degradation of Khd1p through the ubiquitin proteasome pathway, confirming the role of Yck1p in targeting specific proteins to degradation. Indeed, deletion of *YCK1* or mutation of its phosphorylation site in Khd1p impairs the degradation of Khd1p.

By using a *cim5-1* strain, we have shown that degradation of Khd1p is dependent on the activity of the proteasome. Taken together with the stabilization of Khd1p-K366/367A, these results strongly suggest that Khd1p is a *bona fide* target of the ubiquitin proteasome pathway. These lysines, present within the PEST-like motif in the C-terminal domain of Khd1p, are probably ubiquitinated following the phosphorylation of Khd1p and then targeted to the proteasome. Generally, cytoplasmic ubiquitin-conjugated proteins are degraded via the proteasome while membrane-bound proteins are sorted to the vacuole for degradation after being ubiquitinated [35]. While we have not been able to show direct ubiquitination of Khd1p, the fact that the inhibition of the proteasome and mutation of lysine residues in Khd1p impair its degradation provide strong evidence that Khd1p is ubiquitinated and degraded via the proteasome.

3.4.2 Khd1p links the translational regulation of the *ASH1* mRNA with the stability of this transcript

Our results raise the question of why Khd1p needs to be targeted for degradation. The observation that the stabilization of Khd1p by mutating the lysines in its PEST-like domain does not affect the expression of an Ash1-luciferase fusion suggests that Khd1p degradation does not regulate its function as translational regulator. However, if the impairment of the degradation of Khd1p has no significant effect on its RNA-binding activity nor on its translational regulation of the *ASH1* mRNA, why specifically target it to degradation? Results from Irie and colleagues show that the overexpression of Khd1p from the inducible *GALI* promoter increases the level of *ASH1* mRNA while impairing its translation, suggesting that Khd1p could modulate the stability of this transcript [27]. Indeed, we report that the half-life of the *ASH1* mRNA doubled when Khd1p is stabilized, indicating that the specific degradation of Khd1p is important for the normal degradation of the *ASH1* mRNA. While the increase in *ASH1* mRNA half-life from about 1 minute to over 2 minutes may not seem very high, it may be sufficient for this transcript since it takes 2 minutes to transport the *ASH1* mRNA from the mother cell to the bud tip [36]. Therefore,

Khd1p may stabilize the *ASH1* mRNA long enough during the transport of this transcript so that it gets localized before its degradation. Thus, one can propose a model where the binding of Khd1p to the *ASH1* mRNA prevents simultaneously the translation and the degradation of this transcript during its transport to the bud tip. Upon reaching its destination, Khd1p is in turn phosphorylated by the membrane anchored type I casein kinase Yck1p, which releases the translational repression on the *ASH1* mRNA. However, phosphorylation of Khd1p may be insufficient to completely release this protein from the *ASH1* mRNA, as we showed that phosphorylated Khd1p still binds the element E1 RNA, but as a monomer [3]. Ubiquitination and degradation of Khd1p would remove this protein and activate the decay of the *ASH1* mRNA. Therefore, this coordination between Khd1p phosphorylation and proteolysis may be required to make sure that *ASH1* mRNA translation precede its degradation.

Large scale affinity precipitation assays to identify protein complexes have isolated several proteins involved in RNA degradation as Khd1p associated proteins. These proteins include Dbp2p, an RNA helicase involved in nonsense-mediated mRNA decay, Xrn1p, a 5'-3' exonuclease involved in mRNA degradation and that is a component of the cytoplasmic processing bodies (P-bodies) [28-30, 37]. A more recent screen has also identified Dhh1p, Lsm3p, Lsm4p and Lsm6p in association with Khd1p, suggesting that Khd1p plays a role within P-bodies (Personal communication from S.W. Michnick). Whether these associations are involved in the modulation of the stability of the *ASH1* mRNA still has to be explored. The fact that Khd1p and the *ASH1* mRNA localize to P-bodies under cellular stress suggest some similarity with ZBP1 and the β -actin mRNA. Indeed, ZBP1 has been shown to stabilize the β -actin mRNA during cellular stress [33]. This implies that while both ZBP1 and Khd1p repress the translation of the their target mRNA, they also protect it from degradation to insure its proper sorting.

3.5 MATERIALS AND METHODS

3.5.1 Yeast strains and growth media

Yeast strains used in this study are described in Table 5. Transformation of yeast cells was performed according to the method described by Gietz and Schiestl [38].

3.5.2 Plasmids construction

Plasmids used in this study are described in Table 6. Plasmids pPC5, pPC6 and pKHD1 were described in [3]. Plasmid pPC35, pPC36, and pPC37 were cloned by amplifying the mutant *KHD1* fragments by PCR and cloning them as a PstI-BspEI fragment in pPC5. pKHD1-K366/367A was obtained by cloning a PCR PstI-XhoI fragment in pKHD1. pPC38 and pPC39 were cloned by replacing the GFP in pPC5 and pPC37 with the Gal4p activation domain has a BspEI-XhoI fragment. pPC40 was obtained by replacing the GFP fragment of pPC5 with a BspEI-XhoI mCherry PCR product.

3.5.3 Protein half-life time course and western blots

Overnight cells cultures were diluted to $OD_{600} = 0.1$ and grown to $OD_{600} = 0.8$. Cycloheximide was added to 100 μ g/mL and 10mL of culture was washed with PBS 1X, 6mM NaN₃, centrifuged and the pellet was frozen at -80°C every 30 minutes. Cell pellets were thawed in 100 μ L PBS 1X, 87.5 μ g/mL PMSF, 5 μ g/mL pepstatin, 5 μ g/mL aprotinin, 5 μ g/mL leupeptin and broken with glass beads on ice. Extracts were cleared and submitted to western blotting using a polyclonal goat anti-GFP (1:1000) from Rockland and a mouse anti-goat-HRP secondary antibody (1:1000) from Jackson ImmunoResearch. A mouse anti-Rpl3p (1:2000) (kind gift from Jon Warner) and was used as an internal control with a Goat anti-mouse-HRP (1:1000) from Jackson ImmunoResearch.

3.5.4 Yeast three-hybrid assay

Strain YBZ1 was transformed with plasmids expressing WT or mutant *KHD1* and fusion RNA of the localization element E1 or E2B-D1. Cells grown on plates lacking leucine and uracil allow plasmid selection while cells grown on plates lacking leucine, uracil and histidine supplemented with 0.1mM 3-amino-1,2,4-triazole only grow if the protein and RNA of interest interact.

3.5.5 *ASH1* mRNA half-life and northern blots

Cells transformed with C3348- Δ MYC were grown overnight in media containing 3% galactose and were diluted to $OD_{600} = 0.1$ in 200mL and grown to $OD_{600} = 0.8$. Cells were washed in media containing 3% galactose and were resuspended in 5mL of media containing 4% glucose. 1mL of cells were taken every minute, centrifuged and cell pellet was snap frozen in dry ice. Total RNA was extracted according to [39] and northern blots

were performed as in [3] using an *ASH1* probe labeled with dCTP-P³² using Ready-To-Go DNA Labelling Beads –dCTP (GE Healthcare).

3.5.6 Luciferase assays

Luciferase assays were performed as described in [3] using the first 900 nucleotides of the coding sequence of the *ASH1* mRNA fused in frame with firefly luciferase. Overnight cultures were diluted to OD₆₀₀ = 0.1 and grown to OD₆₀₀ = 0.8 in 5mL cultures. Cells were resuspended in 150µL PBS 1X, 6mM NaN₃, aprotinin, leupeptin, pepstatin, and PMSF and broken using glass beads. Extracts were cleared and 20µL of extract was used with 80µL of LAR (Promega) for the luciferase assay. Resulting luminescence was normalized on total protein concentration of the extract determined by dosage with Bradford reagent. All luciferase assays are the average of at least three independent experiments.

3.6 ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Jon Warner, Thomas Langer, and Gerardo Ferbeyre for reagents and strains. We thank Ralph-Peter Jansen for kindly providing plasmids pRJ741 and pRJ1063. We are grateful to Anne-Laure Finoux for helpful suggestions and technical assistance. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). P.C is supported by a fellowship from the Fond de Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

3.7 REFERENCES

1. St Johnston, D., *Moving messages: the intracellular localization of mRNAs*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(5): p. 363-375.
2. Huttelmaier, S., et al., *Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1*. Nature, 2005. **438**(7067): p. 512-515.
3. Paquin, N., et al., *Local Activation of Yeast ASH1 mRNA Translation through Phosphorylation of Khd1p by the Casein Kinase Yck1p*. Molecular Cell, 2007. **26**(6): p. 795-809.
4. Lawrence, J.B. and R.H. Singer, *Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal proteins*. Cell, 1986. **45**(3): p. 407-415.
5. Eom, T., et al., *Localization of a beta-Actin Messenger Ribonucleoprotein Complex with Zipcode-Binding Protein Modulates the Density of Dendritic Filopodia and Filopodial Synapses*. J. Neurosci., 2003. **23**(32): p. 10433-10444.

6. Oleynikov, Y. and R.H. Singer, *Real-Time Visualization of ZBP1 Association with [beta]-Actin mRNA during Transcription and Localization*. *Current Biology*, 2003. **13**(3): p. 199-207.
7. Pan, F., et al., *ZBP2 Facilitates Binding of ZBP1 to beta-Actin mRNA during Transcription*. *Mol. Cell. Biol.*, 2007. **27**(23): p. 8340-8351.
8. Chartrand, P., R.H. Singer, and R.M. Long, *RNP Localization and Transport in Yeast*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2001. **17**(1): p. 297-310.
9. Long, R.M., et al., *Mating Type Switching in Yeast Controlled by Asymmetric Localization of ASH1 mRNA*. *Science*, 1997. **277**(5324): p. 383-387.
10. Takizawa, P.A., et al., *Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast*. *Nature*, 1997. **389**(6646): p. 90-93.
11. Bobola, N., et al., *Asymmetric Accumulation of Ash1p in Postanaphase Nuclei Depends on a Myosin and Restricts Yeast Mating-Type Switching to Mother Cells*. *Cell*, 1996. **84**(5): p. 699-709.
12. Sil, A. and I. Herskowitz, *Identification of asymmetrically localized determinant, Ash1p, required for lineage-specific transcription of the yeast HO gene*. *Cell*, 1996. **84**(5): p. 711-22.
13. Bohl, F., et al., *She2p, a novel RNA-binding protein tethers ASH1 mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p*. *Embo J*, 2000. **19**(20): p. 5514-24.
14. Jansen, R.-P., et al., *Mother Cell-Specific HO Expression in Budding Yeast Depends on the Unconventional Myosin Myo4p and Other Cytoplasmic Proteins*. *Cell*, 1996. **84**(5): p. 687-697.
15. Long, R.M., et al., *She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to ASH1 mRNA*. *Embo J*, 2000. **19**(23): p. 6592-601.
16. Takizawa, P.A. and R.D. Vale, *The myosin motor, Myo4p, binds Ash1 mRNA via the adapter protein, She3p*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000. **97**(10): p. 5273-5278.
17. Marchal, C., R. Haguenaer-Tsapis, and D. Urban-Grimal, *Casein Kinase I-dependent Phosphorylation within a PEST Sequence and Ubiquitination at Nearby Lysines Signal Endocytosis of Yeast Uracil Permease*. *J. Biol. Chem.*, 2000. **275**(31): p. 23608-23614.

18. Moriya, H. and M. Johnston, *Glucose sensing and signaling in Saccharomyces cerevisiae through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004. **101**(6): p. 1572-1577.
19. Feng, Y. and N.G. Davis, *Akr1p and the Type I Casein Kinases Act prior to the Ubiquitination Step of Yeast Endocytosis: Akr1p Is Required for Kinase Localization to the Plasma Membrane*. Mol. Cell. Biol., 2000. **20**(14): p. 5350-5359.
20. Rogers, S., R. Wells, and M. Rechsteiner, *Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis*. Science, 1986. **234**(4774): p. 364-8.
21. Roth, A.F. and N.G. Davis, *Ubiquitination of the PEST-like Endocytosis Signal of the Yeast α -Factor Receptor*. J. Biol. Chem., 2000. **275**(11): p. 8143-8153.
22. Glickman, M.H., et al., *The Regulatory Particle of the Saccharomyces cerevisiae Proteasome*. Mol. Cell. Biol., 1998. **18**(6): p. 3149-3162.
23. Ghislain, M., A. Udvardy, and C. Mann, *S. cerevisiae 26S protease mutants arrest cell division in G2/metaphase*. Nature, 1993. **366**(6453): p. 358-362.
24. Hook, B., et al., *RNA-protein interactions in the yeast three-hybrid system: Affinity, sensitivity, and enhanced library screening*. RNA, 2005. **11**(2): p. 227-233.
25. Wang, Y., et al., *Precision and functional specificity in mRNA decay*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(9): p. 5860-5865.
26. Herrick, D., R. Parker, and A. Jacobson, *Identification and comparison of stable and unstable mRNAs in Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol., 1990. **10**(5): p. 2269-2284.
27. Irie, K., et al., *The Khdl protein, which has three KH RNA-binding motifs, is required for proper localization of ASH1 mRNA in yeast*. Embo J, 2002. **21**(5): p. 1158-67.
28. Gavin, A.C., et al., *Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery*. Nature, 2006. **440**(7084): p. 631-6.
29. Gavin, A.C., et al., *Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes*. Nature, 2002. **415**(6868): p. 141-7.
30. Sheth, U. and R. Parker, *Decapping and Decay of Messenger RNA Occur in Cytoplasmic Processing Bodies*. Science, 2003. **300**(5620): p. 805-808.
31. Teixeira, D., et al., *Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs*. RNA, 2005. **11**(4): p. 371-382.

32. Brengues, M., D. Teixeira, and R. Parker, *Movement of Eukaryotic mRNAs Between Polysomes and Cytoplasmic Processing Bodies*. *Science*, 2005. **310**(5747): p. 486-489.
33. Stohr, N., et al., *ZBP1 regulates mRNA stability during cellular stress*. *J. Cell Biol.*, 2006. **175**(4): p. 527-534.
34. Schmid, M., et al., *Coordination of Endoplasmic Reticulum and mRNA Localization to the Yeast Bud*. *Current Biology*, 2006. **16**(15): p. 1538-1543.
35. Horak, J., *The role of ubiquitin in down-regulation and intracellular sorting of membrane proteins: insights from yeast*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2003. **1614**(2): p. 139-155.
36. Bertrand, E., et al., *Localization of ASH1 mRNA Particles in Living Yeast*. *Molecular Cell*, 1998. **2**(4): p. 437-445.
37. Bond, A.T., et al., *Absence of Dbp2p Alters Both Nonsense-Mediated mRNA Decay and rRNA Processing*. *Mol. Cell. Biol.*, 2001. **21**(21): p. 7366-7379.
38. Schiestl, R.H. and R.D. Gietz, *High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier*. *Curr Genet*, 1989. **16**(5-6): p. 339-46.
39. Schmitt, M.E., T.A. Brown, and B.L. Trumpower, *A rapid and simple method for preparation of RNA from Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res.*, 1990. **18**(10): p. 3091-3092.
40. Chi, A., et al., *Analysis of phosphorylation sites on proteins from Saccharomyces cerevisiae by electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007. **104**(7): p. 2193-2198.
41. Li, X., et al., *Large-Scale Phosphorylation Analysis of alpha-Factor-Arrested Saccharomyces cerevisiae*. *J. Proteome Res.*, 2007. **6**(3): p. 1190-1197.
42. Olivier, C., et al., *Identification of a Conserved RNA Motif Essential for She2p Recognition and mRNA Localization to the Yeast Bud*. *Mol. Cell. Biol.*, 2005. **25**(11): p. 4752-4766.

3.8 FIGURE LEGENDS

Figure 28: The C-terminal domain of Khd1p is a PEST-like sequence. A) Schematic representation of the PEST-like motifs of Ste3p, Fur4p, and Khd1p. The bold serine and threonine are the residues phosphorylated by type I casein kinases and bold lysines are

involved in the degradation of these proteins. Numbers indicate the amino acid from the first residue of the proteins. The asterisks mark residues in Khd1p that have been shown to be phosphorylated by mass spectrometry [40, 41]. B) Relative amount of P-E-S-T residues in the full Ste3p, Fur4p, and Khd1p and in their respective PEST-like motif.

Figure 29: Phosphorylation of Khd1p triggers its degradation. A) Western blots of the time course of the degradation of Khd1-GFP, Khd1-MUT-GFP and Khd1-GFP in a *yck1* strain with Rpl3p as an internal control after the addition of 100 μ g/mL cycloheximide. B) Graph representation of the degradation of Khd1p-GFP normalized to the amount of Khd1p-GFP present at time = 0 min. Error bars indicate mean \pm standard deviation from three independent experiments.

Figure 30: Proteasome inhibition and mutation of lysines in the C-terminal domain of Khd1p impairs its degradation. A) Western blots of the time course of the degradation of Khd1p in a *cim5-1* strain at permissive and restrictive temperatures with Rpl3p as an internal control after the addition of 100 μ g/mL cycloheximide. B) Western blots of the time course of the degradation of Khd1-GFP, Khd1-K366A-GFP, Khd1-K366/367A-GFP and Khd1-K367A-GFP with Rpl3p as an internal control after the addition of 100 μ g/mL cycloheximide. C) Graph representation of the degradation of Khd1p-GFP, Khd1-K366A-GFP and Khd1-K367A-GFP normalized to the amount of Khd1p-GFP present at time = 0 min. D) Graph representation of the degradation of Khd1p-GFP and Khd1-K366/367A-GFP normalized to the amount of Khd1p-GFP present at time = 0 min. Error bars indicate mean \pm standard deviation from three independent experiments.

Figure 31: The degradation of Khd1p controls the stability of the *ASH1* mRNA. A) Three-hybrid assay showing that Khd1 and Khd1-K366/367A bind the localization element E1 with similar affinity. Yeast strain YBZ1 expressing the MS2 coat protein fused to LexA was transformed with a vector expressing Khd1p or Khd1-K366/367A fused to the GAL4 activation domain, and a vector expressing a RNA fusion with tandem MS2 binding sites. An interaction between the Khd1p fusion and the hybrid RNA allows the activation of the reporter gene (*HIS3*) and growth on medium lacking histidine. MS2-RNA fusions contained the element E1 and the domains 1 of the element E2B (D1). B) Luciferase activity from the Ash1₁₋₉₀₀-Luc protein expressed in: WT strain + control plasmid, *khd1*

strain + pKHD1, *khdl yck1* strain + pKHD1, *khdl* strain + pKHD1-K366/367A, *khdl yck1* strain + pKHD1-K366/367A normalized on total protein concentration. Error bars indicate mean \pm standard deviation from three independent experiments. C) Graph representation of the degradation of the *ASH1* mRNA in the presence of WT Khdlp and Khdlp-K366/367A normalized to the levels of 18S rRNA.

Figure 32: Khdlp and the *ASH1* mRNA localize to cytoplasmic processing bodies during cell stress (white arrows). A) Distribution of Khdl-mCherry and Dhh1-GFP before (a-d), during (e-h), and after glucose deprivation (i-l). B) Distribution of Khdl-mCherry and Dcp1-GFP before (a-d), during (e-h), and after glucose deprivation (i-l). C) Localization of the *ASH1-MS2₆* mRNA with MS2 Coat Protein-RedStar and Dhh1-GFP before (a-d), during (e-h), and after carbon source deprivation (i-l).

Table 5: Yeast strains used in this study.

Strain	Genotype	Source
K699	<i>MATa, ura3-1, leu2-3, his3-11, trp1-1, ade2-1</i>	[14]
K699- <i>khdl</i>	K699- <i>khdl::KAN</i>	[3]
K699- <i>khdl-yck1</i>	K699- <i>khdl::loxP-yck1::KAN</i>	[3]
BY4742-DHH1-GFP	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, DHH1-GFP-HIS3</i>	Invitrogen
BY4742-DCP1-GFP	<i>MATa, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0, DCP1-GFP-HIS3</i>	Invitrogen
CMY765	<i>MATa, ura3-52, leu2D1, his3D-200, cim5-1</i>	T. Langer
YBZ1	<i>MATa, ura3-52, leu2-3, 112, his3-200, trp1-1, ade2, LYS2:: (LexAop)-HIS3, ura3 :: (lexA-op)-lacZ, LexA-MS2 coat (N55K)</i>	[24]

Table 6: Plasmids used in this study.

Plasmid	Features	Source
C3348- Δ MYC	YCP33 with <i>ASH1</i> under <i>GAL1</i> promoter	This study
pBM4536	pRS426 expressing <i>YCK1-7xHis-ProA</i>	[18]

	(amino acids 1 to 536) under <i>ADHI</i> promoter	
pKHD1	pRS415 with <i>KHD1</i> under endogenous promoter	[3]
pKHD1-K366/367A	pRS415 with <i>KHD1-K366/377A</i> under endogenous promoter	This study
pPC5	pRS415 with <i>KHD1-GFP</i> under endogenous promoter	[3]
pPC6	pRS415 with <i>KHD1-MUT-GFP</i> under endogenous promoter	[3]
pPC33	YCP33 containing <i>ASH1(nt 1-900)-LUC</i> under endogenous promoter	[3]
pPC35	pRS415 with <i>KHD1-K367A-GFP</i> under endogenous promoter	This study
pPC36	pRS415 with <i>KHD1-K367A-GFP</i> under endogenous promoter	This study
pPC37	pRS415 with <i>KHD1-K366/377A-GFP</i> under endogenous promoter	This study
pPC38	pRS415 with <i>KHD1</i> in fusion with Gal4 activation domain under endogenous promoter	This study
pPC39	pRS415 with <i>KHD1-K366/367A</i> in fusion with Gal4 activation domain under endogenous promoter	This study
pPC40	pRS415 with <i>KHD1-mCherry</i> under endogenous promoter	This study
pPC41	pIIIA-MS2-2 with element E1	[42]
pPC42	pIIIA-MS2-2 with element E2B-D1	[42]
pRJ741	pG14-prGPD1-MS2CP-RedStar	[34]
pRJ1063	pRS313 with <i>ASH1-MS2₆</i> under the <i>GAL1</i> promoter	[34]

A

Ste3p: ⁴¹⁴DDEISLGGFSKVTLDYSEKLHNSASSNFEGESLCYSPASKEENSSSNEHSSSENTAGP⁴⁷¹

Fur4p: ³⁵DLEKEYKSSQSNITTEVYEASSFEEK⁶⁰

Khd1p: ³⁵⁰DA TVVTER^{*}SD^{*}SA^{*}SFLEEKEEPQENHDNKEEQS³⁸¹

B

	P-E-S-T residues	
	Full protein	PEST-like motif
Ste3p	22.9%	45.6%
Fur4p	21.9%	52.0%
Khd1p	28.1%	48.4%

Figure 28: The C-terminal domain of Khd1p is a PEST-like sequence

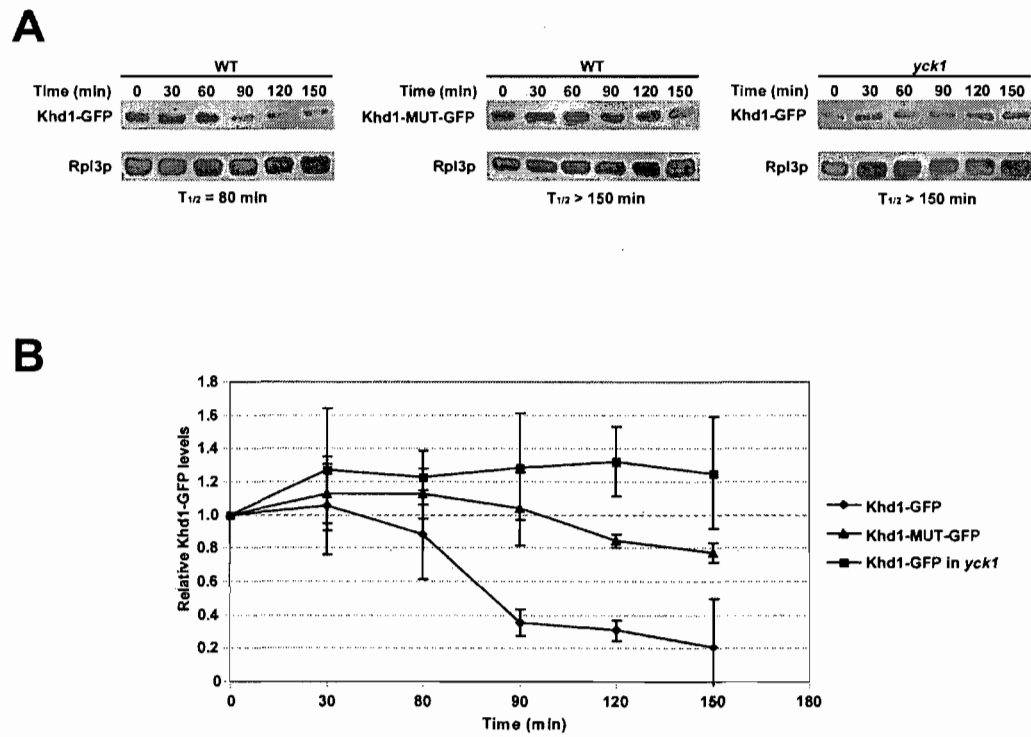


Figure 29: Phosphorylation of Khd1p triggers its degradation

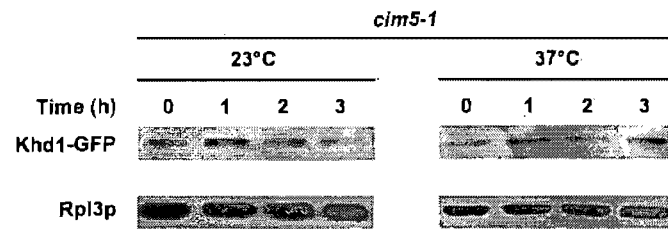
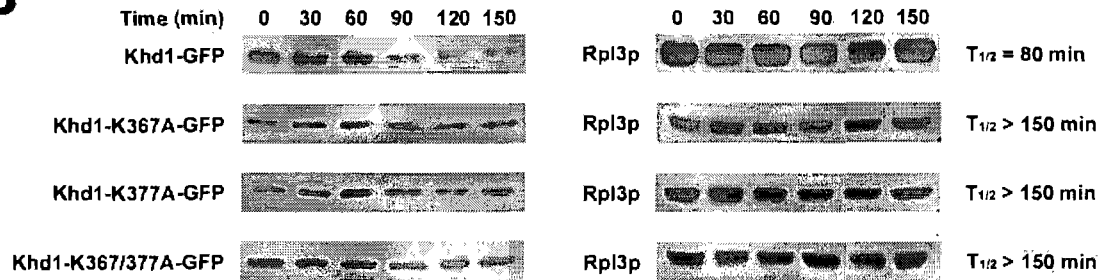
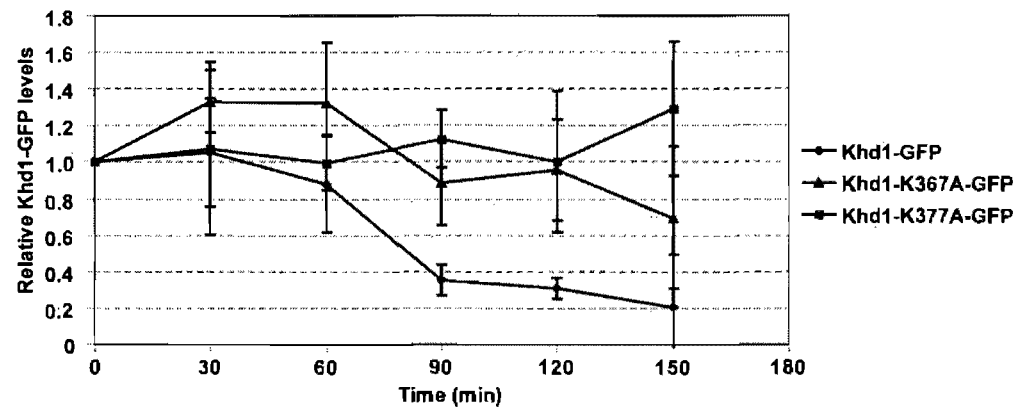
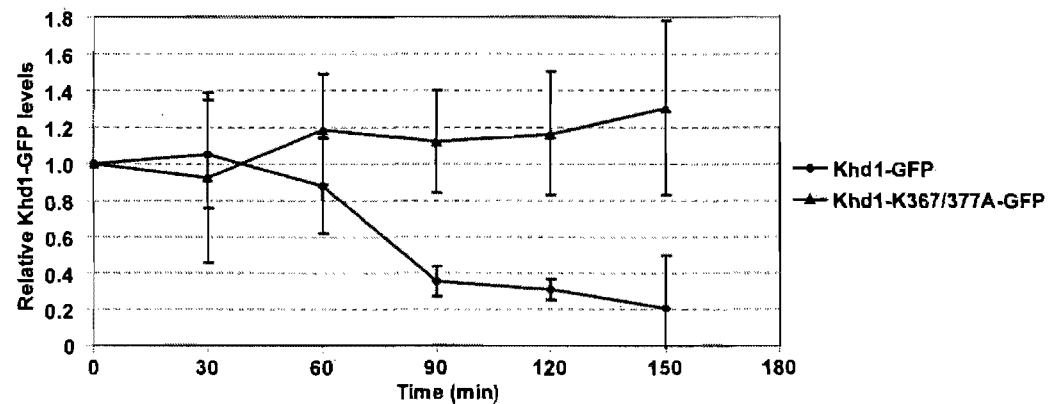
A**B****C****D**

Figure 30: Proteasome inhibition and mutation of lysines in the C-terminal domain of Khd1p impairs its degradation

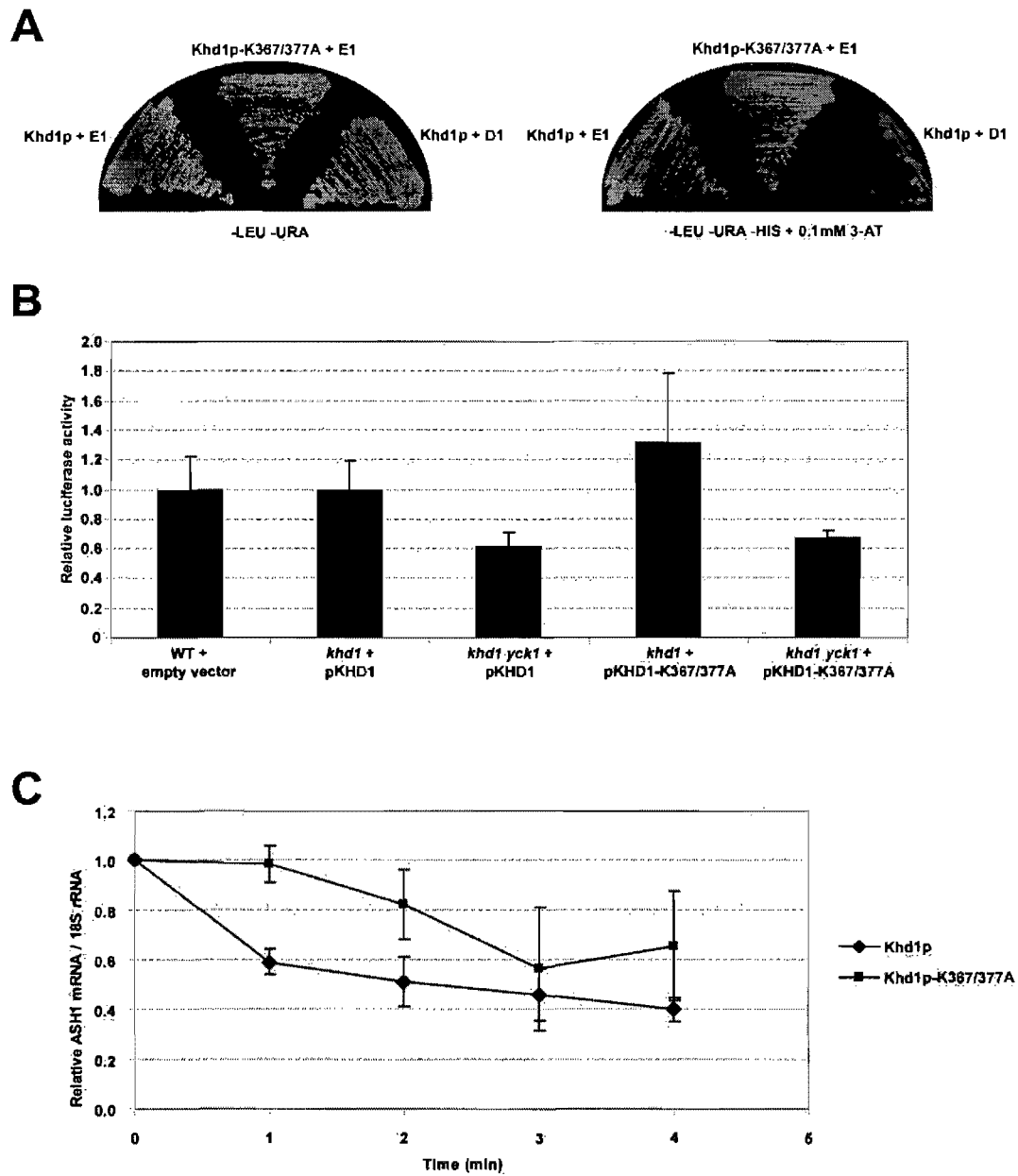


Figure 31: The degradation of Khd1p controls the stability of the *ASH1* mRNA

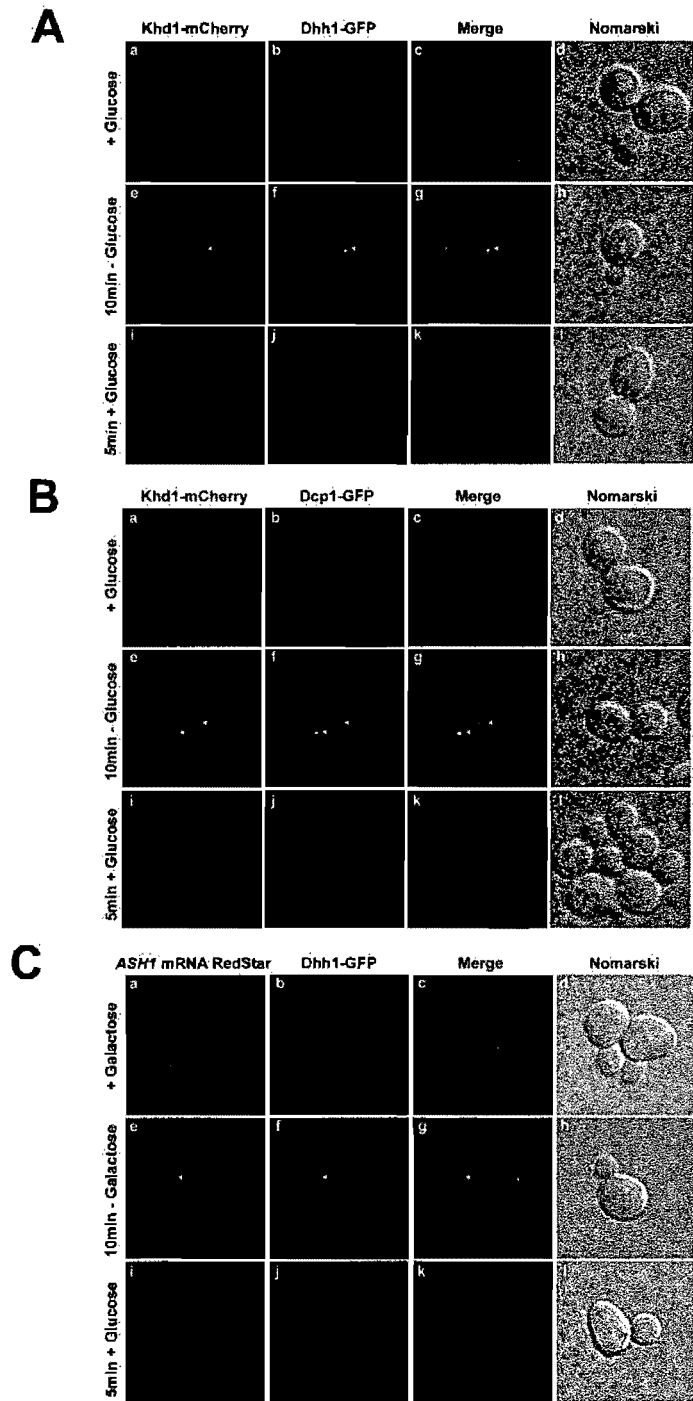


Figure 32: Khd1p and the *ASH1* mRNA localize to cytoplasmic processing bodies during cellular stress

DISCUSSION

4.1 Mécanismes de régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1*

La régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* durant sa localisation est cruciale afin de mener à une distribution asymétrique de la protéine Ash1 (Long et al., 1997; Takizawa et al., 1997). Au fil des années, quelques facteurs et éléments impliqués dans la régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* ont été identifiés. Notamment, la présence des éléments de localisation dans la séquence codante de l'ARNm *ASH1* permet de ralentir la progression des ribosomes et ainsi d'accentuer le phénotype de distribution asymétrique d'Ash1p (Chartrand et al., 2002). Toutefois, cette affirmation est tirée du fait que la transposition des éléments de localisation dans le 3'UTR de l'ARNm *ASH1* mène à une traduction accrue du transcrit ainsi qu'à une diminution de la distribution asymétrique d'Ash1p alors que l'ajout d'une tige-boucle dans le 5'UTR afin de ralentir la traduction permet de rétablir les phénotypes habituellement observés (Chartrand et al., 2002). Bien que cette transposition n'affecte en rien la localisation du transcrit, il est possible que la transposition des éléments de localisation dans le 3'UTR affecte la liaison de facteurs *trans* en changeant leur position sur le transcrit, par exemple. Depuis cette étude publiée en 2002, nous avons montré que Khd1p lie directement l'élément de localisation E1, présent dans les 800 premiers nucléotides de la séquence codante de l'ARNm *ASH1*, et que cette liaison est nécessaire à la répression de la traduction de l'ARNm *ASH1* par Khd1p (Paquin et al., 2007). Ainsi, on ne peut pas exclure que l'effet observé lors de la transposition des éléments de localisation dans le 3'UTR de l'ARNm *ASH1* soit le résultat d'une perte de fonction de Khd1p en dénaturant son environnement endogène de liaison.

4.1.1 Régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* par Khd1p et eIF4G1

Le premier indice suggérant que Khd1p pouvait agir comme un répresseur traductionnel est venu du fait que sa surexpression cause une diminution, voire une inhibition, de l'expression de la protéine Ash1 sans toutefois diminuer les niveaux de son transcrit (Irie et al., 2002). Les auteurs de cette étude ont aussi montré que les 800 premiers nucléotides de la séquence codante de l'ARNm *ASH1* sont nécessaires à la coimmunoprécipitation de ce transcrit avec Khd1p. Afin de définir le site de liaison et le mécanisme d'action de Khd1p sur l'ARNm *ASH1*, nous avons fusionné les 900 premiers nucléotides de la séquence codante de l'ARNm *ASH1* en fusion avec la luciférase. Cette

première construction, qui contient l'élément de localisation E1, a été comparée à une fusion excluant l'élément de localisation E1 dans une souche de type sauvage et dans une souche délétée de *KHDI*, ce qui a permis de constater que Khd1p agit bien en tant que répresseur traductionnel, mais aussi que cette répression nécessite l'élément de localisation E1. Par ailleurs, des essais de changement de mobilité électrophorétique (EMSA) ont montré l'interaction directe entre Khd1p et l'élément de localisation E1. Généralement, les éléments liés par les répresseurs traductionnels sont présents dans les régions non-codantes des ARNm, ce qui fait de Khd1p un répresseur traductionnel atypique. Pourquoi Khd1p doit-elle lier l'ARNm *ASH1* dans la séquence codante, contrairement à la majorité des régulateurs traductionnels? Une possibilité est que cette liaison dans les 800 premiers nucléotides de l'ARNm *ASH1* diminue la quantité de ribosome sur le transcrit en affectant la phase d'élongation lors de la traduction, toutefois cette hypothèse reste à vérifier.

Il est intéressant de mentionner que nos résultats montrent que la délétion de Khd1p n'a aucun effet significatif sur la localisation de l'ARNm *ASH1*. Toutefois, une étude précédente rapportait un léger défaut de localisation de l'ARNm *ASH1* en absence de *KHDI* avec 53% des cellules montrant l'ARNm *ASH1* uniquement à l'extrémité du bourgeon (par rapport à 87% dans une souche de type sauvage) et 40% des cellules avec l'ARNm *ASH1* délocalisé uniquement dans le bourgeon (contre 12% dans une souche de type sauvage) (Irie et al., 2002; Paquin et al., 2007). Cette apparente contradiction peut s'expliquer par le fait que les méthodes de visualisation d'ARNm utilisée par les deux groupes sont différentes. Dans notre cas, nous avons utilisé des oligonucléotides complémentaires à l'ARNm *ASH1* directement couplées à des fluorophores Cy3 afin de procéder aux expérience de FISH. Dans l'étude publiée par Irie et ses collègues, ils ont utilisé des sondes d'ARN couplés à la digoxigénine et une immunofluorescence contre la digoxigénine a été réalisée afin de visualiser l'ARNm *ASH1*. Ces techniques diffèrent principalement par le fait que notre méthode permet généralement d'obtenir un meilleur ratio du signal par rapport au bruit de fond tandis que la méthode nécessitant une immunofluorescence permet d'amplifier le signal, mais génère aussi un bruit de fond plus élevé. Toutefois, il n'est pas possible de déterminer si le léger défaut de localisation de l'ARNm *ASH1* observé dans une souche délétée de *KHDI* par l'équipe de Kenji Irie est le résultat d'un bruit de fond plus élevé ou bien d'une sensibilité accrue. Néanmoins, les deux

groupes observent que la délétion de *KHD1* entraîne un défaut de distribution asymétrique de la protéine Ash1.

Ensuite, afin de mieux comprendre l'effet de Khd1p sur la traduction de l'ARNm *ASH1*, nous avons effectué des gradients de densité de sucrose qui ont permis d'établir que la présence de Khd1p diminue la quantité de ribosomes sur l'ARNm *ASH1*. Toutefois, des études à large échelle d'interaction protéine-protéine ont montré que Khd1p s'associe avec plusieurs protéines ribosomiques (Gavin et al., 2006), ce qui est en apparence en contradiction avec son effet, c'est-à-dire de diminuer le nombre de ribosomes sur l'ARNm *ASH1*. Par contre, une étude précédente mentionne que Khd1p peut lier plus de vingt ARNm, ainsi il est possible que Khd1p n'ait pas le même effet sur toutes ses cibles (Gerber et al., 2004). Cette idée est renforcée par le fait que lorsqu'elle est soumise à un gradient de sucrose, Khd1p est surtout présente avec la fraction RNP et les monosomes, mais reste tout de même associée avec les polysomes. Cette distribution est très similaire à celle de la protéine YB-1, un modulateur de la traduction important dans le développement chez les mammifères qui agit comme répresseur ou activateur en fonction de son ratio molaire par rapport à son transcrite cible (Evdokimova and Ovchinnikov, 1999; Nekrasov et al., 2003). Ceci mène à la possibilité que Khd1p pourrait avoir un double rôle : réprimer la traduction de certains ARNm et activer la traduction de certains autres transcrits. Ceci pourrait dépendre de la position de l'élément de liaison de Khd1p dans les transcrits. On peut par exemple supposer qu'en liant un transcrite dans la séquence codante, Khd1p empêche une traduction efficace alors que si la protéine lie le 5'UTR, elle peut stimuler la traduction. Il serait très intéressant de vérifier ceci en transposant l'élément de localisation E1 dans le 5'UTR de l'ARNm *ASH1* et de vérifier l'effet que cette mutation aurait sur l'expression d'Ash1p. D'autre part, il est possible que l'association de Khd1p avec des protéines ribosomiques affecte simplement la fonction de ces ribosomes, menant ainsi à une diminution de l'efficacité de la traduction de l'ARNm *ASH1*.

L'identification du facteur d'initiation de la traduction eIF4G1 comme partenaire d'interaction direct de Khd1p soulève la possibilité que cette dernière agisse sur eIF4G1 pour réguler la traduction. Le fait que la présence d'ARN favorise l'interaction entre Khd1p et eIF4G1 rappelle la liaison de PABP à eIF4G1. Celle-ci nécessite en effet la liaison de PABP à une queue de poly(A) (Tarun and Sachs, 1996). Il serait possible que

Khd1p compétitionne avec d'autres partenaires d'eIF4G1 pour la liaison à ce dernier. Par exemple, la liaison de eIF4E antagonise la liaison de Cbp80p à eIF4G1 et cause une diminution de l'affinité de Cbp80p pour eIF4G1, favorisant une interaction à la fois (Fortes et al., 2000). Aussi, la protéine virale NSP3 permet d'évincer PABP du complexe avec eIF4G afin de favoriser la traduction d'ARNm viraux (Piron et al., 1998). Afin de vérifier cette possibilité, nous avons utilisé des essais de précipitation GST en utilisant une protéine recombinante purifiée de eIF4G1 fusionnée à la GST. En vérifiant l'interaction de cette protéine recombinante avec une version de Khd1p en fusion avec un domaine TAP, nous avons ajouté des facteurs d'initiation de la traduction recombinants afin de vérifier si leur liaison à eIF4G1 compétitionne avec Khd1p. Comme nous l'avons montré au chapitre 5, Khd1-TAP n'interagit pas avec la GST seule, mais s'associe bien avec la fusion GST-eIF4G1. Ensuite, nous avons utilisé des concentrations croissantes des facteurs suivants : eIF4E, Pab1p et eIF4A. Toutefois, aucun de ces facteurs ne compétitionne avec Khd1p pour lier eIF4G1 (Figure 33). Ainsi, il semble que Khd1p n'agit pas en évinçant d'autres facteurs d'initiation de la traduction du complexe avec eIF4G1. Comme des études préalables montrent que Khd1p et eIF4G1 possèdent toutes deux une bonne affinité pour les ARN poly(C) ou poly(U) (Berset et al., 2003; Denisenko and Bomsztyk, 2002) et que l'interaction entre Khd1-TAP et eIF4G1 est favorisée par la présence d'ARN, nous avons repris les essais de compétition avec de l'ARN poly(U). Ces essais ont montré que l'ajout de concentrations croissantes d'ARN poly(U) permet de compétitionner l'association de Khd1-TAP et d'eIF4G1, soulignant une fois de plus l'importance de l'ARN dans la liaison de Khd1p à eIF4G1.

Le fait que la protéine eIF4E n'affecte pas la liaison de Khd1p à eIF4G1 n'est pas surprenante puisque qu'une étude à large échelle analysant les complexes protéiques a montré que eIF4E est présente dans un complexe avec eIF4G1 et Khd1p (Gavin et al., 2006; Gavin et al., 2002). Puisque de nombreuses protéines régulent la traduction de transcrits en liant eIF4E, menant ainsi à sa séquestration du complexe avec eIF4G (Richter and Sonenberg, 2005), nous avons vérifié si une version purifiée et recombinante de la protéine eIF4E pouvait interagir avec Khd1p. Toutefois, lors de nos expérimentations, nous avons été incapables d'obtenir une interaction entre Khd1p et eIF4E bien que cette dernière pouvait lier efficacement eIF4G1, suggérant que le complexe identifié dans l'étude à large échelle était plutôt dû au fait que Khd1p et eIF4E peuvent toutes deux lier eIF4G1.

Par ailleurs, l'analyse de la séquence en acides aminés de Khd1p n'a pas permis d'identifier de motif consensus de liaison à eIF4E, soit le motif YXXXXL (Mader et al., 1995).

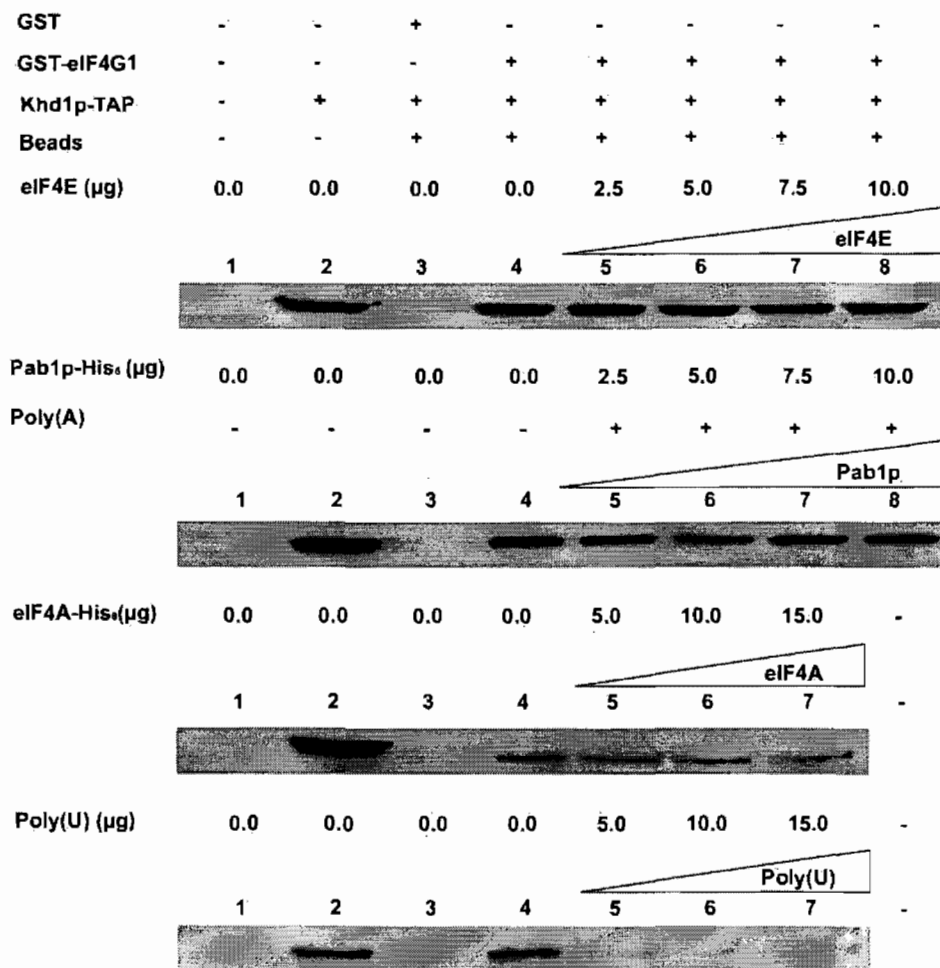


Figure 33: Le complexe Khd1p-eIF4G1 n'est pas affecté par la liaison d'autres facteurs d'initiation de la traduction.

Essais de précipitation GST où la liaison entre Khd1p-TAP à eIF4G1 est soumise à des concentrations croissantes des protéines recombinantes eIF4E, Pab1p et eIF4A. Seul l'ARN poly(U) permet de compétitionner pour la liaison à eIF4G1.

Nos résultats montrent que Khd1p lie le domaine C-terminal du facteur d'initiation de la traduction eIF4G1 et que cette interaction est favorisée par la présence d'ARN. Bien que le domaine C-terminal d'eIF4G1 chez la levure ne soit pas aussi bien caractérisé que son homologue chez les mammifères, le groupe de Hans Trachsel s'est tout de même intéressé à cette protéine. Ils ont montré que le domaine C-terminal d'eIF4G1 chez la levure est important pour l'efficacité de la traduction *in vivo* et *in vitro* et que ce domaine possède une bonne affinité pour l'ARN poly(U) (Berset et al., 2003). Toutefois, aucune cible ARN d'eIF4G1 n'a été identifiée *in vivo* alors que l'importance de la liaison à l'ARN pour cette protéine restait inconnue au moment où nous avons débuté nos études. Puisque Khd1p interagit avec le domaine C-terminal d'eIF4G1, que cette liaison est stimulée par la présence d'ARN et que ce domaine particulier d'eIF4G1 peut lui aussi lier l'ARN, nous avons tout d'abord voulu vérifier que l'interaction entre Khd1p et eIF4G1 n'était pas simplement le résultat de la liaison des deux protéines au même ARNm. Pour ce faire, nous avons répété les essais de précipitation GST avec la protéine She2, elle-même capable de lier l'élément de localisation E1 comme Khd1p. Toutefois, il semble que le fait de lier cet élément de localisation ne soit pas suffisant pour soutenir une interaction avec eIF4G1, puisque She2p ne montre aucune interaction avec eIF4G1. Ensuite, puisque Khd1p et eIF4G1 ont toutes deux une bonne affinité pour l'ARN poly(U) et que Khd1p lie spécifiquement et directement l'élément de localisation E1, nous avons voulu vérifier si eIF4G1 possède une affinité pour cet élément de localisation de l'ARNm *ASH1*. Grâce à des essais de changement de mobilité électrophorétique (EMSA), nous avons montré que la protéine eIF4G1 de type sauvage lie directement l'élément de localisation E1 *in vitro* avec une bonne spécificité alors que le domaine C-terminal seul d'eIF4G1 lie aussi le même élément, mais possède toutefois peu de spécificité (Ménade, 2007). Ensuite, des essais de triple-hybride entre le domaine C-terminal d'eIF4G1 et l'élément de localisation E1 ont confirmé cette interaction *in vivo* en plus de montrer qu'elle est indépendante de la présence de Khd1p (Ménade, 2007).

Ainsi, Khd1p et eIF4G1 lient toutes deux directement l'élément de localisation E1 de l'ARNm *ASH1*, toutefois nous n'avons pas encore déterminé si les deux protéines peuvent lier l'élément de localisation E1 simultanément. À la lumière de ces résultats, nous avons testé l'effet de la délétion du domaine C-terminal d'eIF4G1 sur la traduction de

l'ARNm *ASH1*. Nous avons été très surpris de constater que bien que la délétion du domaine C-terminal d'eIF4G1 cause une diminution globale de la traduction, elle augmente l'expression d'un rapporteur fusion *ASH1*-luciférase. Aucune différence significative n'est observée lorsque la luciférase seule est exprimée. Ceci montre que le domaine C-terminal d'eIF4G1, qui peut être lié par Khd1p, module l'expression d'Ash1p. Puisque Khd1p et eIF4G1 lient toutes deux l'élément de localisation E1, nous avons muté la tige boucle terminale de l'élément (mutant nommé M14) afin d'en étudier l'effet sur l'expression d'Ash1p (Figure 34A). Alors que la délétion de Khd1p cause une augmentation d'environ 80% de l'expression d'un rapporteur *ASH1*-luciférase, aucune augmentation n'est observée avec le mutant M14, en présence et en absence de Khd1p (Figure 34B). Ceci suggère que le mutant M14 n'affecte pas la liaison de l'élément de localisation E1 par Khd1p, puisque cette situation aurait dû mener à une augmentation de l'expression du rapporteur dans la souche de type sauvage. Toutefois, le fait qu'aucune augmentation de l'expression du rapporteur contenant la mutation M14 ne soit observée en absence de Khd1p suggère que le mécanisme de régulation de l'expression d'Ash1p s'en est trouvé affecté. Une possibilité est que la mutation M14 n'affecte pas la liaison de Khd1p à l'élément de localisation E1, mais bien la liaison d'eIF4G1.

Cette hypothèse permet de proposer un mécanisme où eIF4G1 et Khd1p compétitionnent pour la liaison à l'élément de localisation E1. En effet, il est possible d'imaginer que la liaison d'eIF4G1 à l'élément stimule la traduction en favorisant le balayage du transcrit par les ribosomes (Figure 34C). Toutefois, en présence de Khd1p, eIF4G1 ne peut plus lier l'élément de localisation E1 parce que ce dernier est occupé par Khd1p et/ou parce que Khd1p lie directement le domaine C-terminal d'eIF4G1, comme cela a été montré en utilisant des protéine recombinantes (Figure 34D). Puisque Khd1p peut homodimériser, il est possible qu'une entité Khd1p lie l'élément de localisation E1 alors que la deuxième lie eIF4G1, ce qui permet la répression de la traduction de l'ARNm *ASH1*. Selon ce modèle, la relâche du transcrit localisé par Khd1p permettrait à eIF4G1 de lier directement l'élément de localisation et ainsi de stimuler la traduction de l'ARNm *ASH1*.

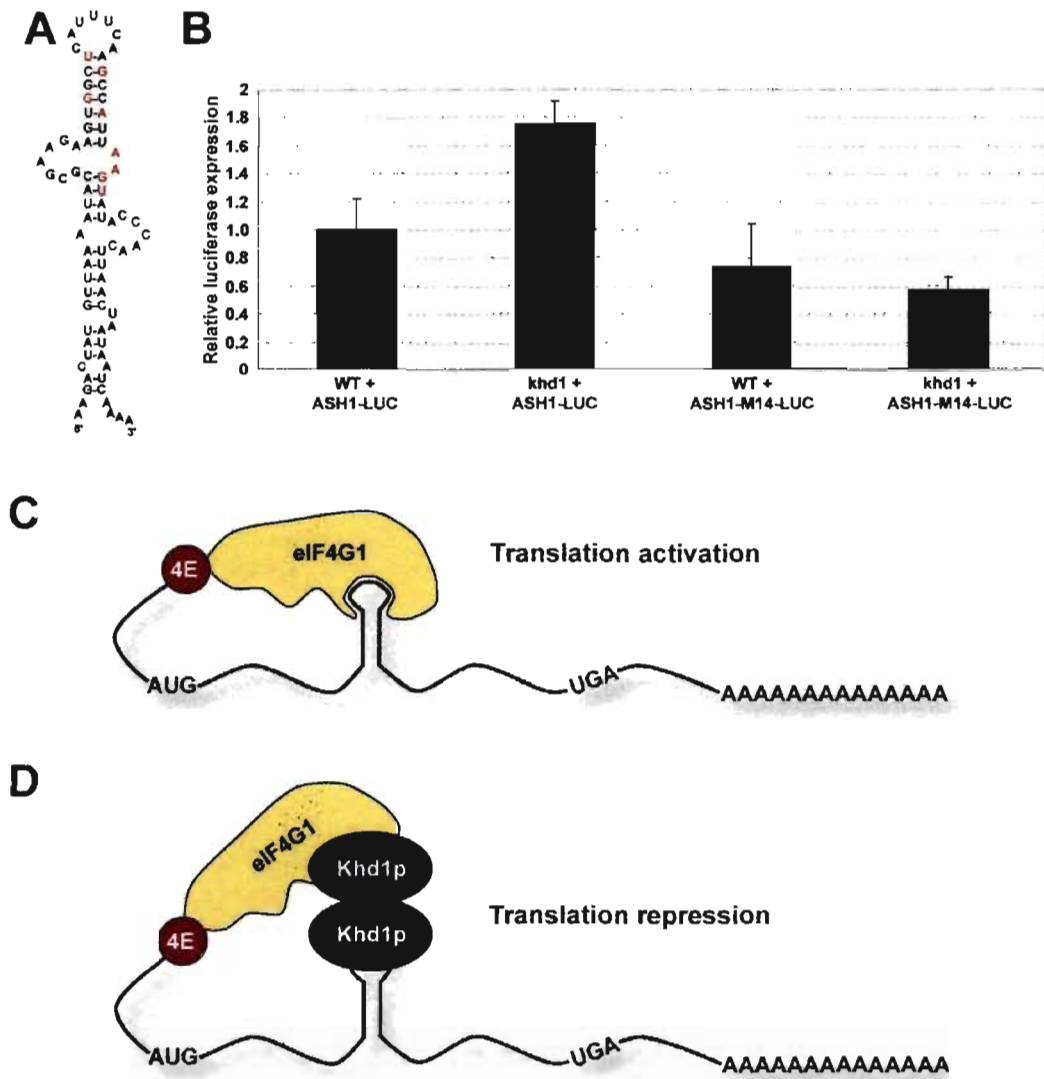


Figure 34: Modèle de mécanisme de régulation de la traduction par Khd1p et eIF4G1.

A) Schéma de l'élément de localisation E1 et des nucléotides mutés dans le mutant M14 (rouge). B) La mutation de la tige-boucle terminale de l'élément de localisation E1 (mutant M14) affecte l'expression d'un rapporteur *ASH1*-luciférase. C) La liaison directe d'eIF4G1 à l'élément de localisation E1 permettrait de stimuler la traduction de l'ARNm *ASH1*. D) La liaison de cet élément et d'eIF4G1 par Khd1p induirait une répression de la traduction.

4.1.2 Lien entre Khd1p et Puf6p pour la régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1*

Bien que nous savons maintenant que Khd1p régule la traduction de l'ARNm *ASH1* en liant l'élément de localisation E1 alors que Puf6p a un effet identique en liant l'élément de localisation E3, la façon dont ces deux régulateurs de la traduction de l'ARNm *ASH1* interagissent reste toutefois inconnue. Les effets de Khd1p et de Puf6p sur les niveaux d'expression d'*Ash1p* pourraient être concertés ou bien additifs, mais puisque la majorité des essais utilisés afin d'étudier les mécanismes d'action de ces deux protéines ne contenaient que l'élément de localisation E1 ou l'élément de localisation E3 de façon à isoler l'effet d'un seul facteur, l'interaction entre ces facteurs serait très intéressante à étudier.

D'autre part, Khd1p est une protéine majoritairement cytoplasmique, bien que détectée aussi dans le noyau, alors que Puf6p est majoritairement nucléaire bien qu'une petite portion de cette dernière colocalise avec l'ARNm *ASH1* à l'extrémité du bourgeon (Denisenko and Bomszyk, 2008; Gu et al., 2004; Huh et al., 2003; Irie et al., 2002). Cette situation rappelle celle des protéines ZBP1 et ZBP2 dans les cellules de mammifère. Ces deux protéines sont impliquées dans la localisation et la régulation de la traduction de l'ARNm de la β -actine. ZBP1 est principalement cytoplasmique alors que ZBP2 est majoritairement nucléaire (Pan et al., 2007). Une étude récente a montré que ZBP2 recrute l'ARNm de la β -actine au site de transcription alors que ZBP1 prend la relève une fois l'ARNm transcrit. En effet, des essais d'immunoprécipitation de chromatine ont montré que la déplétion de ZBP2 affecte la liaison de ZBP1 au transcrit nascent de la β -actine alors que ces deux protéines colocalisent en un foci nucléaire au site de transcription de l'ARNm de la β -actine (Pan et al., 2007). Ainsi, un mécanisme de coopération entre les deux facteurs a été identifié : ces protéines lient successivement leur transcrit cible de façon coopérative à différentes étapes de sa localisation. Il est possible que Puf6p lie l'ARNm *ASH1* dans le noyau, possiblement à son site de transcription, et permette de réprimer sa traduction. Une fois dans le cytoplasme, Khd1p pourrait lier à son tour l'ARNm *ASH1* et assurer la répression de sa traduction jusqu'à son arrivée à l'extrémité du bourgeon où la traduction de l'ARNm *ASH1* sera activée par la phosphorylation de Khd1p par Yck1p. Toutefois, puisque les éléments de localisation E1 et E3 sont très éloignés l'un de l'autre, il est possible que Khd1p et Puf6p restent tous deux liés au transcrit jusqu'à l'extrémité du

bourgeon contrairement à ZBP1 et ZBP2 qui lient des éléments adjacents, mais tout de même distincts.

La régulation de la traduction de l'ARNm *ASH1* par Khd1p et Puf6p soulève la question suivante : pourquoi deux facteurs de répression traductionnelle sont-ils nécessaires pour assurer la bonne distribution de la protéine Ash1? Une partie de la réponse vient de l'analogie avec la répression de la traduction de l'ARNm *caudal* chez la drosophile. Bien que l'ARNm *caudal* est distribué de façon uniforme dans l'ovocyte, la protéine Caudal forme un gradient postérieur-antérieur. Ce gradient est essentiel au bon développement des sections postérieures de l'organisme et dépend de la répression traductionnelle de l'ARNm *caudal* par Bicoid et d4EHP. Alors que Bicoid lie un élément dans le 3'UTR du transcrite cible, d4EHP lie la coiffe de l'ARNm (Cho et al., 2005; Rivera-Pomar et al., 1996). Par ailleurs, l'interaction spécifique entre d4EHP et Bicoid est nécessaire à la répression de la traduction de l'ARNm *caudal* et donc à la formation du gradient de la protéine Caudal (Cho et al., 2005). Ainsi, la liaison de facteurs dans le 5'UTR et le 3'UTR sont toutes deux nécessaires à la répression de la traduction de l'ARNm *caudal*. Il est possible que la coopération entre Khd1p, qui lie l'ARNm *ASH1* au début de la séquence codante, et Puf6p, qui lie ce transcrite dans le 3'UTR, permette une répression plus efficace de la traduction de l'ARNm *ASH1*.

4.2 Phosphorylation de Khd1p par la caséine kinase de type I Yck1p

La découverte de la phosphorylation comme modification post-traductionnelle capable de moduler l'affinité de certaines protéines pour lier l'ARN a permis de mettre en lumière l'importance de ces mécanismes dans la localisation d'ARNm. En effet, bien que les facteurs impliqués dans la localisation et la répression traductionnelle soient connus depuis longtemps, une question demeurait sans réponse : une fois arrivés à destination, comment les ARNm localisés sont-ils relâchés? Nos travaux ont permis de répondre à cette question dans le cas précis de la localisation et la régulation traductionnelle de l'ARNm *ASH1* chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. En effet, le répresseur traductionnel Khd1p est phosphorylé par la kinase Yck1p, une caséine kinase de type I ancrée à la membrane plasmique, ce qui permet la relâche de l'ARNm *ASH1* et l'activation de sa

traduction. De plus, nous nous sommes intéressés à ce qu'il advient de Khd1p suite à cette phosphorylation.

4.2.1 Activation locale de la traduction de l'ARNm *ASH1*

La découverte de la kinase ancrée à la membrane Yck1p comme activateur de la traduction de l'ARNm *ASH1* à travers la phosphorylation de Khd1p lève le voile sur une partie encore méconnue de la régulation traductionnelle. Non seulement nous avons montré que la phosphorylation de Khd1p par une caséine kinase de type I permet de réduire son affinité pour l'ARN, mais nous avons également identifié le site de phosphorylation dans le domaine C-terminal de Khd1p. La mutation des sérines et thréonines en alanines dans ce domaine de Khd1p diminue drastiquement la phosphorylation de Khd1p *in vivo* comme *in vitro*. De plus, grâce à l'utilisation d'un rapporteur *ASH1*-luciférase, nous avons montré que dans une souche délétée de *YCK1*, la traduction du rapporteur est grandement diminuée alors qu'une co-délétion avec *KHD1* rétablit l'expression normale du rapporteur. Ceci suggère que Khd1p est incapable de relâcher sa répression de l'ARNm *ASH1* en absence de Yck1p. Les kinases Yck1p et Yck2p sont des kinases partiellement redondantes et possèdent plusieurs cibles communes (Ptacek et al., 2005; Robinson et al., 1992). Toutefois, les essais à grande échelle de phosphorylation n'ont pas identifié Khd1p comme une cible de Yck2p, suggérant que l'activation locale de la traduction serait une fonction propre à Yck1p (Ptacek et al., 2005). Grâce à des essais de complémentation de la protéine fluorescente Venus, une forme de double hybride développé dans le laboratoire de Stephen Michnick permettant de reconstituer une protéine fluorescente et d'identifier le site d'interaction lorsque les deux protéines d'intérêt s'associent (Manderson et al., 2008), nous avons montré que Khd1p s'associe seulement à Yck1p à la membrane plasmique. Ce résultat nous a permis de déterminer que la phosphorylation de Khd1p par Yck1p permet la relâche de la répression traductionnelle sur l'ARNm *ASH1* et que cette phosphorylation a lieu à la membrane plasmique. Puisque l'ARNm *ASH1* colocalise avec le complexe Khd1p/Yck1p seulement à l'extrémité du bourgeon, ceci permet la traduction locale de la protéine Ash1 et sa distribution asymétrique. Le fait que Khd1p s'associe avec Yck1p à la membrane plasmique partout dans la cellule et non seulement à l'extrémité du bourgeon suggère que Khd1p pourrait lier d'autres ARNm dont la localisation est différente de celle de l'ARNm *ASH1*. Il a été rapporté que Khd1p peut lier plus de vingt ARNm, toutefois

nous ne savons pas s'il s'agit seulement d'ARNm activement localisés (Gerber et al., 2004). Sinon, il est possible d'imaginer que Khd1p pourrait réprimer la traduction d'ARNm qui diffusent librement dans le cytoplasme et que leur traduction serait activée lorsque Khd1p est phosphorylée par Yck1p à la membrane plasmique, menant à une traduction sous-membranaire de transcrits spécifiques.

De plus, l'identification de Yck1p, une kinase ancrée à la membrane plasmique, comme effecteur de l'activation de la traduction de l'ARNm *ASH1* une fois localisé permet d'effectuer un parallèle intéressant avec le mécanisme homologue pour l'activation de la traduction de l'ARNm de la β -actine dans les cellules de mammifères. En effet, la phosphorylation de ZBP1, le répresseur traductionnel de l'ARNm de la β -actine, par la kinase Src, elle aussi ancrée à la membrane plasmique, met en lumière l'importance des kinases membranaires dans la régulation de la traduction des transcrits localisés (Huttelmaier et al., 2005; Paquin et al., 2007). Aussi, la phosphorylation de la protéine hnRNP K par Src permet la relâche de la répression traductionnelle de l'ARNm de la 15-lipoxygénase (Messias et al., 2006) tout comme la phosphorylation de dFxr module son affinité pour l'ARN (Siomi et al., 2002). Puisque la majorité des ARNm localisés sont ciblés à la membrane ou à une organelle riche en membrane (Shepard et al., 2003), il est probable que les kinases membranaires jouent un rôle important dans la modulation de l'expression des gènes dont les transcrits sont localisés. Notre étude montre une fois de plus que la levure *Saccharomyces cerevisiae* reste un excellent modèle pour mieux comprendre les mécanismes de localisation d'ARNm et de régulation de leur traduction puisque ces mécanismes chez la levure sont très similaires aux mécanismes identifiés chez les métazoaires.

4.2.2 Dégradation de Khd1p suite à sa phosphorylation par Yck1p

Suite à nos travaux sur la phosphorylation de Khd1p par la kinase Yck1p qui ont montré que cette phosphorylation mène à la relâche de la répression de la traduction de l'ARNm *ASH1* par Khd1p et à l'activation locale de l'expression d'*Ash1p*, nous avons voulu étudier ce qu'il advient de Khd1p. Le destin des régulateurs traductionnels des ARNm localisés suite à la relâche de leur cible n'est pas connu et deux grandes hypothèses s'imposent. Premièrement, la protéine pourrait être recyclée et utilisée pour une deuxième

ronde de localisation et de régulation de la traduction, mais ceci implique que la protéine d'intérêt doit cheminer vers son point de départ, soit par diffusion, soit par mouvement dirigé en association avec un moteur moléculaire. Le seul indice de la présence d'un tel mécanisme vient du fait que ZBP1 affiche quelques fois des mouvements rétrogrades sur les filaments d'actine, toutefois cela ne signifie pas nécessairement qu'elle est recyclée afin d'être utilisée à nouveau (Tiruchinapalli et al., 2003). Deuxièmement, il est possible que suite à la relâche de leur cible, les répresseurs traductionnels soient simplement soumis à la dégradation protéolytique afin d'éviter qu'ils interfèrent avec l'expression locale de leur transcrit cible. Le sort de plusieurs substrats de Yck1p, comme Mth1p, Fur4p et Std1p qui sont ubiquitinés et dégradés après leur phosphorylation par cette kinase (Marchal et al., 2000; Moriya and Johnston, 2004), soulève la possibilité que Khd1p soit aussi dégradé par le protéasome suite à sa phosphorylation par Yck1p. Afin d'étudier la question, nous avons déterminé la demie-vie de Khd1p en fonction de son état de phosphorylation puisque cette expérience permet d'exclure le recyclage de Khd1p dans la mesure où la demie-vie de la protéine varie en fonction de sa phosphorylation.

Alors que la demie-vie normale d'une protéine de fusion Khd1-GFP est d'environ 80 minutes, la délétion de *YCK1* ou bien la mutation des sites de phosphorylation de Khd1p augmente sa demie-vie. Ainsi, la phosphorylation de Khd1p induirait non seulement la relâche et la traduction locale de l'ARNm *ASH1*, mais aussi la dégradation de Khd1p. De plus, nous avons déterminé grâce à l'utilisation d'une souche *cim5-1*, contenant une allèle thermosensible de la protéine Cim5p (une ATPase régulatrice de la fonction du protéasome), que Khd1p est fort probablement ubiquitinée suite à sa phosphorylation et que cette modification mène à sa dégradation par le protéasome. Par contre, la dégradation dirigée de Khd1p soulève la question suivante : pourquoi cibler Khd1p pour la dégradation après la relâche de l'ARNm *ASH1*? Est-ce pour contrer la présence de phosphatases à l'extrémité du bourgeon qui permettrait la déphosphorylation de Khd1p et donc sa liaison à l'ARNm *ASH1*, empêchant ainsi une bonne expression locale d'Ash1p? Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons généré un mutant des lysines K367 et K377 dans le domaine C-terminal de Khd1p. Avec ce mutant, qui ne peut plus être ciblé vers la dégradation, nous avons effectué des essais luciférase pour vérifier l'effet de ces mutations sur l'expression d'un rapporteur *ASH1*-luciférase. Nous avons été surpris de constater que la stabilisation de Khd1p n'affecte pas significativement l'expression du rapporteur, ce qui indique que le

mutant Khd1p-K367/377A n'est pas le substrat de phosphatases suite à sa phosphorylation par Yck1p et donc ne peut pas lier à nouveau l'élément E1 de l'ARNm *ASH1*.

Si la stabilisation de Khd1p n'affecte pas les niveaux d'expression d'Ash1p, pourquoi cibler Khd1p vers la dégradation? Un indice provient de l'observation que la protéine ZBP1 module la demie-vie de l'ARNm de la β -actine en situation de stress cellulaire (Stohr et al., 2006). Dans ce cas, la déplétion de ZBP1 par ARN interférence a pour conséquence la déstabilisation de ses transcrits cibles, alors que l'expression artificielle de ZBP1 augmente la demie-vie de ces transcrits (Stohr et al., 2006). Afin de vérifier si Khd1p a un effet semblable sur la demie-vie de l'ARNm *ASH1*, nous nous sommes intéressés à l'effet de la stabilisation de Khd1p sur la demie-vie de l'ARNm *ASH1*. Pour ce faire, nous avons utilisé une construction du gène *ASH1* sous le contrôle du promoteur inductible *GALI*. Bien que nous sommes conscients des limites de cette approche par rapport aux niveaux d'ARNm et à la régulation de leur transcription, cette méthode est largement répandue et permet d'obtenir une réponse à l'hypothèse posée. Ainsi, nous avons déterminé que la stabilisation de Khd1p augmente significativement la demie-vie de l'ARNm *ASH1*, ce qui justifie la nécessité de dégrader Khd1p suite à sa phosphorylation (Figure 35). Nos résultats montrent que le mutant K366/367A de Khd1p n'affecte pas les niveaux d'expression d'une fusion Ash1-luciférase, suggérant que ce mutant peut être phosphorylé par Yck1p et relâcher la répression traductionnelle de l'ARNm *ASH1*, toutefois la stabilisation de Khd1p-K367/377A mène à une stabilisation de l'ARNm *ASH1*. Les résultats des essais de changement de mobilité électrophorétique montrent que la phosphorylation de Khd1p affecte surtout la formation de dimères de Khd1p sur l'élément de localisation E1 (Figure 22D). Il serait donc possible que Khd1p demeure lié sur l'ARNm *ASH1* sous forme de monomère menant ainsi à la stabilisation du transcrit.

Le fait que Khd1p s'associe à des facteurs impliqués dans la dégradation des ARNm, notamment avec les P-bodies, suggère que la stabilisation de l'ARNm *ASH1* par Khd1p pourrait passer par cette association. Il est possible que Khd1p demeure lié sur l'ARNm *ASH1* en tant que monomère après sa phosphorylation par Yck1p, mais une autre possibilité est que Khd1p puisse s'associer avec des facteurs de dégradation des ARNm et inhiber leur activité, protégeant ainsi l'ARNm *ASH1* de la dégradation jusqu'à ce que

Khd1p soit ubiquitinée et envoyée au protéasome afin d'être dégradée. Un candidat intéressant est la protéine Xrn1p, une exonucléase présente dans les P-bodies qui s'associe avec Khd1p selon des essais d'interaction protéine-protéine à grande échelle (Gavin et al., 2006). L'étude du mécanisme de protection de l'ARNm *ASH1* par Khd1p contre la dégradation saura mettre à jour les détails de cette nouvelle fonction très intéressante de Khd1p.

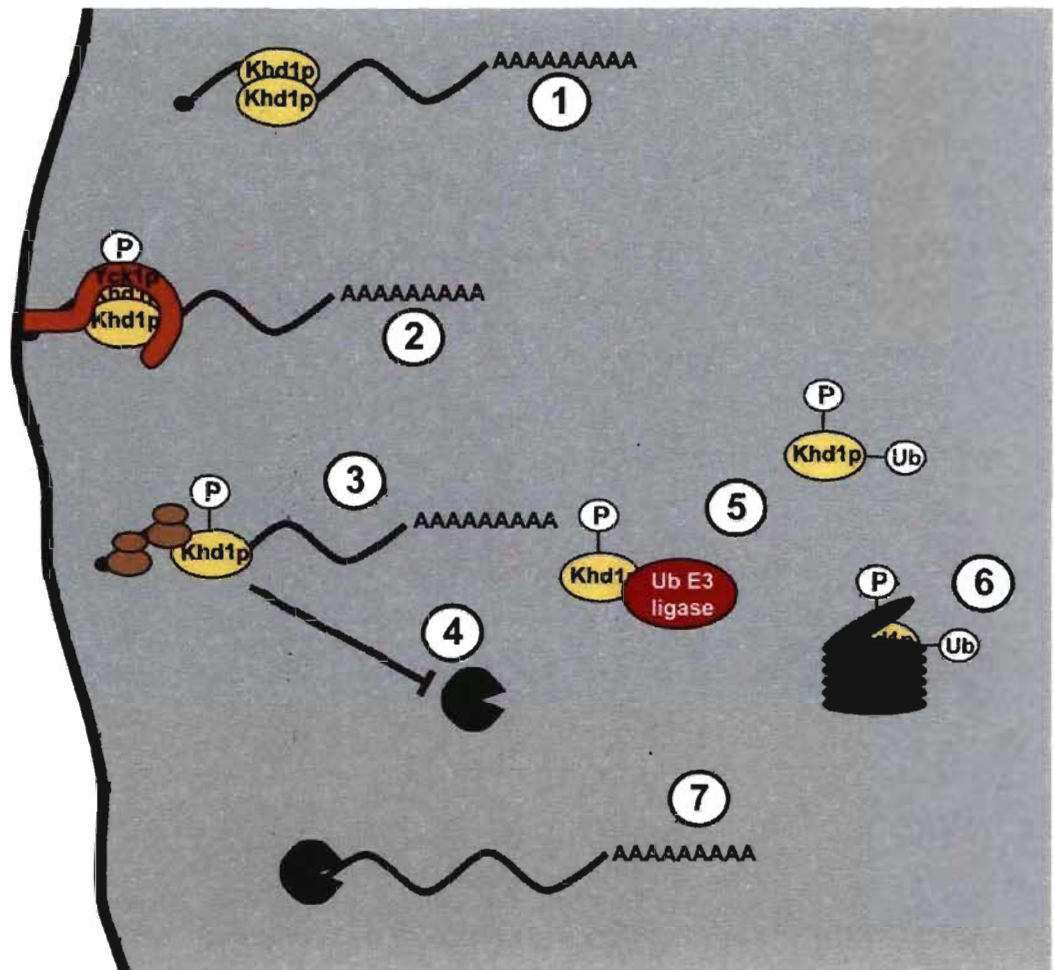


Figure 35: Modèle de la dégradation de Khd1p et de son effet sur l'ARNm *ASH1*.

Khd1p réprime la traduction de l'ARNm *ASH1* durant sa localisation (1). Une fois arrivée à l'extrémité du bourgeon, Khd1p est phosphorylée par Yck1p (2), ce qui mène à la relâche de la répression traductionnelle de l'ARNm et à sa traduction locale (3). La présence de Khd1p inhibe la dégradation de l'ARNm *ASH1* (4). La version phosphorylée de Khd1p est ubiquitinée par une ubiquitine E3 ligase et soumise à la protéolyse par le protéasome (5-6), ce qui active la dégradation de l'ARNm *ASH1* (7).

CONCLUSIONS

Lorsque nous avons commencé notre étude sur Khd1p, bien peu d'information était disponible sur cette protéine et seulement quelques indices permettaient de supposer qu'il s'agissait d'un régulateur traductionnel. Depuis, nous avons montré que Khd1p constitue un répresseur traductionnel *bona fide*. De plus, nos travaux ont permis de mettre en lumière l'implication du facteur d'initiation de la traduction eIF4G1 dans la régulation de l'expression de la protéine Ash1. Cette découverte, présentée au chapitre 2, permet de mieux comprendre les mécanismes par lesquels les modulateurs de la traduction agissent afin de mener à bien leur fonction.

De plus, nous sommes parmi les premiers groupes à avoir identifié un facteur d'activation local de la traduction d'un ARNm localisé lorsqu'il arrive à destination. L'identification de Yck1p, une kinase ancrée à la membrane plasmique, et de la phosphorylation comme méthode permettant de moduler l'affinité pour l'ARNm des protéines liant l'ARN constitue une avancée majeure dans le domaine en plus de conforter la position de la levure *Saccharomyces cerevisiae* comme excellent organisme modèle pour l'étude des mécanismes de localisation et de régulation de la traduction des ARNm.

De plus, nous sommes les premiers à montrer ce qui advient du répresseur traductionnel après sa phosphorylation et la relâche de sa cible en montrant au chapitre 3 que cette modification mène à la dégradation du facteur de répression traductionnel par le protéasome. Ceci nous permet de suggérer qu'une fois la première ronde de localisation et de régulation traductionnelle accomplie, Khd1p n'est pas recyclé pour une deuxième, mais est bien soumise à la protéolyse par le protéasome afin de permettre la dégradation de l'ARNm *ASH1* suite à l'expression locale d'Ash1p. Khd1p aurait donc un rôle central dans l'expression d'Ash1p en protégeant l'ARNm *ASH1* de la dégradation durant sa localisation tout en réprimant sa traduction avant son arrivée à l'extrémité du bourgeon.

BIBLIOGRAPHIE

- Abraham, L.K. (2000). The 26S proteasome: Ubiquitin-mediated proteolysis in the tunnel. *Molecular Reproduction and Development* 57, 109-110.
- Ainger, K., Avossa, D., Diana, A.S., Barry, C., Barbarese, E., and Carson, J.H. (1997). Transport and Localization Elements in Myelin Basic Protein mRNA. *J. Cell Biol.* 138, 1077-1087.
- Ainger, K., Avossa, D., Morgan, F., Hill, S.J., Barry, C., Barbarese, E., and Carson, J.H. (1993). Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes. *J. Cell Biol.* 123, 431-441.
- Algire, M.A., and Lorsch, J.R. (2006). Where to begin? The mechanism of translation initiation codon selection in eukaryotes. *Current Opinion in Chemical Biology* 10, 480-486.
- Amon, A. (1996). Mother and Daughter Are Doing Fine: Asymmetric Cell Division in Yeast. *Cell* 84, 651-654.
- Aronov, S., Gelin-Licht, R., Zipor, G., Haim, L., Safran, E., and Gerst, J.E. (2007). mRNAs Encoding Polarity and Exocytosis Factors Are Cotransported with the Cortical Endoplasmic Reticulum to the Incipient Bud in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 27, 3441-3455.
- Aronov, S., and Gerst, J.E. (2004). Involvement of the Late Secretory Pathway in Actin Regulation and mRNA Transport in Yeast. *J. Biol. Chem.* 279, 36962-36971.
- Bailly, M., Ichetovkin, I., Grant, W., Zebda, N., Machesky, L.M., Segall, J.E., and Condeelis, J. (2001). The F-actin side binding activity of the Arp2/3 complex is essential for actin nucleation and lamellipod extension. *Current Biology* 11, 620-625.
- Baron-Benhamou, J., Fortes, P., Inada, T., Preiss, T., and Hentze, M.W. (2003). The interaction of the cap-binding complex (CBC) with eIF4G is dispensable for translation in yeast. *RNA* 9, 654-662.
- Bashirullah, A., Cooperstock, R.L., and Lipshitz, H.D. (1998). RNA Localization in Development. *Annual Review of Biochemistry* 67, 335-394.
- Bashirullah, A., Halsell, S.R., Cooperstock, R.L., Kloc, M., Karaiskakis, A., Fisher, W.W., Fu, W., Hamilton, J.K., Etkin, L.D., and Lipshitz, H.D. (1999). Joint action of two RNA degradation pathways controls the timing of maternal transcript elimination at the midblastula transition in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J* 18, 2610-2620.
- Beach, D.L., and Bloom, K. (2001). ASH1 mRNA Localization in Three Acts. *Mol. Biol. Cell* 12, 2567-2577.
- Berset, C., Zurbriggen, A., Djafarzadeh, S., Altmann, M., and Trachsel, H. (2003). RNA-binding activity of translation initiation factor eIF4G1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 9, 871-880.

- Bobola, N., Jansen, R.-P., Shin, T.H., and Nasmyth, K. (1996). Asymmetric Accumulation of Ash1p in Postanaphase Nuclei Depends on a Myosin and Restricts Yeast Mating-Type Switching to Mother Cells. *Cell* 84, 699-709.
- Bohl, F., Kruse, C., Frank, A., Ferring, D., and Jansen, R.P. (2000). She2p, a novel RNA-binding protein tethers ASH1 mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p. *Embo J* 19, 5514-5524.
- Breedon, L., and Nasmyth, K. (1987). Cell cycle control of the yeast HO gene: Cis- and Trans-acting regulators. *Cell* 48, 389-397.
- Brendza, R.P., Serbus, L.R., Duffy, J.B., and Saxton, W.M. (2000). A Function for Kinesin I in the Posterior Transport of oskar mRNA and Staufien Protein. *Science* 289, 2120-2122.
- Caponigro, G., and Parker, R. (1996). Mechanisms and control of mRNA turnover in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 60, 233-249.
- Chang, W., Zaarour, R.F., Reck-Peterson, S., Rinn, J., Singer, R.H., Snyder, M., Novick, P., and Mooseker, M.S. (2008). Myo2p, a class V myosin in budding yeast, associates with a large ribonucleic acid-protein complex that contains mRNAs and subunits of the RNA-processing body. *RNA* 14, 491-502.
- Chartrand, P., Meng, X.H., Huttelmaier, S., Donato, D., and Singer, R.H. (2002). Asymmetric Sorting of Ash1p in Yeast Results from Inhibition of Translation by Localization Elements in the mRNA. *Molecular Cell* 10, 1319-1330.
- Chartrand, P., Meng, X.H., Singer, R.H., and Long, R.M. (1999). Structural elements required for the localization of ASH1 mRNA and of a green fluorescent protein reporter particle in vivo. *Current Biology* 9, 333-338.
- Chartrand, P., Singer, R.H., and Long, R.M. (2001). RNP Localization and Transport in Yeast. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 17, 297-310.
- Chi, A., Huttenhower, C., Geer, L.Y., Coon, J.J., Syka, J.E.P., Bai, D.L., Shabanowitz, J., Burke, D.J., Troyanskaya, O.G., and Hunt, D.F. (2007). Analysis of phosphorylation sites on proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 2193-2198.
- Cho, P.F., Poulin, F., Cho-Park, Y.A., Cho-Park, I.B., Chicoine, J.D., Lasko, P., and Sonenberg, N. (2005). A New Paradigm for Translational Control: Inhibition via 5'-3' mRNA Tethering by Bicoid and the eIF4E Cognate 4EHP. *Cell* 121, 411-423.
- Cosma, M.P. (2004). Daughter-specific repression of *Saccharomyces cerevisiae* HO: Ash1 is the commander. *EMBO Rep* 5, 953-957.
- Cosma, M.P., Tanaka, T., and Nasmyth, K. (1999). Ordered Recruitment of Transcription and Chromatin Remodeling Factors to a Cell Cycle- and Developmentally Regulated Promoter. *Cell* 97, 299-311.

- Dahm, R., and Kiebler, M. (2005). Cell biology: Silenced RNA on the move. *Nature* 438, 432-435.
- Denisenko, O., and Bomsztyk, K. (2002). Yeast hnRNP K-Like Genes Are Involved in Regulation of the Telomeric Position Effect and Telomere Length. *Mol. Cell. Biol.* 22, 286-297.
- Denisenko, O., and Bomsztyk, K. (2008). Epistatic Interaction Between the K-Homology Domain Protein HEK2 and SIR1 at HMR and Telomeres in Yeast. *Journal of Molecular Biology* 375, 1178-1187.
- Diehn, M., Eisen, M.B., Botstein, D., and Brown, P.O. (2000). Large-scale identification of secreted and membrane-associated gene products using DNA microarrays. *Nat Genet* 25, 58-62.
- Ding, D., Parkhurst, S.M., Halsell, S.R., and Lipshitz, H.D. (1993). Dynamic Hsp83 RNA localization during *Drosophila* oogenesis and embryogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3773-3781.
- Dominguez, D., Altmann, M., Benz, J., Baumann, U., and Trachsel, H. (1999). Interaction of Translation Initiation Factor eIF4G with eIF4A in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274, 26720-26726.
- Du, T.-G., Schmid, M., and Jansen, R.-P. (2007). Why cells move messages: The biological functions of mRNA localization. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 18, 171-177.
- Dunn, B.D., Sakamoto, T., Hong, M.-S.S., Sellers, J.R., and Takizawa, P.A. (2007). Myo4p is a monomeric myosin with motility uniquely adapted to transport mRNA. *J. Cell Biol.* 178, 1193-1206.
- Eichberg, J., and Iyer, S. (1996). Phosphorylation of myelin protein: recent advances. *Neurochem Res* 21, 527-535.
- Elion, E.A. (2000). Pheromone response, mating and cell biology. *Current Opinion in Microbiology* 3, 573-581.
- Entian, K.D., Schuster, T., Hegemann, J.H., Becher, D., Feldmann, H., Guldener, U., Gotz, R., Hansen, M., Hollenberg, C.P., Jansen, G., *et al.* (1999). Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol Gen Genet* 262, 683-702.
- Eom, T., Antar, L.N., Singer, R.H., and Bassell, G.J. (2003). Localization of a beta-Actin Messenger Ribonucleoprotein Complex with Zipcode-Binding Protein Modulates the Density of Dendritic Filopodia and Filopodial Synapses. *J. Neurosci.* 23, 10433-10444.
- Estrada, P., Kim, J., Coleman, J., Walker, L., Dunn, B., Takizawa, P., Novick, P., and Ferro-Novick, S. (2003). Myo4p and She3p are required for cortical ER inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 163, 1255-1266.

- Evans Bergsten, S., Huang, T., Chatterjee, S., and Gavis, E.R. (2001). Recognition and long-range interactions of a minimal nanos RNA localization signal element. *Development* 128, 427-435.
- Evdokimova, V.M., and Ovchinnikov, L.P. (1999). Translational regulation by Y-box transcription factor: involvement of the major mRNA-associated protein, p50. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31, 139-149.
- Fields, S., and Song, O.-k. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.
- Fitzner, D., Schneider, A., Kippert, A., Mobius, W., Willig, K.I., Hell, S.W., Bunt, G., Gaus, K., and Simons, M. (2006). Myelin basic protein-dependent plasma membrane reorganization in the formation of myelin. *EMBO J* 25, 5037-5048.
- Forrest, K.M., and Gavis, E.R. (2003). Live Imaging of Endogenous RNA Reveals a Diffusion and Entrapment Mechanism for nanos mRNA Localization in *Drosophila*. *Current Biology* 13, 1159-1168.
- Fortes, P., Inada, T., Preiss, T., Hentze, M.W., Mattaj, I.W., and Sachs, A.B. (2000). The Yeast Nuclear Cap Binding Complex Can Interact with Translation Factor eIF4G and Mediate Translation Initiation. *Molecular Cell* 6, 191-196.
- Franz, A., Maass, K., and Seedorf, M. (2007). A complex peptide-sorting signal, but no mRNA signal, is required for the Sec-independent transport of Ist2 from the yeast ER to the plasma membrane. *FEBS Letters* 581, 401-405.
- Gavin, A.C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L.J., Bastuck, S., Dumpelfeld, B., *et al.* (2006). Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* 440, 631-636.
- Gavin, A.C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., *et al.* (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141-147.
- Gerber, A.P., Herschlag, D., and Brown, P.O. (2004). Extensive association of functionally and cytotopically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. *PLoS Biol* 2, E79.
- Gingras, A.-C., Raught, B., and Sonenberg, N. (1999). eIF4 INITIATION FACTORS: Effectors of mRNA Recruitment to Ribosomes and Regulators of Translation. *Annual Review of Biochemistry* 68, 913-963.
- Gonsalvez, G.B., Lehmann, K.A., Ho, D.K., Stanitsa, E.S., Williamson, J.R., and Long, R.M. (2003). RNA-protein interactions promote asymmetric sorting of the ASH1 mRNA ribonucleoprotein complex. *RNA* 9, 1383-1399.
- Gonsalvez, G.B., Little, J.L., and Long, R.M. (2004). ASH1 mRNA Anchoring Requires Reorganization of the Myo4p-She3p-She2p Transport Complex. *J. Biol. Chem.* 279, 46286-46294.

- Gonzalez, I., Buonomo, S.B.C., Nasmyth, K., and von Ahsen, U. (1999). ASH1 mRNA localization in yeast involves multiple secondary structural elements and Ash1 protein translation. *Current Biology* 9, 337-340.
- Goyer, C., Altmann, M., Lee, H.S., Blanc, A., Deshmukh, M., Woolford, J.L., Jr., Trachsel, H., and Sonenberg, N. (1993). TIF4631 and TIF4632: two yeast genes encoding the high-molecular-weight subunits of the cap-binding protein complex (eukaryotic initiation factor 4F) contain an RNA recognition motif-like sequence and carry out an essential function. *Mol. Cell. Biol.* 13, 4860-4874.
- Gu, W., Deng, Y., Zenklusen, D., and Singer, R.H. (2004). A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses ASH1 mRNA translation and is required for its localization. *Genes Dev.* 18, 1452-1465.
- Haber, J.E. (1998). MATING-TYPE GENE SWITCHING IN SACCHAROMYCES CEREVISIAE. *Annual Review of Genetics* 32, 561-599.
- Harnpicharnchai, P., Jakovljevic, J., Horsey, E., Miles, T., Roman, J., Rout, M., Meagher, D., Imai, B., Guo, Y., Brame, C.J., *et al.* (2001). Composition and Functional Characterization of Yeast 66S Ribosome Assembly Intermediates. *Molecular Cell* 8, 505-515.
- He, H., von der Haar, T., Singh, C.R., Ii, M., Li, B., Hinnebusch, A.G., McCarthy, J.E.G., and Asano, K. (2003). The Yeast Eukaryotic Initiation Factor 4G (eIF4G) HEAT Domain Interacts with eIF1 and eIF5 and Is Involved in Stringent AUG Selection. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5431-5445.
- Heuck, A., Du, T.-G., Jellbauer, S., Richter, K., Kruse, C., Jaklin, S., Muller, M., Buchner, J., Jansen, R.-P., and Niessing, D. (2007). Monomeric myosin V uses two binding regions for the assembly of stable translocation complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 19778-19783.
- Hicke, L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 195-201.
- Hicke, L., and Dunn, R. (2003). REGULATION OF MEMBRANE PROTEIN TRANSPORT BY UBIQUITIN AND UBIQUITIN-BINDING PROTEINS. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 19, 141-172.
- Hicke, L., Zanolari, B., and Riezman, H. (1998). Cytoplasmic Tail Phosphorylation of the alpha -Factor Receptor Is Required for Its Ubiquitination and Internalization. *J. Cell Biol.* 141, 349-358.
- Ho, M.S., Tsai, P.I., and Chien, C.T. (2006). F-box proteins: the key to protein degradation. *J Biomed Sci* 13, 181-191.
- Hodges, A.R., Krementsova, E.B., and Trybus, K.M. (2008). She3p binds to the rod of yeast myosin V and prevents it from dimerizing, forming a single-headed motor complex. *J. Biol. Chem.*, M708865200.

- Hoek, K.S., Kidd, G.J., Carson, J.H., and Smith, R. (1998). hnRNP A2 Selectively Binds the Cytoplasmic Transport Sequence of Myelin Basic Protein mRNA. *Biochemistry* 37, 7021-7029.
- Hoppe, T. (2005). Multiubiquitylation by E4 enzymes: 'one size' doesn't fit all. *Trends in Biochemical Sciences* 30, 183-187.
- Horse, E.W., Jakovljevic, J., Miles, T.D., Harnpicharnchai, P., and Woolford, J.L.J. (2004). Role of the yeast Rrp1 protein in the dynamics of pre-ribosome maturation. *RNA* 10, 813-827.
- Huh, W.-K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., and O'Shea, E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686-691.
- Huttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Dichtenberg, J., Lorenz, M., Meng, X., Bassell, G.J., Condeelis, J., and Singer, R.H. (2005). Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* 438, 512-515.
- Irie, K., Tadauchi, T., Takizawa, P.A., Vale, R.D., Matsumoto, K., and Herskowitz, I. (2002). The Khd1 protein, which has three KH RNA-binding motifs, is required for proper localization of ASH1 mRNA in yeast. *Embo J* 21, 1158-1167.
- Jambhekar, A., McDermott, K., Sorber, K., Shepard, K.A., Vale, R.D., Takizawa, P.A., and DeRisi, J.L. (2005). Unbiased selection of localization elements reveals cis-acting determinants of mRNA bud localization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 18005-18010.
- Jansen, R.-P., Dowzer, C., Michaelis, C., Galova, M., and Nasmyth, K. (1996). Mother Cell-Specific HO Expression in Budding Yeast Depends on the Unconventional Myosin Myo4p and Other Cytoplasmic Proteins. *Cell* 84, 687-697.
- Jensen, R., Sprague, G.F., and Herskowitz, I. (1983). Regulation of Yeast Mating-Type Interconversion: Feedback Control of HO Gene Expression by the Mating-Type Locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80, 3035-3039.
- Johnstone, O., and Lasko, P. (2001). TRANSLATIONAL REGULATION AND RNA LOCALIZATION IN DROSOPHILA OOCYTES AND EMBRYOS. *Annual Review of Genetics* 35, 365-406.
- Juschke, C., Ferring, D., Jansen, R.-P., and Seedorf, M. (2004). A Novel Transport Pathway for a Yeast Plasma Membrane Protein Encoded by a Localized mRNA. *Current Biology* 14, 406-411.
- Juschke, C., Wachter, A., Schwappach, B., and Seedorf, M. (2005). SEC18/NSF-independent, protein-sorting pathway from the yeast cortical ER to the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 169, 613-622.

- Kim-Ha, J., Webster, P.J., Smith, J.L., and Macdonald, P.M. (1993). Multiple RNA regulatory elements mediate distinct steps in localization of oskar mRNA. *Development* *119*, 169-178.
- King, M.L., Messitt, T.J., and Mowry, K.L. (2005). Putting RNAs in the right place at the right time: RNA localization in the frog oocyte. *Biol. Cell* *97*, 19-33.
- Kislauskis, E.H., Zhu, X.-c., and Singer, R.H. (1997). beta -Actin Messenger RNA Localization and Protein Synthesis Augment Cell Motility. *J. Cell Biol.* *136*, 1263-1270.
- Kislauskis, E.H., Zhu, X., and Singer, R.H. (1994). Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype. *J. Cell Biol.* *127*, 441-451.
- Komili, S., Farny, N.G., Roth, F.P., and Silver, P.A. (2007). Functional Specificity among Ribosomal Proteins Regulates Gene Expression. *Cell* *131*, 557-571.
- Kostriken, R., Strathern, J.N., Klar, A.J.S., Hicks, J.B., and Heffron, F. (1983). A site-specific endonuclease essential for mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* *35*, 167-174.
- Kosturko, L.D., Maggipinto, M.J., Korza, G., Lee, J.W., Carson, J.H., and Barbarese, E. (2006). Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein (hnRNP) E1 Binds to hnRNP A2 and Inhibits Translation of A2 Response Element mRNAs. *Mol. Biol. Cell* *17*, 3521-3533.
- Kruse, C., Jaedicke, A., Beaudouin, J., Bohl, F., Ferring, D., Guttler, T., Ellenberg, J., and Jansen, R.-P. (2002). Ribonucleoprotein-dependent localization of the yeast class V myosin Myo4p. *J. Cell Biol.* *159*, 971-982.
- Lambert, J.D., and Nagy, L.M. (2002). Asymmetric inheritance of centrosomally localized mRNAs during embryonic cleavages. *Nature* *420*, 682-686.
- Lawrence, J.B., and Singer, R.H. (1986). Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal proteins. *Cell* *45*, 407-415.
- Lecuyer, E., Yoshida, H., Parthasarathy, N., Alm, C., Babak, T., Cerovina, T., Hughes, T.R., Tomancak, P., and Krause, H.M. (2007). Global Analysis of mRNA Localization Reveals a Prominent Role in Organizing Cellular Architecture and Function. *Cell* *131*, 174-187.
- Lee, I. (2007). An Improved, Bias-Reduced Probabilistic Functional Gene Network of Baker's Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* *2*, e988.
- Li, X., Gerber, S.A., Rudner, A.D., Beausoleil, S.A., Haas, W., Villen, J., Elias, J.E., and Gygi, S.P. (2007). Large-Scale Phosphorylation Analysis of alpha-Factor-Arrested *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Proteome Res.* *6*, 1190-1197.
- Lipshitz, H.D., and Smibert, C.A. (2000). Mechanisms of RNA localization and translational regulation. *Current Opinion in Genetics & Development* *10*, 476-488.

- Lisman, J., Schulman, H., and Cline, H. (2002). The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci* 3, 175-190.
- Lloyd, R.E. (2006). Translational control by viral proteinases. *Virus Research* 119, 76-88.
- Long, R.M., Gu, W., Lorimer, E., Singer, R.H., and Chartrand, P. (2000). She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to ASH1 mRNA. *Embo J* 19, 6592-6601.
- Long, R.M., Gu, W., Meng, X., Gonsalvez, G., Singer, R.H., and Chartrand, P. (2001). An Exclusively Nuclear RNA-binding Protein Affects Asymmetric Localization of ASH1 mRNA and Ash1p in Yeast. *J. Cell Biol.* 153, 307-318.
- Long, R.M., Singer, R.H., Meng, X., Gonzalez, I., Nasmyth, K., and Jansen, R.-P. (1997). Mating Type Switching in Yeast Controlled by Asymmetric Localization of ASH1 mRNA. *Science* 277, 383-387.
- M.R. Galiano, A.A., J. C. Deloulme, C. Bosc, A. Schweitzer, D. Job, M. E. Hallak (2006). Myelin basic protein functions as a microtubule stabilizing protein in differentiated oligodendrocytes. *Journal of Neuroscience Research* 84, 534-541.
- Mader, S., Lee, H., Pause, A., and Sonenberg, N. (1995). The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4990-4997.
- Manderson, E.N., Malleshaiah, M., and Michnick, S.W. (2008). A Novel Genetic Screen Implicates Elm1 in the Inactivation of the Yeast Transcription Factor SBF. *PLoS ONE* 3, e1500.
- Marchal, C., Haguenaer-Tsapis, R., and Urban-Grimal, D. (2000). Casein Kinase I-dependent Phosphorylation within a PEST Sequence and Ubiquitination at Nearby Lysines Signal Endocytosis of Yeast Uracil Permease. *J. Biol. Chem.* 275, 23608-23614.
- McCarthy, J.E.G. (1998). Posttranscriptional Control of Gene Expression in Yeast. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1492-1553.
- Ménade, M. (2007). Étude de complexes ribonucléoprotéiques impliquées dans la régulation de l'expression des protéines au cours de l'initiation de la traduction. In Thèse de doctorat (Grenoble, Université Joseph Fourier), p. 177.
- Mendez, R., Hake, L.E., Andresson, T., Littlepage, L.E., Ruderman, J.V., and Richter, J.D. (2000). Phosphorylation of CPE binding factor by Eg2 regulates translation of c-mos mRNA. *Nature* 404, 302-307.
- Mendez, R., and Richter, J.D. (2001). Translational control by CPEB: a means to the end. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 521-529.
- Messias, A.C., Harnisch, C., Ostareck-Lederer, A., Sattler, M., and Ostareck, D.H. (2006). The DICE-binding Activity of KH Domain 3 of hnRNP K Is Affected by c-Src-mediated Tyrosine Phosphorylation. *Journal of Molecular Biology* 361, 470-481.

- Mingle, L.A., Okuhama, N.N., Shi, J., Singer, R.H., Condeelis, J., and Liu, G. (2005). Localization of all seven messenger RNAs for the actin-polymerization nucleator Arp2/3 complex in the protrusions of fibroblasts. *J Cell Sci* 118, 2425-2433.
- Misuzu, B., and Masako, O. (1987). Transmission and scanning electron microscopic examination of intracellular organelles in freeze-substituted *Kloeckera* and *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Cells. *Journal of Electron Microscopy Technique* 5, 249-261.
- Mori, Y., Imaizumi, K., Katayama, T., Yoneda, T., and Tohyama, M. (2000). Two cis-acting elements in the 3[prime] untranslated region of [alpha]-CaMKII regulate its dendritic targeting. *Nat Neurosci* 3, 1079-1084.
- Moriya, H., and Johnston, M. (2004). Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 1572-1577.
- Moseley, J.B., and Goode, B.L. (2005). Differential Activities and Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* Formin Proteins Bni1 and Bnr1 by Bud6. *J. Biol. Chem.* 280, 28023-28033.
- Mowry, K.L., and Cote, C.A. (1999). RNA sorting in *Xenopus* oocytes and embryos. *FASEB J.* 13, 435-445.
- Munchow, S., Sauter, C., and Jansen, R.P. (1999). Association of the class V myosin Myo4p with a localised messenger RNA in budding yeast depends on She proteins. *J Cell Sci* 112, 1511-1518.
- Munro, T.P., Magee, R.J., Kidd, G.J., Carson, J.H., Barbarese, E., Smith, L.M., and Smith, R. (1999). Mutational Analysis of a Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A2 Response Element for RNA Trafficking. *J. Biol. Chem.* 274, 34389-34395.
- Muratani, M., and Tansey, W.P. (2003). How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 192-201.
- Nakamura, A., Sato, K., and Hanyu-Nakamura, K. (2004). *Drosophila* Cup Is an eIF4E Binding Protein that Associates with Bruno and Regulates oskar mRNA Translation in Oogenesis. *Developmental Cell* 6, 69-78.
- Nekrasov, M.P., Ivshina, M.P., Chernov, K.G., Kovrigina, E.A., Evdokimova, V.M., Thomas, A.A.M., Hershey, J.W.B., and Ovchinnikov, L.P. (2003). The mRNA-binding Protein YB-1 (p50) Prevents Association of the Eukaryotic Initiation Factor eIF4G with mRNA and Inhibits Protein Synthesis at the Initiation Stage. *J. Biol. Chem.* 278, 13936-13943.
- Niessing, D., Huttelmaier, S., Zenklusen, D., Singer, R.H., and Burley, S.K. (2004). She2p Is a Novel RNA Binding Protein with a Basic Helical Hairpin Motif. *Cell* 119, 491-502.
- Oeffinger, M., Wei, K.E., Rogers, R., DeGrasse, J.A., Chait, B.T., Aitchison, J.D., and Rout, M.P. (2007). Comprehensive analysis of diverse ribonucleoprotein complexes. *Nat Meth* 4, 951-956.

Oleynikov, Y., and Singer, R.H. (2003). Real-Time Visualization of ZBP1 Association with [beta]-Actin mRNA during Transcription and Localization. *Current Biology* 13, 199-207.

Olivier, C., Poirier, G., Gendron, P., Boisgontier, A., Major, F., and Chartrand, P. (2005). Identification of a Conserved RNA Motif Essential for She2p Recognition and mRNA Localization to the Yeast Bud. *Mol. Cell. Biol.* 25, 4752-4766.

Ostareck-Lederer, A., and Ostareck, D.H. (2004). Control of mRNA translation and stability in haematopoietic cells: The function of hnRNPs K and E1/E2. *Biology of the Cell* 96, 407-411.

Page, A.M., and Hieter, P. (1999). THE ANAPHASE-PROMOTING COMPLEX: New Subunits and Regulators. *Annual Review of Biochemistry* 68, 583-609.

Pan, F., Huttelmaier, S., Singer, R.H., and Gu, W. (2007). ZBP2 Facilitates Binding of ZBP1 to {beta}-Actin mRNA during Transcription. *Mol. Cell. Biol.* 27, 8340-8351.

Paquin, N., and Chartrand, P. (2008). Local regulation of mRNA translation: new insights from the bud. *Trends in Cell Biology* 18, 105-111.

Paquin, N., Menade, M., Poirier, G., Donato, D., Drouet, E., and Chartrand, P. (2007). Local Activation of Yeast ASH1 mRNA Translation through Phosphorylation of Khd1p by the Casein Kinase Yck1p. *Molecular Cell* 26, 795-809.

Passmore, L.A., and Barford, D. (2004). Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem. J.* 379, 513-525.

Phan, L., Zhang, X., Asano, K., Anderson, J., Vornlocher, H.-P., Greenberg, J.R., Qin, J., and Hinnebusch, A.G. (1998). Identification of a Translation Initiation Factor 3 (eIF3) Core Complex, Conserved in Yeast and Mammals, That Interacts with eIF5. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4935-4946.

Piron, M., Vende, P., Cohen, J., and Poncet, D. (1998). Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4G1 and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. *EMBO J* 17, 5811-5821.

Preuss, D., Mulholland, J., Kaiser, C.A., Orlean, P., Albright, C., Rose, M.D., Robbins, P.W., and Botstein, D. (1991). Structure of the yeast endoplasmic reticulum: localization of ER proteins using immunofluorescence and immunoelectron microscopy. *Yeast* 7, 891-911.

Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A., and Boone, C. (2002). Role of Formins in Actin Assembly: Nucleation and Barbed-End Association. *Science* 297, 612-615.

Pruyne, D., Gao, L., Bi, E., and Bretscher, A. (2004a). Stable and Dynamic Axes of Polarity Use Distinct Formin Isoforms in Budding Yeast. *Mol. Biol. Cell* 15, 4971-4989.

- Pruyne, D., Legesse-Miller, A., Gao, L., Dong, Y., and Bretscher, A. (2004b). Mechanisms of Polarized Growth and Organelle Segregation in Yeast. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 20, 559-591.
- Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., Guo, H., Jona, G., Breitkreutz, A., Sopko, R., *et al.* (2005). Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* 438, 679-684.
- Pyronnet, S. (2000). Phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E by the MAPK-activated protein kinase Mnk1. *Biochemical Pharmacology* 60, 1237-1243.
- Reck-Peterson, S.L., Provance, D.W., Mooseker, M.S., and Mercer, J.A. (2000). Class V myosins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1496, 36-51.
- Reed, S.I. (2003). Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 855-864.
- Richter, J.D., and Sonenberg, N. (2005). Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 433, 477-480.
- Rivera-Pomar, R., Niessing, D., Schmidt-Ott, U., Gehring, W.J., and Jackle, H. (1996). RNA binding and translational suppression by bicoid. *Nature* 379, 746-749.
- Robinson, L.C., Hubbard, E.J.A., Graves, P.R., DePaoli-Roach, A.A., Roach, P.J., Kung, C., Haas, D.W., Hagedorn, C.H., Goebel, M., Culbertson, M.R., and Carlson, M. (1992). Yeast Casein Kinase I Homologues: An Essential Gene Pair. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 28-32.
- Rose, M.D. (1996). NUCLEAR FUSION IN THE YEAST SACCHAROMYCES CEREVISIAE. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 12, 663-695.
- Ross, A.F., Oleynikov, Y., Kislauskis, E.H., Taneja, K.L., and Singer, R.H. (1997). Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2158-2165.
- Schmid, M., Jaedicke, A., Du, T.-G., and Jansen, R.-P. (2006). Coordination of Endoplasmic Reticulum and mRNA Localization to the Yeast Bud. *Current Biology* 16, 1538-1543.
- SenGupta, D.J., Zhang, B., Kraemer, B., Pochart, P., Fields, S., and Wickens, M. (1996). A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 8496-8501.
- Shatkin, A.J. (1976). Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell* 9, 645-653.
- Shepard, K.A., Gerber, A.P., Jambhekar, A., Takizawa, P.A., Brown, P.O., Herschlag, D., DeRisi, J.L., and Vale, R.D. (2003). Widespread cytoplasmic mRNA transport in yeast: Identification of 22 bud-localized transcripts using DNA microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 11429-11434.

- Sheth, U., and Parker, R. (2003). Decapping and Decay of Messenger RNA Occur in Cytoplasmic Processing Bodies. *Science* 300, 805-808.
- Sil, A., and Herskowitz, I. (1996). Identification of asymmetrically localized determinant, Ash1p, required for lineage-specific transcription of the yeast HO gene. *Cell* 84, 711-722.
- Siomi, H., Matunis, M.J., Michael, W.M., and Dreyfuss, G. (1993). The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionary conserved motif. *Nucl. Acids Res.* 21, 1193-1198.
- Siomi, M.C., Higashijima, K., Ishizuka, A., and Siomi, H. (2002). Casein Kinase II Phosphorylates the Fragile X Mental Retardation Protein and Modulates Its Biological Properties. *Mol. Cell. Biol.* 22, 8438-8447.
- Sonoda, J., and Wharton, R.P. (2001). Drosophila Brain Tumor is a translational repressor. *Genes Dev.* 15, 762-773.
- St Johnston, D. (2005). Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 363-375.
- Sternberg, P.W., Stern, M.J., Clark, I., and Herskowitz, I. (1987). Activation of the yeast HO gene by release from multiple negative controls. *Cell* 48, 567-577.
- Stohr, N., Lederer, M., Reinke, C., Meyer, S., Hatzfeld, M., Singer, R.H., and Huttelmaier, S. (2006). ZBP1 regulates mRNA stability during cellular stress. *J. Cell Biol.* 175, 527-534.
- Strathern, J.N., Klar, A.J.S., Hicks, J.B., Abraham, J.A., Ivy, J.M., Nasmyth, K.A., and McGill, C. (1982). Homothallic switching of yeast mating type cassettes is initiated by a double-stranded cut in the MAT locus. *Cell* 31, 183-192.
- Tabb, J.S., Molyneaux, B.J., Cohen, D.L., Kuznetsov, S.A., and Langford, G.M. (1998). Transport of ER vesicles on actin filaments in neurons by myosin V. *J Cell Sci* 111, 3221-3234.
- Takizawa, P.A., DeRisi, J.L., Wilhelm, J.E., and Vale, R.D. (2000). Plasma Membrane Compartmentalization in Yeast by Messenger RNA Transport and a Septin Diffusion Barrier. *Science* 290, 341-344.
- Takizawa, P.A., Sil, A., Swedlow, J.R., Herskowitz, I., and Vale, R.D. (1997). Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast. *Nature* 389, 90-93.
- Takizawa, P.A., and Vale, R.D. (2000). The myosin motor, Myo4p, binds Ash1 mRNA via the adapter protein, She3p. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 5273-5278.
- Tarun, S.Z., Jr., and Sachs, A.B. (1996). Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J* 15, 7168-7177.
- Tiruchinapalli, D.M., Oleynikov, Y., Kelic, S., Shenoy, S.M., Hartley, A., Stanton, P.K., Singer, R.H., and Bassell, G.J. (2003). Activity-Dependent Trafficking and Dynamic

- Localization of Zipcode Binding Protein 1 and beta -Actin mRNA in Dendrites and Spines of Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* 23, 3251-3261.
- Toi, H., Fujimura-Kamada, K., Irie, K., Takai, Y., Todo, S., and Tanaka, K. (2003). She4p/Dim1p Interacts with the Motor Domain of Unconventional Myosins in the Budding Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 14, 2237-2249.
- Urbinati, C.R., Gonsalvez, G.B., Aris, J.P., and Long, R.M. (2006). Loc1p is required for efficient assembly and nuclear export of the 60S ribosomal subunit. *Mol Genet Genomics* 276, 369-377.
- Wells, S.E., Hillner, P.E., Vale, R.D., and Sachs, A.B. (1998). Circularization of mRNA by Eukaryotic Translation Initiation Factors. *Molecular Cell* 2, 135-140.
- Wesche, S., Arnold, M., and Jansen, R.-P. (2003). The UCS Domain Protein She4p Binds to Myosin Motor Domains and Is Essential for Class I and Class V Myosin Function. *Current Biology* 13, 715-724.
- Wilkinson, B.M., Regnacq, M., and Stirling, C.J. (1997). Protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *J Membr Biol* 155, 189-197.
- Yew, P.R. (2001). Ubiquitin-mediated proteolysis of vertebrate G1- and S-phase regulators. *Journal of Cellular Physiology* 187, 1-10.
- Yoon, C., Kawakami, K., and Hopkins, N. (1997). Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development* 124, 3157-3165.

ANNEXES

ANNEXE 1: Knowing when to let go

Article publié dans le journal scientifique Nature Structural & Molecular Biology (2005)
12 : 1026-1027


Avec la permission de Nature Publishing Group.

© 2005 Nature Publishing Group

Knowing when to let go

Nicolas Paquin and Pascal Chartrand

Département de Biochimie, Université de Montréal
Montréal, Québec, H3C 3J7 Canada



A new study sheds light on the mechanism regulating the translation of localized mRNAs at their destination. Phosphorylation of an RNA-binding protein by Src promotes complex disassembly and allows translation of the localized transcript.

The localization of specific mRNAs in eukaryotes provides spatial and temporal regulation of protein expression and plays important roles in cell differentiation, during development and in neuronal activity. For example, mRNA localization is involved in cell fate determination of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*¹ and is crucial for development of *Drosophila*² and *Xenopus*³. This process depends on the presence of a localization element, or “zipcode”, often in the 3'UTR of the localized transcripts, and on trans-acting proteins⁴. Typically, localized mRNAs are recruited by RNA-binding proteins to complexes that contain translational regulators and motor proteins. These complexes then travel towards their destination on microtubules or microfilaments, depending on the motors present⁵. While several aspects of the recruitment, transport and translational regulation of localized mRNAs have been explored in the past years, little is known about the mechanism behind their release and translational activation at their destination. A new study published in *Nature* by Hüttelmaier *et al.*⁶ now sheds light on this aspect of the mRNA localization process and reveals that the translational activation of localized β -actin mRNA at its destination can be modulated by the phosphorylation of ZBP1, the RNA-binding protein responsible for the translational regulation of this transcript, by the well known protein kinase Src.

The localization of the β -actin mRNA at the leading edge of fibroblasts is one of the best (and first) known examples of asymmetrically localized mRNA⁷. This transcript also localizes at the growth cone filopodia and at the dendritic spines of neurons^{8,9}. Localization of the β -actin mRNA depends on the presence of a zipcode sequence in its 3'UTR¹⁰, which is recognized by the RNA-binding protein ZBP1 (for Zipcode Binding Protein 1)¹¹. ZBP1 contains two RNA Recognition motifs (RRM) and four hnRNP K-homology (KH) domains, which are known RNA-binding motifs. Previous studies have shown that competition with ZBP1 by zipcode antisense oligonucleotides impaired the localization of the β -actin mRNA, suggesting a direct role of ZBP1 in β -actin mRNA sorting^{12,13}. However, the precise role of ZBP1 was still unknown. While the translation of several localized mRNAs has been shown to be repressed until they reach their endpoint⁵, this mechanism had yet to be characterized for β -actin mRNA. Since ZBP1 recruits β -actin mRNA at its transcription site¹³, it may be a potent candidate for this activity. Hüttelmaier *et al.*⁶ inquired about the translational regulating properties of ZBP1 using rabbit reticulocytes lysates where they noticed that ZBP1 impaired translation of mRNA in a zipcode-dependent manner. Knockdown of ZBP1 using siRNAs enhanced the translation of zipcode-containing transcripts *in vivo*, supporting the role of ZBP1 as a translational regulator.

Next, Hüttelmaier *et al.*⁶ set out to identify the mechanism responsible for the release of ZBP1 translational repression. Analysis of the ZBP1 sequence revealed the presence of a proline-rich domain, a potent SH3-binding site. This proline-rich domain is identical to that of Paxillin, which interacts with the SH3 domain of Src, a kinase involved in cell proliferation and motility¹⁴. *In vivo* and *in vitro* phosphorylation experiments identified Tyr396 as a Src target. Interestingly, Src phosphorylation of ZBP1 resulted in decreased RNA-binding activity. A Y396F mutant of ZBP1 that blocks phosphorylation shows normal RNA association, while the constitutive phosphorylation mimic, Y396E, resulted in impaired RNA-binding both *in vivo* and *in vitro*. These results raised the possibility that Src-mediated phosphorylation abolishes translational repression by ZBP1 by promoting the release of β -actin mRNA from the localization complex once this transcript reaches its destination. Indeed, a previous study has shown that Src mediated phosphorylation of tyrosine residues close to the KH-domains of hnRNP K decreases its RNA-binding affinity and relieves repression of translation of its target mRNA¹⁵. If Src regulates the binding of ZBP1 to the 3'UTR of the β -actin mRNA, one would expect that

they colocalize *in vivo*. Hüttelmaier *et al.*⁶ investigated the subcellular sites of interaction between ZBP1 and Src using FRET in neuroblastoma cells; both proteins were associated in close proximity to known sites of β -actin mRNA localization.

These results shed new light on the biological function of β -actin mRNA localization and translational control. Several phenotypes associated with stimulated or defective β -actin mRNA localization have been previously reported, but the underlying mechanism behind these phenotypes was still unclear. For instance, in fibroblasts, localization of β -actin mRNA at the leading edge enhances cell motility¹⁶, while disruption of the ZBP1/ β -actin mRNA association using an antisense oligonucleotide significantly decreases the directionality of cell movement¹⁷. Similarly, β -actin mRNA localization increases the density of dendritic filopodia and filopodial synapses of cultured hippocampal neurons⁹, and knockdown of ZBP1 by siRNAs impaired neurite outgrowth⁶. The work by Hüttelmaier *et al.*⁶ now provides an explanation by showing that the overexpression of ZBP1 increases actin protein signal at the leading edge, while the Y396F mutant, which cannot be phosphorylated and is unable to release β -actin mRNA, showed a decrease in actin expression at the leading edge in 90% of the cells. Altogether, these results give a clear phenotype showing the necessity of β -actin mRNA localization and translational control, and suggest that the pool of globular (monomeric) actin available at the leading edge is greatly affected by inhibiting the release of β -actin mRNA at its destination. This pool of globular actin would be important for processes requiring actin polymerization at the leading edge, like in cell motility, neuronal outgrowth and formation of filopodia. These results also fit well in the growing role of Src in the remodelling of the actin cytoskeleton. Among other targets, it has been shown that Src phosphorylates cortactin, a protein involved in F-actin polymerization in filopodia¹⁸. Cortactin forms a complex with WASP, F-actin, and the Arp2/3 complex to promote actin polymerization¹⁹. Recent results have shown that, *in vitro*, Src phosphorylation of cortactin reduces actin polymerization^{18,20}. Therefore, a possible function of Src in the remodelling of the actin cytoskeleton at the leading edge may be to control the pool of available globular actin by regulating F-actin polymerization through phosphorylation of cortactin on one side, and by promoting the translation of the localized β -actin mRNA on the other side.

The study from Hüttelmaier *et al.*⁶ is a significant addition to our comprehension of the localization of β -actin mRNA in neurons and fibroblasts in particular, and on the

process of mRNA localization and translational control in general. An overview of this process is summarized in Figure 36. Given that most localized mRNAs species-wide are targeted close to membranes or membrane-rich organelles such as mitochondria or endoplasmic reticulum^{2,3,5}, one can speculate that membrane-associated kinases like Src may control the anchoring, complex disassembly and/or translational activation of several localized mRNAs. Since such kinases are usually at the crosspoint of signal transduction pathways, they may constitute important regulatory links between the machinery of mRNA localization and the larger biological process in which this transcript is involved (i.e. cell motility, asymmetric cell division, neurite outgrowth, etc).

Although Hüttelmaier *et al.*⁶ provide new insights on β -actin mRNA localization, several questions remain unanswered about the localization of this transcript. One question raised is about the signal that recycles ZBP1. Since ZBP1 shows both retrograde and anterograde movement in neurons⁸, it is likely that once ZBP1 is phosphorylated by Src, it returns towards the nucleus where it should undergo dephosphorylation to recruit nascent β -actin mRNA at the transcription site and start the whole cycle again. In this case, one could expect a phosphatase to interact with ZBP1 to restore its ability to bind the β -actin mRNA zipcode. This event may take place near the nucleus, or at least away from the leading edge. Another possibility is that ZBP1 could be targeted for degradation once phosphorylated, but the retrograde movement of the protein argues against this possibility. Furthermore, the molecular motors involved in β -actin mRNA localization are still to be identified. A recent proteomic study of RNA granules purified from developing neurons reported the presence of both ZBP1 and dynein in these granules²¹. Interestingly, the RNA granule preparation is enriched in β -actin mRNA and contains ribosomes and translation factors. While the translational status of the transcripts in the granules is not known, it is tempting to speculate, from the results of Hüttelmaier *et al.*⁶, that they represent translation-inactivated mRNA transport complexes (at least for the β -actin mRNA). The purification of such granules constitutes physical evidence that ZBP1 is part of a large complex containing mRNAs, RNA-binding proteins, molecular motors, ribosomes and possibly assemblage factors. Since ZBP1 is essential not only for β -actin mRNA translational control but also for its localization, future work will have to address the role of ZBP1 in the assembly of such granules.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank L. DesGroseillers and W. Sossin for sharing unpublished data; and E. Querido for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Darzacq, X., Powrie, E., Gu, W., Singer, R.H. & Zenklusen, D. *Current Opinion in Microbiology* **6**, 614-620 (2003).
2. Johnstone, O. & Lasko, P. *Annual Review of Genetics* **35**, 365-406 (2001).
3. King, M., Messitt, T. & Mowry, K. *Biol Cell*. **97**, 19-33 (2005).
4. Kislauskis, E.H., Singer, R.H. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **4**, 975-978. (1992).
5. St Johnston, D. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 363-375 (2005).
6. Huttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Lorenz, M., Dichtenberg, J., Meng, X., Bassell, G. J., Condeelis, J., Singer, R. H., . *Nature* (2005).
7. Lawrence, J.B., Singer, R.H. *Cell* **45**, 407-415 (1986).
8. Tiruchinapalli, D.M. et al. *J. Neurosci.* **23**, 3251-3261 (2003).
9. Eom, T., Antar, L.N., Singer, R.H. & Bassell, G.J. *J. Neurosci.* **23**, 10433-10444 (2003).
10. Kislauskis, E.H., Zhu, X., Singer, R.H. *J. Cell Biol.* **127**, 441-451. (1994).
11. Ross, A., Oleynikov, Y., Kislauskis, E., Taneja, K. & Singer, R. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2158-2165 (1997).
12. Zhang, H.L., Eom T, Oleynikov Y, Shenoy SM, Liebelt DA, Dichtenberg JB, Singer RH, Bassell GJ. *Neuron* **31**, 261-275 (2001).
13. Oleynikov, Y. & Singer, R.H. *Current Biology* **13**, 199-207 (2003).
14. Thomas, S.M. & Brugge, J.S. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **13**, 513-609 (1997).
15. Ostareck-Lederer, A. et al. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 4535-4543 (2002).
16. Kislauskis, E.H., Zhu, X.-c. & Singer, R.H. *J. Cell Biol.* **136**, 1263-1270 (1997).
17. Shestakova, E.A., Singer, R.H. & Condeelis, J. *PNAS* **98**, 7045-7050 (2001).
18. Martinez-Quiles, N., Ho, H.-Y.H., Kirschner, M.W., Ramesh, N. & Geha, R.S. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 5269-5280 (2004).
19. Kinley, A. et al. *Curr Biol.* **13**, 384-93 (2003).
20. Lua, B. & Low, B. *FEBS Lett.* **579**, 577-85 (2005).
21. DesGroseillers, L., Sossin, W. *personnal communication*.

FIGURE LEGEND

Figure 36: Model for ZBP1-dependent β -actin mRNA localization and translational control. A) ZBP1 is imported into the nucleus (1) where it recruits nascent β -actin mRNA at its site of transcription (2). The resulting complex is exported to the cytoplasm (3) and assembled into a ribonucleoprotein complex (RNP) with molecular motors (4). The RNP is then transported along the cytoskeleton to the leading edge of the cell (5) where Src phosphorylation of ZBP1 promotes complex disassembly and triggers β -actin mRNA translation (6). ZBP1 is then recycled and transported back to the nucleus (7).

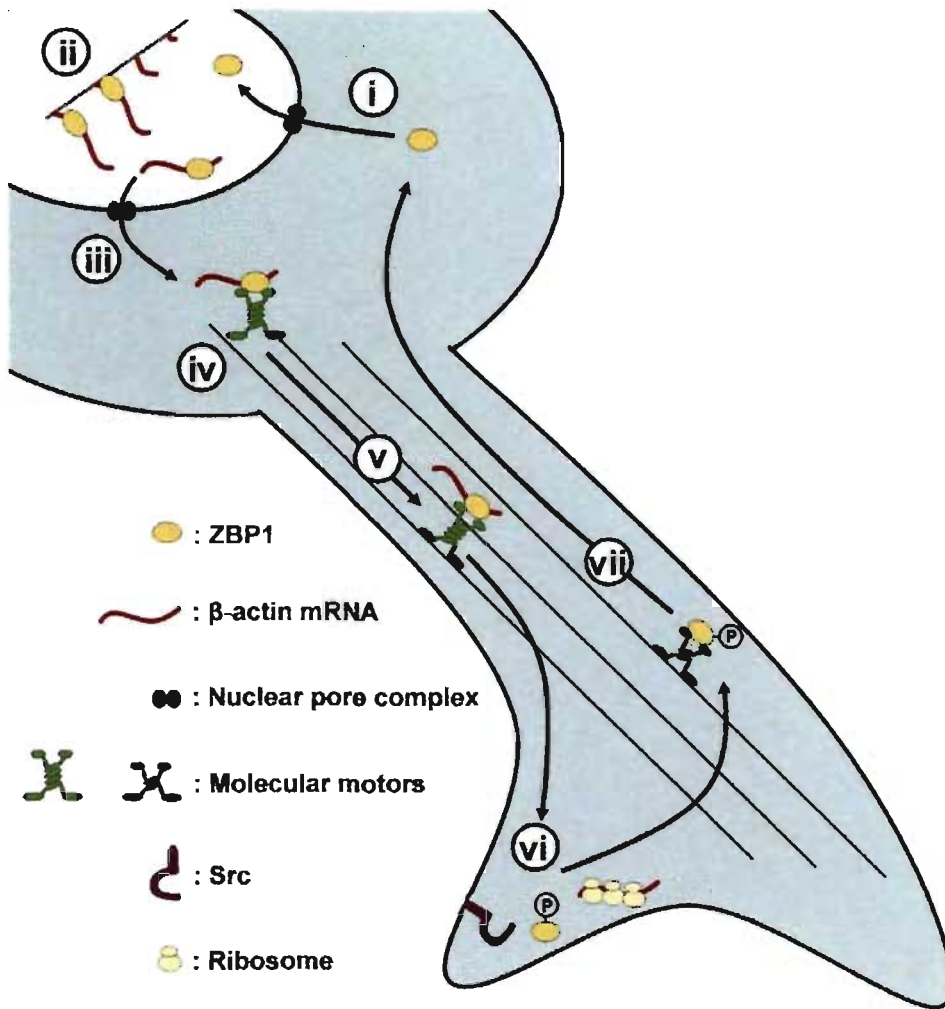


Figure 36: Model for ZBP1-dependent β -actin mRNA localization and translational control

ANNEXE 2: Local Regulation of mRNA translation: new insights from the bud

Article publié dans le journal scientifique *Trends in Cell Biology* (2008) 18 (3) : 105-111

Avec la permission de Elsevier Ltd.

© 2008 Elsevier Ltd

**Local Regulation of mRNA translation:
new insights from the bud.**

Nicolas Paquin and Pascal Chartrand

Département de Biochimie, Université de Montréal
Montréal, Québec, H3C 3J7 Canada

Corresponding Author:

[REDACTED]

ABSTRACT

Active mRNA transport and localization is an efficient way for cells to regulate the site and time of expression of specific proteins. Recent publications identified factors involved in the sorting and translational regulation of bud-localized transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*, and uncovered an interplay between mRNA trafficking, translational regulation and ER inheritance. mRNA localization at the bud tip of yeast cells depends on the She2p-She3p-Myo4p complex. In order to avoid any ectopic expression, translation of the bud-localized *ASH1* mRNA is repressed by the translational repressors Puf6p and Khd1p during its transport. As this complex reaches the bud tip, phosphorylation of Khd1p by the membrane-associated kinase Yck1p activates the local translation of this transcript, thereby defining a fine-tuning mechanism of Ash1p expression.

INTRODUCTION

Post-transcriptional mechanisms regulating protein synthesis permit a finer tuning of the expression of specific proteins. One such mechanism is mRNA trafficking and directed transport. mRNA localization is involved in several biological processes which occur in diverse species, from the budding yeast to vertebrates. Directed mRNA transport is crucial during the development of metazoans such as *Drosophila* and *Xenopus*; especially in axis determination and asymmetric cell division, and in the synaptic plasticity of neurons in vertebrates. For instance, localization of a transcript like the β -actin mRNA has been linked to cell motility and neuronal growth in cultured fibroblasts and neurons [1]. Several mechanisms of mRNA localization have been identified, some are based on the active transport of the mRNA by molecular motors moving on the cell cytoskeleton, others rely on the passive diffusion of a mRNA and its anchoring at a specific location, or on selective degradation of the mRNA [1]. Transcripts that are actively sorted through a localization pathway contain specific localization elements, or “zipcodes”, usually found in their 3’ or 5’ untranslated regions (UTR). These zipcodes are recognized by RNA-binding proteins that recruit a localization machinery responsible for the sorting of these transcripts. Many localized mRNAs undergo translational repression during their transport in order to avoid ectopic expression of the proteins. The translation of a localized transcript gets activated only when it reaches its destination, so that the expression of the resulting protein can remain spatially restricted.

Recent advances in our understanding of the mechanisms of mRNA transport and localization are now linking mRNA localization to endoplasmic reticulum (ER) transport and vesicle sorting. Indeed, the final steps of *bicoid* mRNA localization at the anterior pole of *Drosophila* eggs depend on the ESCRT-II endosomal sorting complex [2]. In yeast, there are mounting evidence of a co-transport of localized mRNAs and ER to the bud tip [3, 4]. Furthermore, while several factors involved in translational repression of these localized mRNAs have been identified in various organisms, their mechanisms of action are now beginning to be unravelled, together with the mechanisms leading to the local activation of the translation of localized mRNAs upon reaching their destination [5, 6].

In this review, we focus on these new findings from the perspective of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which has a well-characterized mRNA localization pathway. We highlight recent advances in the mechanism of mRNA localization to the bud tip of yeast, and its role in the local expression of proteins. We specifically discuss the emerging interplay between the mechanisms of mRNA transport and ER inheritance in the bud. We also present new insights on the translational regulation of bud-localized transcripts in yeast and on the role of a membrane-associated kinase in the local activation of mRNA translation. Given the conservation of components of the ER, vesicle transport, and translation machinery, it is likely that many of these mechanisms are used by localized mRNAs in other species.

mRNA transport and localization in the budding yeast

Over 30 transcripts have been shown to undergo active transport to the bud of yeast cells [4, 7] and 27 others were recently found to be associated with She2p [8]. While these mRNAs code for proteins that are ultimately sorted to different parts of the cell, like the plasma membrane, mitochondria, ER, cytoplasm, or nucleus [4, 7], the implication of the bud-localization of these transcripts in the sorting and function of their proteins have been explored for only a few of these mRNAs. The localization of the *ASH1* mRNA (for Asymmetric Synthesis of HO) to the bud tip during late anaphase is probably the best characterized example of mRNA trafficking in yeast [9]. Through the localization of its transcript, the Ash1 protein is exclusively sorted to the daughter cell nucleus where it acts as a transcriptional repressor of the *HO* endonuclease, thus inhibiting mating type switching in the daughter cell [10, 11]. The *ASH1* mRNA is localized to the bud tip through four localization elements: E1, E2A, E2B, and E3 [12, 13]. The first three localization elements

are present within the coding sequence of the transcript, and E3 overlaps the coding sequence and the 3'UTR. While each element is sufficient individually for proper sorting to the bud, the presence of four elements makes this process more efficient [14]. Each of these elements folds as a stem-loop structure which is recognized by the She2 protein [15-17], a RNA-binding protein forming a basic helical hairpin structure [18] that was identified in a genetic screen for mutants with altered *HO* expression [19]. The She2p-binding motif, which is present in several bud-localized mRNAs, consists of a loop-stem-loop RNA structure with a highly conserved CGA triplet in one loop and a single conserved cytosine in the other loop, both separated by a four to five base pairs stem [15, 20]. She2p binds the localization elements as a homodimer [18], and interacts with She3p, an adapter protein that bridges She2p and its mRNA cargo to the type V myosin Myo4p [16, 17, 21]. Myo4p is the molecular motor capable of moving along the actin cytoskeleton and is necessary for mRNA trafficking in yeast [10, 11]. She2p, She3p and Myo4p form a complex known as the "locosome" which is essential for the proper localization of all bud-localized transcripts [7, 9].

Among the bud-localized transcripts identified, several code for membrane-bound proteins [7], and transport of these mRNAs has been suggested to increase the level of these proteins at the bud. For instance, the *IST2* mRNA (for Increased Sodium Tolerance), which is also localized by the locosome, codes for a membrane-bound protein similar to sodium and calcium channels [22]. Deletion of *IST2* allows the cells to grow in the presence of high sodium concentrations [23]. Its transcript is localized at the bud tip, like the *ASH1* mRNA, through at least one localization element present at the end of the coding sequence [15]. Disruption of *SHE2* abolishes the presence of Ist2p in the daughter cell [22, 24]. However, the Ist2 protein is not exclusively sorted to the daughter cell since the mother cell also harbours membrane-bound Ist2p [22].

The endoplasmic reticulum couples mRNA trafficking and local translation

As mentioned above, several localized mRNAs code for membrane-bound proteins [7]. Hence, these proteins have to undergo translocation to the ER upon translation in order to be properly sorted through the secretory pathway [25]. Since the free diffusion of plasma membrane proteins between the mother cell and the bud is inhibited by the septin ring at the bud neck, local expression of these proteins in the bud, via mRNA localization at the bud tip, is a mechanism that allows to bypass this barrier [22]. This suggests that

coordination of mRNA trafficking and ER inheritance at the bud could play an important role in targeting newly synthesized proteins to the daughter cell plasma membrane.

Two distinct populations of ER are present in yeast cells: the perinuclear ER, which surrounds the nucleus, and the cortical ER (also termed peripheral ER), which usually stands just beneath the plasma membrane [26]. In yeast as in several other species, type V myosin participates in the trafficking of ER vesicles via the actin filaments [27]. In *S. cerevisiae*, only two type V myosin motors are present: Myo2p and Myo4p. Upon cell division, Myo2p transports organelles such as the vacuole, parts of the Golgi, and the peroxisome, to the daughter cell; whereas Myo4p is involved in mRNA trafficking through its association with She3p and She2p [28]. Previous efforts to find mutants impaired for cortical ER transport to the bud have identified the She3p-Myo4p complex as key components of this localization machinery, but not of other organelle transport [29]. While both She3p and Myo4p cosediment with the ER in a sucrose gradient, ER transport to the daughter cell was thought to be independent from mRNA localization since deletion of *SHE2* did not affect ER sorting [29]. However, recent experiments have revealed that not only does She2p associate with cortical ER independently of polysomes and the She3p-Myo4p complex, but that mRNA trafficking is tightly linked to ER transport [3]. Further evidence of this comes from a large scale array for membrane-associated mRNAs which revealed that the bud-localized *ASH1* mRNA is enriched within membranes fractions, although it codes for a nuclear transcription repressor [30]. However, it is still unknown how the She2p-She3p-Myo4p complex associates with the ER.

Electron microscopy imaging of yeast cells indicates that the cortical ER is associated with ribosomes [31], it therefore represents a pool of ribosomes available for the local translation of bud-localized mRNAs. This suggests that the coordination of mRNA localization and cortical ER inheritance may represent a convenient mechanism to locally produce membrane-bound proteins (Figure 37) [3]. Furthermore, mutants of the late secretory pathway have been found to disrupt the proper localization of *ASH1* mRNA, probably through remodelling of the actin cytoskeleton [32]. Interestingly, the transcripts of these genes are also bud-localized in a She2p-dependent manner [4]. Thus, the transcripts of factors required for the proper sorting of localized mRNAs and exocytosis are actively localized themselves in coordination with cortical ER. This is very similar to what occurs in vertebrates, where the transcripts coding for actin remodelling factors are localized to the leading edge of fibroblasts along with the β -actin mRNA [33].

The importance of translation in mRNA anchoring at the bud tip and in protein sorting

A unique feature of bud-localized transcripts in yeast is that their localization elements are present within their coding sequences, contrary to most localized mRNAs in metazoans (*Drosophila*, *Xenopus*, vertebrate) which commonly contain localization motifs in their UTRs [7, 12, 13, 34]. This peculiarity of yeast raises questions about the link between mRNA transport and translation, and how these two processes interact. The emerging picture is that these two processes require each other: while translation is required for proper anchoring of the localized mRNA at the bud tip, the localization elements affect the translation of localized mRNAs.

Several groups have shown that the translation of the *ASH1* mRNA or translation in general affects the localization of this transcript. This is in line with earlier work which showed that the introduction of a stop codon next to the AUG codon of the *ASH1* mRNA results in impaired mRNA anchoring at the bud [13], while a different study obtained similar results using an allele lacking a start codon [35]. Furthermore, deletion of specific ribosomal proteins or of Loc1p, an *ASH1* mRNA-binding protein involved in 60S ribosomal subunit maturation, leads to improperly localized *ASH1* mRNA [36-38]. Hence, translation of the *ASH1* mRNA and maybe general translation is required for its proper localization. Whether this is due to neo-synthesized Ash1p or translating ribosomes playing a role in anchoring transcripts at the bud tip is currently unclear. While the remodelling of the She2p-She3p-Myo4p complex is important for proper anchoring of the *ASH1* mRNA [39], the role of translation in this remodelling is not yet known.

In addition to their crucial role in mRNA transport, the four *ASH1* mRNA localization elements participate in the translational regulation of *ASH1* mRNA. Previous work showed that transposition of the four localization elements to the 3'UTR of the *ASH1* mRNA still maintained the proper localization of the mRNA, but resulted in a decreased asymmetric distribution of Ash1p [14]. Disruption of the structure of the localization elements results in increased Ash1p expression levels in a She2p-independent manner [14]. Addition of a stem-loop structure in the 5'UTR of the mutant mRNA (to decrease its rate of translation) restored a normal phenotype, indicating that the translation rate of the *ASH1* mRNA affects the distribution of Ash1p, probably due to premature expression of the protein during localization of the mutant transcript [14]. These results suggest that the

presence of the localization elements within the coding sequence of the *ASH1* mRNA interferes in some way with translation.

Translational regulation of *ASH1* mRNA by Puf6p and Khd1p

Proteins that bind these localization elements are not only involved in the transport of the transcript to the bud tip, but also regulate the translation of the *ASH1* mRNA. Earlier work used affinity precipitation to identify a new protein, called Puf6p, involved in the regulation of the *ASH1* mRNA [40]. This protein, which is part of the PUF family similar to the *Drosophila* RNA-binding protein Pumilio, acts as a translational repressor of *ASH1* mRNA. Puf6p binds to a conserved UUGU motif present within the localization element E3. This motif is present in several She2p-localized transcripts, including the *IST2* mRNA [40]. Whether or not Puf6p regulates the translation of these other localized mRNAs still has to be verified. Puf6p is mostly nuclear, though a fraction of it colocalizes at the bud tip with the *ASH1* mRNA. A *PUF6* deleted strain results in decreased asymmetric distribution of Ash1p and harbours a slight defect in mRNA localization to the bud tip [40]. The introduction of a stem-loop in the 5'UTR of the *ASH1* mRNA rescues the deletion of *PUF6*, thus indicating that Puf6p participates in the regulation of the translation of the *ASH1* mRNA. Indeed, both *in vivo* and *in vitro*, the presence of Puf6p reduces the level of expression of Ash1p [40]. Interestingly, *PUF6* has recently been shown to play a role in 60S ribosomal subunit biogenesis [41], a feature very similar to the role of Loc1p, another *ASH1* mRNA-binding protein. While the link between mRNA localization and ribosome biogenesis remains elusive, it is possible that these two processes are coordinated.

Previous work assessing the effects of several RNA-binding proteins on the *ASH1* mRNA led to the identification of Khd1p as an *ASH1* mRNA associated protein [35]. Khd1p contains three KH domains (for hnRNP K homology) and binds with high affinity to single stranded C or U-rich RNA *in vitro* [42]. Evidence of the involvement of Khd1p in the translational regulation of the *ASH1* mRNA came from its overexpression, which resulted in decreased Ash1p synthesis [35]. Also, the fact that Khd1p did not associate with all four localization elements suggested that it has a role distinct from the locosome. A genetic assay that assesses *HO* expression showed that overexpression of Khd1p antagonizes the decreased *HO* expression induced by deletion of *SHE3* or *MYO4* [35]. Recent work reports that deletion of *KHD1* results in an increased Ash1p expression and that the regulation of the translation of *ASH1* mRNA through Khd1p depends on its

interaction with the localization element E1 [6]. Furthermore, Khd1p acts by decreasing the ribosome load on the *ASH1* transcript, leading to lower expression levels. Large scale affinity precipitation assays have identified several translation initiation factors, including eIF4G1, eIF4G2, eIF4E, and PABP, as Khd1p-associated proteins [43, 44]. Among these factors, Khd1p was found to bind directly to the C-terminal domain of eIF4G1 [6]. This domain of eIF4G1, known to bind RNA [45], has been shown to be required for the regulation of Ash1p expression *in vivo* [6]. Although the deletion of *KHDI* has been reported to have either a small [35] or no significant effect [6] on the localization of the *ASH1* mRNA, results consistently show that Khd1p affects the asymmetric distribution of Ash1p.

A question that emerges from these results is why is there so much control of the translation of *ASH1* mRNA? Since experimental evidence show that defective translational regulation of the *ASH1* mRNA results in a decreased asymmetric distribution of Ash1p, a model has been suggested where premature translation of this transcript on its way to the bud tip leads to the leakage of Ash1p into the mother cell, before cytokinesis (Figure 38) [14]. Perhaps the need for Puf6p, Khd1p and the distribution of the localization elements in the coding sequence results in a tighter regulation of the expression of Ash1p by inhibiting different steps of *ASH1* mRNA translation [6]. Multiple levels of translational regulation on the same mRNA is not uncommon, as it has been reported in *Drosophila* [46]. Hence, it will be very interesting to assess the interplay between the two translational regulators.

Translational activation of localized mRNAs by the membrane-associated kinase Yck1p

A question that is starting to be investigated in this field is the mechanism behind the translational activation of localized mRNAs upon reaching their destination. One mechanism was found in neurons, where the protein ZBP1 is responsible for the translational regulation of the β -actin mRNA and its localization to the growth cone of neurons, where it promotes neurite outgrowth [5]. ZBP1, a KH domain protein, is in turn phosphorylated by the membrane-bound tyrosine kinase Src, which triggers the release of the transcript and its local translational activation (Figure 39A) [5]. Interestingly, recent work has identified a similar mechanism of local translational activation for the *ASH1* mRNA via phosphorylation of Khd1p [6]. Khd1p was identified as a substrate for Yck1p, a yeast homologue of the type I casein kinase (CK1) anchored at the plasma membrane, in a

large scale *in vitro* phosphorylation assay, and has since been confirmed as a direct *in vivo* target [6, 47]. Phosphorylation of Khd1p by CK1 reduces its RNA-binding affinity *in vitro*. Deletion of *YCK1* decreases the expression levels of an Ash1-luciferase reporter, while a co-deletion with *KHDI* antagonizes this effect. In addition, a mutant form of Khd1p that can no longer be phosphorylated by Yck1p mimics the effect of a *YCK1* knockout on the expression of an Ash1-luciferase reporter *in vivo* [6]. These results suggest that upon phosphorylation by Yck1p, Khd1p releases its translational repression of the *ASH1* mRNA, which triggers the local expression of Ash1p (Figure 39B). A split-Venus fluorescent protein complementation assay showed that Khd1p and Yck1p only interact at the cell periphery, indicating that the Khd1p-Yck1p complex determines the time and site of local activation of the translation of *ASH1* mRNA [6]. The fact that Khd1p and Yck1p interact all over the cell periphery and not only at the bud tip, where the *ASH1* mRNA is localized suggests that this interaction might also regulate the translation of transcripts, other than *ASH1*, bound by Khd1p [48].

In yeast, the casein kinases Yck1p and Yck2p act on several processes occurring at the plasma membrane. These kinases are involved in morphogenesis, polarized growth, and septin organization [49]. Moreover, Yck1/2p also regulate the sensing of several external and internal signals: glucose and uracil uptake, cell detoxification mechanisms, and the signal from the mating pheromones [50-54]. This gives rise to the possibility that extra- or intracellular signals may inform the cell of where transcripts should be translated. Since most localized mRNAs are transported close to the plasma membrane or organelles, this suggests that membrane-bound kinases may play an important role in the regulation of the translation of localized transcripts.

CONCLUDING REMARKS

Recent progress in the field of mRNA trafficking and translation regulation started to shed light on the mechanisms responsible for the repression and local activation of the translation of localized transcripts. In yeast, Puf6p and Khd1p, two RNA-binding proteins that repress the translation of the *ASH1* mRNA [6, 35, 40], are most likely part of a general complex involved in the modulation of the expression of localized mRNAs. The specific mechanisms of action and the implication of these two translational regulators in the regulation of other localized transcripts still have to be explored. Furthermore, the activation of the translation of localized mRNAs by membrane-bound kinases, which

determines the site and time of protein expression, suggests the possibility of a modulation of mRNA localization and translation regulation by extracellular signals. This process could be a key component of the integration of cellular information. New evidence of coordination between mRNA transport and cortical ER inheritance show that these trafficking pathways are coregulated in order to achieve proper protein sorting. These new perspectives will surely stimulate research on directed mRNA transport and translation regulation in addition to give a broader view of the interplay between these complementary biological processes.

ACKNOWLEDGMENTS

This work is supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). P.C is supported by a fellowship from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). We thank Emmanuelle Querido and Anne-Laure Finoux for their advice on the manuscript.

REFERENCES

1. St Johnston, D., (2005) Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6. 363-375.
2. Irion, U., and St Johnston, D., (2007) bicoid RNA localization requires specific binding of an endosomal sorting complex. *Nature*. 445. 554-558.
3. Schmid, M., *et al.*, (2006) Coordination of Endoplasmic Reticulum and mRNA Localization to the Yeast Bud. *Current Biology*. 16. 1538-1543.
4. Aronov, S., *et al.*, (2007) mRNAs Encoding Polarity and Exocytosis Factors Are Cotransported with the Cortical Endoplasmic Reticulum to the Incipient Bud in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 27. 3441-3455.
5. Huttelmaier, S., *et al.*, (2005) Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature*. 438. 512-515.
6. Paquin, N., *et al.*, (2007) Local Activation of Yeast ASH1 mRNA Translation through Phosphorylation of Khd1p by the Casein Kinase Yck1p. *Molecular Cell*. 26. 795-809.
7. Shepard, K.A., *et al.*, (2003) Widespread cytoplasmic mRNA transport in yeast: Identification of 22 bud-localized transcripts using DNA microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100. 11429-11434.

8. Oeffinger, M., *et al.*, (2007) Comprehensive analysis of diverse ribonucleoprotein complexes. *Nat Meth.* 4. 951-956.
9. Chartrand, P., *et al.*, (2001) RNP Localization and Transport in Yeast. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 17. 297-310.
10. Long, R.M., *et al.*, (1997) Mating Type Switching in Yeast Controlled by Asymmetric Localization of ASH1 mRNA. *Science.* 277. 383-387.
11. Takizawa, P.A., *et al.*, (1997) Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast. *Nature.* 389. 90-93.
12. Chartrand, P., *et al.*, (1999) Structural elements required for the localization of ASH1 mRNA and of a green fluorescent protein reporter particle in vivo. *Current Biology.* 9. 333-338.
13. Gonzalez, I., *et al.*, (1999) ASH1 mRNA localization in yeast involves multiple secondary structural elements and Ash1 protein translation. *Current Biology.* 9. 337-340.
14. Chartrand, P., *et al.*, (2002) Asymmetric Sorting of Ash1p in Yeast Results from Inhibition of Translation by Localization Elements in the mRNA. *Molecular Cell.* 10. 1319-1330.
15. Olivier, C., *et al.*, (2005) Identification of a Conserved RNA Motif Essential for She2p Recognition and mRNA Localization to the Yeast Bud. *Mol. Cell. Biol.* 25. 4752-4766.
16. Bohl, F., *et al.*, (2000) She2p, a novel RNA-binding protein tethers ASH1 mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p. *Embo J.* 19. 5514-5524.
17. Long, R.M., *et al.*, (2000) She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to ASH1 mRNA. *Embo J.* 19. 6592-6601.
18. Niessing, D., *et al.*, (2004) She2p Is a Novel RNA Binding Protein with a Basic Helical Hairpin Motif. *Cell.* 119. 491-502.
19. Jansen, R.-P., *et al.*, (1996) Mother Cell-Specific HO Expression in Budding Yeast Depends on the Unconventional Myosin Myo4p and Other Cytoplasmic Proteins. *Cell.* 84. 687-697.
20. Jambhekar, A., *et al.*, (2005) Unbiased selection of localization elements reveals cis-acting determinants of mRNA bud localization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 102. 18005-18010.

21. Takizawa, P.A., and Vale, R.D., (2000) The myosin motor, Myo4p, binds Ash1 mRNA via the adapter protein, She3p. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97. 5273-5278.
22. Takizawa, P.A., *et al.*, (2000) Plasma Membrane Compartmentalization in Yeast by Messenger RNA Transport and a Septin Diffusion Barrier. *Science*. 290. 341-344.
23. Entian, K.D., *et al.*, (1999) Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol Gen Genet*. 262. 683-702.
24. Juschke, C., *et al.*, (2004) A Novel Transport Pathway for a Yeast Plasma Membrane Protein Encoded by a Localized mRNA. *Current Biology*. 14. 406-411.
25. van Vliet, C., *et al.*, (2003) Intracellular sorting and transport of proteins. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 83. 1-45.
26. Preuss, D., *et al.*, (1991) Structure of the yeast endoplasmic reticulum: localization of ER proteins using immunofluorescence and immunoelectron microscopy. *Yeast*. 7. 891-911.
27. Estrada de Martin, P., Novick, P., Ferro-Novick, S., (2005) The organization, structure, and inheritance of the ER in higher and lower eukaryotes. *Biochem Cell Biol*. 83. 752-761.
28. Pruyne, D., *et al.*, (2004) Mechanisms of Polarized Growth and Organelle Segregation in Yeast. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 20. 559-591.
29. Estrada, P., *et al.*, (2003) Myo4p and She3p are required for cortical ER inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol*. 163. 1255-1266.
30. Diehn, M., *et al.*, (2000) Large-scale identification of secreted and membrane-associated gene products using DNA microarrays. *Nat Genet*. 25. 58-62.
31. Misuzu, B., and Masako, O., (1987) Transmission and scanning electron microscopic examination of intracellular organelles in freeze-substituted *Kloeckera* and *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Cells. *Journal of Electron Microscopy Technique*. 5. 249-261.
32. Aronov, S., and Gerst, J.E., (2004) Involvement of the Late Secretory Pathway in Actin Regulation and mRNA Transport in Yeast. *J. Biol. Chem*. 279. 36962-36971.
33. Mingle, L.A., *et al.*, (2005) Localization of all seven messenger RNAs for the actin-polymerization nucleator Arp2/3 complex in the protrusions of fibroblasts. *J Cell Sci*. 118. 2425-2433.

34. Jambhekar, A., and DeRisi, J.L., (2007) Cis-acting determinants of asymmetric, cytoplasmic RNA transport. *RNA*. 13. 625-642.
35. Irie, K., *et al.*, (2002) The Khd1 protein, which has three KH RNA-binding motifs, is required for proper localization of ASH1 mRNA in yeast. *Embo J*. 21. 1158-1167.
36. Komili, S., *et al.*, (2007) Functional Specificity among Ribosomal Proteins Regulates Gene Expression. *Cell*. 131. 557-571.
37. Long, R.M., *et al.*, (2001) An Exclusively Nuclear RNA-binding Protein Affects Asymmetric Localization of ASH1 mRNA and Ash1p in Yeast. *J. Cell Biol*. 153. 307-318.
38. Urbinati, C.R., *et al.*, (2006) Loc1p is required for efficient assembly and nuclear export of the 60S ribosomal subunit. *Mol Genet Genomics*. 276. 369-377.
39. Gonsalvez, G.B., *et al.*, (2004) ASH1 mRNA Anchoring Requires Reorganization of the Myo4p-She3p-She2p Transport Complex. *J. Biol. Chem*. 279. 46286-46294.
40. Gu, W., *et al.*, (2004) A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses ASH1 mRNA translation and is required for its localization. *Genes Dev*. 18. 1452-1465.
41. Lee, I., (2007) An Improved, Bias-Reduced Probabilistic Functional Gene Network of Baker's Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*. 2. e988.
42. Denisenko, O., and Bomsztyk, K., (2002) Yeast hnRNP K-Like Genes Are Involved in Regulation of the Telomeric Position Effect and Telomere Length. *Mol. Cell. Biol*. 22. 286-297.
43. Gavin, A.C., *et al.*, (2006) Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature*. 440. 631-636.
44. Gavin, A.C., *et al.*, (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*. 415. 141-147.
45. Berset, C., *et al.*, (2003) RNA-binding activity of translation initiation factor eIF4G1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*. 9. 871-880.
46. Vardy, L., and Orr-Weaver, T.L., (2007) Regulating translation of maternal messages: multiple repression mechanisms. *Trends in Cell Biology*. 17. 547-554.
47. Ptacek, J., *et al.*, (2005) Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature*. 438. 679-684.
48. Gerber, A.P., Herschlag, D., Brown, P.O., (2004) Extensive Association of Functionally and Cytotopically Related mRNAs with Puf Family RNA-Binding Proteins in Yeast. *PLoS Biology*. 2. 342-354.

49. Robinson, L.C., *et al.*, (1999) The Yck2 Yeast Casein Kinase I Isoform Shows Cell Cycle-specific Localization to Sites of Polarized Growth and Is Required for Proper Septin Organization. *Mol. Biol. Cell.* 10. 1077-1092.
50. Decottignies, A., *et al.*, (1999) Casein Kinase I-dependent Phosphorylation and Stability of the Yeast Multidrug Transporter Pdr5p. *J. Biol. Chem.* 274. 37139-37146.
51. Marchal, C., *et al.*, (2000) Casein Kinase I-dependent Phosphorylation within a PEST Sequence and Ubiquitination at Nearby Lysines Signal Endocytosis of Yeast Uracil Permease. *J. Biol. Chem.* 275. 23608-23614.
52. Moriya, H., and Johnston, M., (2004) Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 101. 1572-1577.
53. Feng, Y., and Davis, N.G., (2000) Akr1p and the Type I Casein Kinases Act prior to the Ubiquitination Step of Yeast Endocytosis: Akr1p Is Required for Kinase Localization to the Plasma Membrane. *Mol. Cell. Biol.* 20. 5350-5359.
54. Hicke, L., *et al.*, (1998) Cytoplasmic Tail Phosphorylation of the alpha -Factor Receptor Is Required for Its Ubiquitination and Internalization. *J. Cell Biol.* 141. 349-358.
55. Oleynikov, Y., and Singer, R.H., (2003) Real-Time Visualization of ZBP1 Association with [beta]-Actin mRNA during Transcription and Localization. *Current Biology.* 13. 199-207.
56. Paquin, N., and Chartrand, P., (2005) Knowing when to let go. *Nat Struct Mol Biol.* 12. 1026-1027.

FIGURE LEGENDS

Figure 37: mRNA localization and cortical ER inheritance. mRNAs are localized through the She2p-She3p-Myo4p complex along the actin cytoskeleton (1) and in coordination with cortical ER inheritance (2). Proteins translated in association with the ER can be sorted to the plasma membrane through different secretion pathways: either directly from the ER, like Ist2p (3), or via the Golgi and the late secretory vesicles (4). Cortical ER transport is also mediated by the She3p-Myo4p complex (5) which results in the creation of a pool of localized ribosomes available for local translation (6). Upon reaching the bud-tip, localized mRNAs are anchored and locally translated (7).

Figure 38: Translational regulation of the *ASH1* mRNA allows the asymmetric segregation of Ash1p. **A)** The translation of the *ASH1* mRNA is repressed during transport, which leads to Ash1p being present only in the daughter cell nucleus. **B)** In mutated strains that harbour an increased Ash1p expression, premature expression leads to the leakage of Ash1p to the mother cell and in a symmetric distribution of this factor.

Figure 39: Comparative models for the local activation of mRNA translation by membrane-associated kinases in yeast and mammals. **A)** Translational activation of β -actin mRNA via phosphorylation of ZBP1 by the Src kinase in mammals [5]. ZBP1 is imported into the nucleus (1) where it recruits nascent β -actin mRNA at its site of transcription [55] (2). The resulting complex is exported to the cytoplasm (3) and assembled into a translationally-repressed ribonucleoprotein complex (RNP) with molecular motors (4). The RNP is then transported along the cytoskeleton to the leading edge of the cell (5) where Src phosphorylation of ZBP1 promotes complex disassembly and triggers β -actin mRNA translation (6). **B)** Translational activation of *ASH1* mRNA via phosphorylation of Khd1p by the Yck1p kinase in yeast [6]. The *ASH1* mRNA is recruited by the Khd1p-eIF4G1 complex, which represses its translation (1), and associates with the localization machinery (2). The resulting RNP complex moves towards the bud via the actin cytoskeleton (3). Upon reaching the bud, Khd1p is phosphorylated by the membrane-anchored Yck1p (4) which leads to the local activation of *ASH1* mRNA translation (5). Figures were modified from [56] and [6].

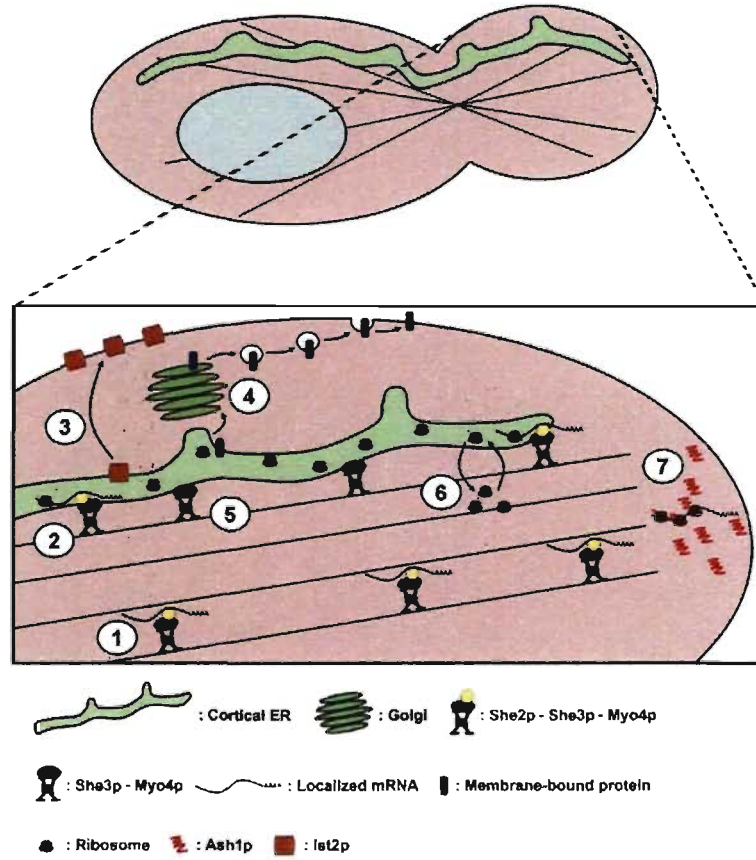


Figure 37: mRNA localization and cortical ER inheritance

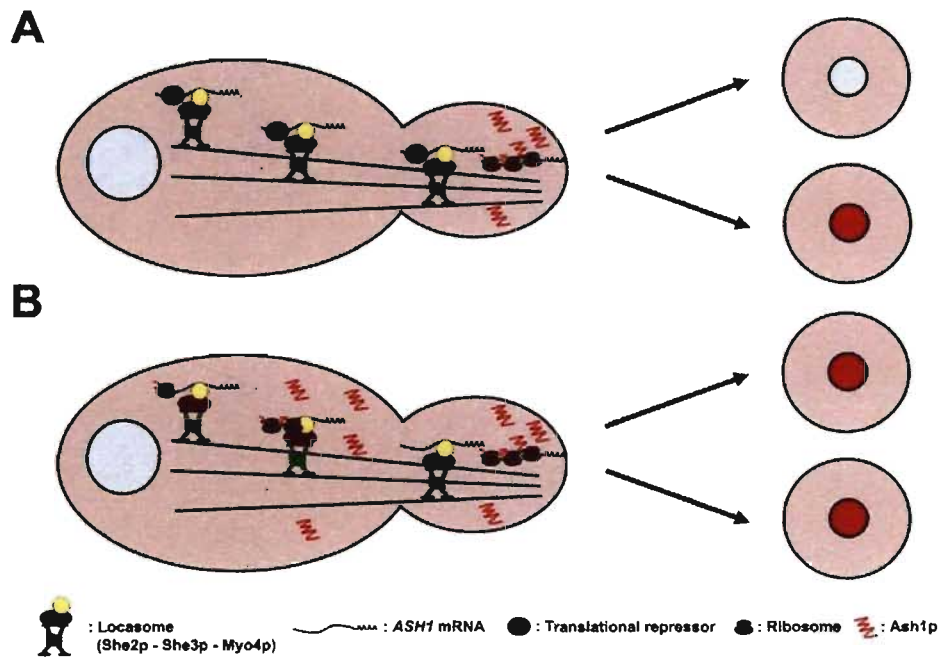


Figure 38: Translational regulation of the *ASH1* mRNA allows the asymmetric segregation of Ash1p

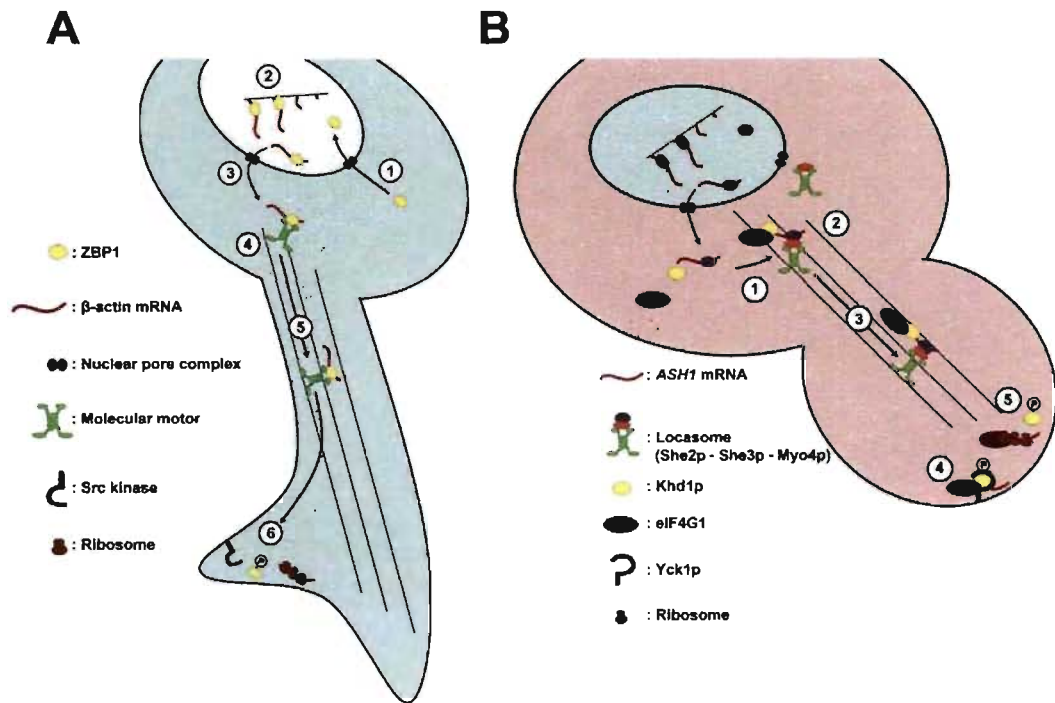


Figure 39: Comparative models for the local activation of mRNA translation by membrane-associated kinases in yeast and mammals