

Université de Montréal

**Identification des ARNm liés par les protéines Staufen de
mammifères et caractérisation des déterminants
structuraux à la base de l'interaction**

par
Luc Furic

Département de biochimie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de *Philosophiæ Doctor*
en biochimie

Novembre, 2006

© Luc Furic, 2006



W
4
U58
2007
v.041

AVIS

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

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
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Identification des ARNm liés par les protéines Staufen de mammifères et caractérisation
des déterminants structuraux à la base de l'interaction

présentée par :

Luc Furic

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Pascal Chartrand, président-rapporteur
Dr Luc DesGroseillers, directeur de recherche
Dre Léa Brakier-Gingras, membre du jury
Dr Sherif Abou Elela, examinateur externe
Dre Audrey Claing, représentant du doyen de la FES

Résumé

Le contrôle post-transcriptionnel de l'expression génétique s'effectue, en partie, par l'association aux ARNm de diverses protéines de la famille des protéines liant l'ARN. La protéine Staufen de la drosophile, une protéine liant l'ARN en double brins, est impliquée dans l'établissement des axes embryonnaires lors du développement. Staufen joue un rôle dans la localisation intracellulaire des ARNm bicoid et oskar aux pôles antérieur et postérieur de l'ovocyte, respectivement. De plus Staufen est nécessaire pour la dérépression traductionnelle du transcrit oskar. Deux orthologues de Staufen existent chez les mammifères, soit Stau1 et Stau2. Au moment d'entreprendre les travaux présentés dans cette thèse, aucun ligand endogène de Stau1 ou Stau2 n'était connu. Par une approche d'immunoprécipitation couplée à l'utilisation de micropuces d'ADN, nous avons identifié plusieurs ARNm associés à Stau1 et Stau2 dans des cellules humaines 293T. Les sous-populations d'ARNm enrichies avec ces protéines sont majoritairement distinctes, mais un certain chevauchement existe.

Un de ces ARNm, Arf1, est lié par Stau1 dans sa région 3'UTR. Concomitamment à l'étude des déterminants structuraux responsables de l'association de Stau1 au transcrit Arf1, nous avons identifié l'hélicase d'ARN Upf1 comme étant un partenaire protéique de Stau1. Upf1 est un facteur qui, lorsqu'il est recruté sur un ARNm en aval d'un codon de terminaison, entraîne la dégradation du transcrit. Nous avons par la suite montré que le recrutement de Stau1, en association avec Upf1, sur un ARNm, en aval d'un codon de

terminaison, entraîne sa dégradation par un mécanisme similaire au « *nonsense-mediated decay* » (NMD) qui a été nommé le SMD (*Staufen-mediated decay*).

En plus de Arf1, le SMD affecte la stabilité de plusieurs autres ARNm dans les cellules HeLa, dont les ARNm de GAP43, Serpine1, IL7R et c-jun. Nous avons donc entrepris de délimiter les régions de ces transcrits liées par Stau1 afin d'identifier un motif commun d'interaction.

Pour la première fois chez les mammifères, des structures d'ARN en double brins reconnues par Staufen à l'intérieur d'ARNm endogènes ont été caractérisées. Les résultats contenus dans cette thèse pourront servir de base à de multiples études subséquentes s'intéressant à une meilleure définition des rôles cellulaires de Staufen.

Mots-clés : protéines liant l'ARN, domaine de liaison à l'ARN en double brins, dégradation de l'ARNm induite par les codons non-sens (NMD), dégradation de l'ARNm induite par Staufen (SMD), région 3' non-traduite (3'UTR), régulation post-transcriptionnelle, phosphoprotéines, contrôle traductionnel, micropuces d'ADN

Abstract

Posttranscriptional control of gene expression often involves the regulated association of different RNA-binding proteins to messenger RNAs. *Drosophila* Staufen is a double-stranded RNA-binding protein implicated in the establishment of embryonic polarity. Staufen plays a role in the intracellular localization of bicoid and oskar mRNAs at the anterior and posterior poles of the oocyte, respectively. Staufen is also involved in the translational de-repression of oskar. Two mammalian orthologs of Staufen have been identified: Stau1 and Stau2. At the beginning of the present work, there were no known targets of mammalian Staufen proteins. In order to identify mRNAs associated to Stau1 and Stau2, we used immunopurification combined with probing of DNA microarray. Globally, subpopulations of mRNA enriched with each protein are distinct, but there is a certain overlap.

One of the identified mRNA is *Arf1* and we showed that Stau1 binds to its 3'UTR. We took advantage of this newly identified RNA to study more precisely the structural requirements needed for efficient interaction of Stau1 with *Arf1* mRNA. At the same time, we discovered that Stau1 was interacting directly with the RNA helicase *Upf1*. *Upf1* is a factor involved in nonsense-mediated decay and its tethering downstream of a termination codon induces RNA decay. By studying the potential function of the interaction between Stau1 and *Upf1*, we have discovered a new RNA decay mechanism that we termed Staufen-mediated decay (SMD).

In addition to Arf1, SMD affects the stability of many HeLa cells transcripts, including GAP43, Serpine1, IL7R and c-Jun, amongst others. We then began the search of a common recognition motif responsible for Stau1 association to these mRNAs. We have successfully characterized double-stranded RNA regions of endogenous mRNAs that can bind Stau1. Results included in this thesis will be useful as basis for many subsequent studies regarding the elucidation of the cellular roles of mammalian Staufen proteins.

Keywords : RNA-binding proteins, double-stranded RNA-binding domain (dsRBD), nonsense-mediated decay (NMD), Staufen-mediated decay (SMD), 3' untranslated region (3'UTR), posttranscriptional regulation, phosphoproteins, translational control, DNA microchip

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Table des matières	vii
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xiii
Liste des abbréviations	xvi
Remerciements	xx
1 Introduction	24
1.1 Introduction générale.....	24
1.1.1 Objectifs de la thèse.....	27
1.2 Rôles cellulaires des protéines liant l'ARN en double brins.....	28
1.2.1 Transport et localisation intracellulaire de l'ARNm.....	31
1.2.2 Activation et répression traductionnelle.....	33
1.2.3 Édition par les désaminases d'adénosine.....	36
1.2.4 Multiples rôles des protéines de la famille RNase III.....	37
1.3 Spécificité d'interaction entre l'ARNdb et les dsRBD.....	40
1.3.1 Structure des dsRBD.....	41
1.3.2 Interactions protéines-ARNdb.....	43
1.4 Staufen, une protéine impliquée dans de multiples facettes du métabolisme de l'ARNm.....	46
1.4.1 Aperçu des protéines Staufen de mammifères.....	47
1.4.2 Stau ^l : un isoforme au phénotype drastique.....	50
1.4.3 Transport nucléo-cytoplasmique de Staufen.....	52
1.4.4 Staufen est associé aux ribosomes et joue un rôle dans la traduction.....	54
1.4.5 Staufen et transport dendritique d'ARNm.....	56
1.4.6 Partenaires protéiques de Stau l.....	60

1.5	Approches d'identification globale des ARNm interagissant avec les protéines liant l'ARN.....	64
1.5.1	SELEX (<i>systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>)	64
1.5.2	Co-immunoprécipitation de l'ARNm	65
1.5.3	Amplification d'ARN par positionnement d'anticorps (APRA).....	66
1.5.4	Purification de l'ARNm par affinité	67
1.6	ARNm et facteurs d'instabilité	68
1.6.1	Séquence riche en AU et polyadénylation	68
1.6.2	NMD « <i>Nonsense-mediated decay</i> »	70
1.7	Projet de recherche	73
	Résultats.....	75
2	Article 1.....	76
2.1	Mise en contexte	77
2.2	Contributions des auteurs	78
2.3	Mammalian Stauf1 Recruits Upf1 to Specific mRNA 3'UTRs so as to Elicit mRNA Decay.....	79
2.3.1	Summary	80
2.3.2	Introduction	81
2.3.3	Results	84
2.3.4	Discussion	96
2.3.5	Experimental Procedures.....	101
2.3.6	Acknowledgements	109
2.3.7	References	110
2.3.8	Figure legends	122
2.3.9	Figures.....	129
2.3.10	Supplementary Experimental Procedures.....	136
2.3.11	Supplementary References	139
2.3.12	Supplementary Figure legends	140

2.3.13	Supplementary Figures.....	145
3	Article 2.....	153
3.1	Mise en contexte	154
3.2	Contributions des auteurs	155
3.3	Staufen1-Mediated mRNA Decay Contributes Widely to the Network of Posttranscriptional Regulatory Mechanisms in Mammalian Cells	156
3.3.1	Summary	157
3.3.2	Introduction	158
3.3.3	Results	161
3.3.4	Discussion	171
3.3.5	Experimental Procedures.....	176
3.3.6	Acknowledgements	182
3.3.7	References	183
3.3.8	Figure Legends.....	188
3.3.9	Figures.....	194
3.3.10	Supplementary Tables	201
3.3.11	Supplementary Figure Legends.....	215
3.3.12	Supplementary Figures.....	216
4	Article 3.....	219
4.1	Mise en contexte	220
4.2	Contributions des auteurs.....	221
4.3	Mammalian Stau1 and Stau2 proteins associate to different subpopulations of mRNAs in human cells.	222
4.3.1	Summary	223
4.3.2	Introduction	224
4.3.3	Experimental procedures.....	226
4.3.4	Results.....	228
4.3.5	Discussion	231

4.3.6	Acknowledgements	235
4.3.7	References	235
4.3.8	Figure Legends	240
4.3.9	Figures	242
5	Discussion	247
5.1	NMD et SMD : plus qu'une lettre de différence!	248
5.1.1	Nécessité du codon non-sens	249
5.1.2	Mécanisme de dégradation	254
5.1.3	Régulation du SMD	256
5.1.4	SMD et ARNm dendritiques	259
5.2	Association de Stau1 au 3'UTR de plusieurs ARNm	260
5.2.1	Le SBS de Arf1	260
5.2.2	Le SBS de STMN3	263
5.2.3	Déterminants structuraux d'interaction	264
5.3	Régulation du métabolisme cellulaire par Stau1 et Stau2	270
	Conclusion	275
	Bibliographie	276
	Annexes	I
	Annexe 1	II
	Staufen1 est une phosphoprotéine	II
	Annexe 2	IV
	Analyse semi-quantitative de l'association de Stau1 au SBS de Arf1	IV
	Annexe 3	VII
	Analyse semi-quantitative de l'association de Stau1 au SBS de STMN3	VII

Liste des tableaux

Introduction :

Tableau I : Fonctions de diverses protéines possédant des dsRBD.	29
Tableau II : Protéines associées à Stau1-TAP	62
Tableau III: Protéines associées à Stau1-PDZ.....	63

Résultats :

Article 1 :

Supplementary Table S1. Genes that Encode Putative Stau1-binding mRNAs as Determined by Microarray Analysis.	152
---	-----

Article 2 :

Supplemental Table S1. Transcripts upregulated in human cells depleted of Stau1 in three independently performed microarray analyses.....	201
Supplemental Table S2: Transcripts downregulated in human cells depleted of Stau1 in three independently performed microarray analyses	205
Supplemental Table S3: Primer pairs used to amplify transcripts found in microarray analyses to be upregulated or downregulated in human cells after Stau1 depletion ..	209
Supplemental Table S4: Selected examples of transcripts upregulated in human cells depleted of Stau1 in three independently performed microarray analyses	210
Supplemental Table S5: Transcripts upregulated in human cells depleted of either Stau1 (three independently performed analyses in this study) or Upf1 (Mendell et al., 2004).	213
Supplemental Table S6: Transcripts upregulated in human cells depleted of Stau1 in three independently performed microarray analyses and that bind Stau1-HA3 in three (white) or two (gray) independently performed microarray analyses.....	214

Article 3 :

Table 1: Stau1 associated mRNAs displaying the highest fold enrichment over control are classified by cellular functions	244
--	-----

Table 2: mRNAs that are associated with both Stau1⁵⁵-HA (this study) and FRMP (Brown et al., 2001)246

Liste des figures

Introduction :

Figure 1 : Divers exemples de protéines à dsRBD.....	30
Figure 2 : Étapes de synthèse d'un miRNA	39
Figure 3 : Consensus en acides aminés du motif dsRBD	42
Figure 4 : Le dsRBD2 de XlrpA associé à une hélice d'ARN.....	44
Figure 5 : Organisation des différents domaines des isoformes communs de Stau1 et Stau2 de souris et d'humain en référence à Staufen de la drosophile. (TBD : domaine de liaison à la tubuline).....	48

Article 1 :

Figure 1. Human Upf1 interacts with human Staufen (Stau)1 in a yeast two-hybrid analyses, <i>in vitro</i> binding assays, and immunopurifications (IPs) of Stau1-HA ₃ from Cos cells.....	129
Figure 2. Down-regulating cellular Stau1 has no detectable effect on the EJC-dependent NMD of Gl 39Ter or GPx1 46Ter mRNA.....	130
Figure 3. Tethering Stau1 to the FLuc mRNA 3'UTR reduces FLuc mRNA abundance.	131
Figure 4. siRNA-mediated down-regulation of cellular Upf1 but not Upf2 or Upf3X inhibits the reduction in FLuc-MS2bs mRNA abundance that is mediated by tethered Stau1.	132
Figure 5. Stau1 binds the 3'UTR of Arf1 mRNA and reduces its abundance in a mechanism that involves Upf1.....	133
Figure 6. Stau1 binds within an ~230-nt region of the Arf1 mRNA 3'UTR, and this region reduces the half-life of Arf1 mRNA in mechanism that depends on Stau1 and Upf1.	134
Figure 7. Models for EJC-dependent NMD and SMD of Arf1 mRNA in mammalian cells.	135

Figure S1. The abundance of FLuc-MS2bs mRNA is reduced by MS2-HA-Stau1 or MS2-Upf1 but not by MS2-HA-eIF4AIII, myc-Upf1 or Stau1-HA ₃	145
Figure S2. Evidence that Stau1 reduces mRNA abundance in a way that depends on a termination codon that is located upstream of the Stau1 binding site.....	146
Figure S3. Stau1 binds Arf1 mRNA.	147
Figure S4. A comparable increase in the abundance of Arf1 mRNA that derives from pSport-Arf1 is obtained using two different Stau1 siRNAs or two different Upf1 siRNAs.....	148
Figure S5. Inserting the Stau1 binding site (SBS; nts 622-924) of the Arf1 mRNA 3'UTR within FLuc mRNA results in a Stau1-dependent reduction in FLuc mRNA half-life, whereas inserting a different region (No SBS; nts 899-1144) of the Arf1 mRNA 3'UTR does not.....	149
Figure S6. Down-regulating Stau1 has no effect on the half-life of fos-Arf1Δ(3'UTR) mRNA.....	150
Figure S7. The 3'UTR of PAICS mRNA also binds Stau1 and down-regulating Stau1 increases PAICS mRNA abundance.....	151
Article 2 :	
Figure 1 : c-JUN, SERPINE1 and IL7R mRNAs are increased in abundance in human cells depleted of either Stau1 or Upf1 but not Upf2.	194
Figure 2: Stau1 binds within the 3'UTR of c-JUN, SERPINE1 and IL7R mRNAs.	195
Figure 3: Depleting cells of Stau1 or Upf1 increases the half-life of FLuc mRNA when the 3'UTR consists of c-JUN, SERPINE1 or IL7R 3'UTR sequences that bind Stau1...	196
Figure 4: GAP43 mRNA is an SMD target.....	197
Figure 5: Deletions within the Arf1 SBS indicate that a central core region is required for Stau1 binding.	198
Figure 6: Stau1 interacts with a predicted 19-bp stem within the Arf1 SBS.	199
Figure 7: Stau1 binds to a 296-nucleotide region of the SERPINE1 3'UTR.....	200

Supplemental Figure S1: Demonstration that 11 of 12 transcripts that were upregulated in human cells depleted of Stau1 are upregulated using RT-PCR.	216
Supplemental Figure S2: Demonstration that 6 of 6 transcripts that were downregulated in human cells depleted of Stau1 are downregulated using RT-PCR and transcript-specific primers.	217
Supplemental Figure S3: Model for the secondary structure of the SERPINE1 SBS.....	218
Article 3 :	
Figure 1 : Stau1 and Stau2 co-purify with RNA	242
Figure 2: Venn diagrams summarizing microarray analysis results	243
Discussion :	
Figure 1 : Comparaison des mécanismes NMD et SMD.....	251
Figure 2 : Modèle de fonctionnement du SMD.....	253
Figure 3: Structure de la région centrale du 3'UTR de bicoid (nucléotides 172 à 722).....	266
Annexes :	
Figure 1 : Staufen est une phosphoprotéine.....	III
Figure 2 : Structure modélisée du SBS de Arf1	V
Figure 3 : Analyse semi-quantitative de l'association de Stau1 au SBS de Arf1	VI
Figure 4 : Structure modélisée du SBS de STMN3.....	VIII
Figure 5 : Analyse semi-quantitative de l'association de Stau1 au SBS de STMN3	IX

Liste des abréviations

- ADN: acide désoxyribonucléique
- ARN: acide ribonucléique
- ARNdb: ARN bicaténaire (en double brins)
- ARNm: ARN messenger
- CaMKII: protéine kinase II dépendante du calcium/calmoduline
- cDNA: AND complémentaire
- dsRBD: domaine de liaison à l'ARNdb
- eIF: facteur d'initiation de la traduction eucaryote
- FMRP: protéine du retard mental X-fragile
- IP : immunoprécipitation
- MAP: protéine associée aux microtubules
- NLS: signal de localisation nucléaire
- NMD: dégradation de l'ARNm induite par un codon non-sens
- PCR: réaction de polymérisation en chaîne
- RBP: protéine liant l'ARN
- RER: réticulum endoplasmique rugueux
- RMN: résonance magnétique nucléaire
- SLBP: protéine de liaison à la tige 3' des histones
- SMD: dégradation de l'ARNm induite pas Staufen

- Stau: Staufen
- TBD: domaine de liaison à la tubuline
- UTR: région non traduite
- VIH-1: virus de l'immunodéficience humaine, type 1
- XlrpbA: protéine(A) liant l'ARN chez *Xenopus laevis*
- YB-1: protéine-1 de liaison à la boîte-Y

*Il se peut dire, avec apparence, qu'il y a ignorance abécédaire,
qui va devant la science ;
une autre, doctorale, qui vient après la science :
ignorance que la science fait et engendre,
tout ainsi comme elle défait et détruit la première.*

[Michel de Montaigne]

*À mon père, Robert Furic, pour m'avoir fait
découvrir le monde fascinant de la Science*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse le Dr Luc DesGroseillers de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir encadré au cours de mes travaux de doctorat durant ces nombreuses années. Resteront gravés dans ma mémoire les souvenirs de ces innombrables discussions spontanées sur des résultats tous frais à peine analysés, sur des articles récemment parus, sur le monde de la recherche et aussi sur le monde parallèle du financement de la recherche. C'est avec une part de regret que je quitte ce laboratoire qui était presque devenu ma résidence principale, mais d'autres défis m'attendent ailleurs...

Je veux également remercier sincèrement la Dre Lynne E. Maquat pour la collaboration fructueuse qui s'est établie entre son laboratoire et le nôtre. Cette collaboration m'a permis de découvrir un autre champ d'étude du métabolisme de l'ARN : la dégradation. Au cours de ces travaux réalisés conjointement, j'ai pu découvrir qu'il est possible de collaborer efficacement à longue distance en s'appuyant sur deux choses : les courriels et Fedex. Je remercie aussi Lynne et Yoon Ki Kim de m'avoir initié à la journée de travail de 25 heures et au fait qu'il est effectivement possible de satisfaire des « reviewers » dans les délais accordés.

En plus de sept années passées au laboratoire, j'ai eu la chance de côtoyer plusieurs personnes qui ont toutes teinté un peu le laboratoire par leur personnalité. Je commencerai par les dinosaures :

Jacques (P(?)) Zappulla le pseudo-communiste pour son impertinence, ses réflexions à voix haute et tous les cafés gratuits.

Ming (Chinese Freak) Luo pour son sens de l'humour étrange et ses gels de séquençage à rendre jaloux.

Nadia (SuperNade) Bonvouloir pour avoir donné mon nom à toutes les compagnies scientifiques en tant qu'administrateur du labo! Les colis arriveront encore à mon nom dans 15 ans!

Thomas (Toto le haricot) Duchaine pour avoir été le superviseur de stage le plus incroyable qu'il m'ait été donné de connaître. Sa passion pour la science est contagieuse et je lui souhaite de bien s'amuser dans « son » nouveau laboratoire!

Demian (L'aplysiologue) Barbas pour avoir supporté d'être adossé à moi pendant toutes ces années et d'avoir su écouter mes petites crissettes. Merci pour ces câlins réconfortants, pour Lionel Ritchie (Helllllllllooooo...) et surtout pour ces sons sans aucun sens émis de manière sporadique.

George (Bougaron-son-son) Elvira pour avoir fait comprendre à tous qu'il est bien de faire les contrôles en même temps que l'expérience... Malgré nos accrochages épisodiques, je considère avoir eu des discussions scientifiques et non-scientifiques hors-catégories avec Mr Gougnole l'agent de brevet!

Catherine (Ouin) Martel pour toutes ses soirées bien, voire très bien arrosées... J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec elle et je lui souhaite de trouver enfin le bonheur dans le génie génétique des plantes...

Et maintenant c'est le moment de saluer les membres actifs du laboratoire LDG (acronyme improbable de Luc-Demian-George).

Marjolaine (La stagiaire) Maher-Laporte pour tout le plaisir que j'ai eu à la côtoyer et à travailler avec elle, ainsi que pour toutes ces raisons qui ne peuvent être mentionnées dans un document sérieux qui portera un ISSN/ISBN.

Karine (Karin D) Boulay, ma philosophe de labo préférée! N'oublie jamais les vertus thérapeutiques du vouvoiement...et les autres thèmes de discussion qui me sont chères!

Laurent (Loul) Chatel-Chaix pour toutes ces discussions sur Staufen et le VIH et pour ces milliers de questions posées en « lab-meetings ».

Wildriss (Mademoiselle) Viranaicken pour sa bonne humeur, ses multiples appartements sur Ridgewood et pour ses connaissances encyclopédiques sur l'ARN. Il faut croire que voir la vie en deux dimensions rend fou!

Ainsi que tous ceux que j'ai côtoyé sans trop connaître : Samuel (Silent Bob) Dugré-Brisson, Maria, Frédérique et Céline.

Je voudrais également remercier Louise Cournoyer et Mireille Fyfe pour leurs conseils ainsi que pour la production d'anticorps et le passage de tous ces pétris de 293T!

Je tiens également à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Finalement, je voudrais remercier les membres de ma famille, pas nécessairement pour leur support durant mes études, mais beaucoup plus pour ce qu'ils sont, donc ce qui est grandement responsable de ce que je suis...

1 Introduction

1.1 Introduction générale

Le flux de l'information génétique allant de son gardien, l'ADN, à ses effecteurs, les protéines, doit passer par le biais de messagers : les ARN messagers. Longtemps perçu comme une molécule de seconde classe, sans réel intérêt au niveau de la régulation des processus physiologiques, l'ARNm est depuis une décennie l'objet d'intenses recherches quant à ses propriétés autres que celle d'encoder une protéine. Le modèle selon lequel l'ARNm, dès sa sortie du noyau, est automatiquement recruté par les ribosomes qui en font la traduction est simpliste et désuet.

Le cheminement cellulaire de l'ARNm de sa synthèse à sa dégradation est un parcours complexe qui comprend plusieurs étapes, certaines communes à tous les ARNm, d'autres spécifiques à certains. Chez les eucaryotes, la transcription des gènes en ARNm s'effectue dans le noyau grâce à l'activité catalytique de l'ARN polymérase II. La polymérase est recrutée sur le promoteur du gène à transcrire par une foule de facteurs de transcription. Les différentes combinaisons de ces facteurs modulent l'activité des promoteurs. C'est ce qui fait de la transcription le premier niveau de régulation de l'expression génétique. Certains gènes possèdent plus d'un promoteur, ce qui peut engendrer la synthèse de transcrits qui divergent en leur région 5' (Ayoubi et Van De Ven, 1996). La grande majorité des gènes eucaryotes sont constitués d'exons et d'introns et l'obtention du transcrit mature ne peut avoir lieu qu'après épissage. L'épissage standard consiste en l'excision de tous les introns et en la juxtaposition de tous les exons. Cependant,

l'épissage alternatif permet de produire divers transcrits en faisant l'assemblage uniquement d'un certain nombre d'exons (Stamm et al., 2005). L'épissage est un processus co-transcriptionnel qui est effectué par le « spliceosome », un complexe ribonucléoprotéique spécialisé dans la reconnaissance des introns et qui catalyse le clivage et la jonction subséquente des exons bordant les introns excisés (Staley et Guthrie, 1998).

Avant de poursuivre son périple vers le cytoplasme, l'ARNm est également modifié par l'ajout d'une coiffe en 5' et d'une queue de polyadénosines en 3'. Le messenger mature est alors exporté activement du noyau via les pores nucléaires. Il existe plusieurs récepteurs pour l'export nucléaire qui reconnaissent leurs cargos par le biais de l'identité des protéines associées au transcrit (Zenklusen et Stutz, 2001). Une fois dans le cytoplasme, l'ARNm est encore associé à plusieurs protéines d'origine nucléaire dont les protéines du complexe de jonction exon-exon et le complexe de liaison de la coiffe (CBP) (Ishigaki et al., 2001). Afin d'être traduit activement, l'ARNm devra se départir de ces protéines nucléaires et s'associer aux facteurs d'initiation de la traduction qui pourront dès lors recruter efficacement le ribosome et débiter la synthèse protéique.

Par contre, plusieurs ARNm sont soumis à des niveaux additionnels de régulation avant d'être traduits. En effet, un grand nombre de transcrits contiennent des éléments de séquence (éléments *cis*) qui sont liés par divers membres d'une vaste famille de protéines : les protéines de liaisons à l'ARN (RBP) qui sont les éléments *trans*. L'association de certaines de ces protéines à un ARNm particulier peut avoir plusieurs conséquences :

- La traduction de l'ARNm peut être inhibée en attendant un stimulus cellulaire précis qui supprimera cette répression (Pantopoulos, 2004).
- L'ARNm peut être assemblé dans des complexes de transport qui se chargeront de localiser le transcrit à un site cellulaire précis avant que sa traduction ne débute (Mayford et al., 1996).
- Le transcrit peut être ciblé rapidement vers la voie de dégradation, car le niveau cellulaire de la protéine qu'il encode doit être strictement contrôlé (Sagliocco et al., 1994; Winstall et al., 1995).

Il est connu que l'ARNm peut également adopter des niveaux de structure secondaire et tertiaire qui sont impliqués dans une régulation fine du contrôle post-transcriptionnel de l'expression génétique (Dollenmaier et Weitz, 2003; Odreman-Macchioli et al., 2000). De quelle manière la structure d'un ARNm a-t-elle une influence sur son métabolisme? Principalement de deux façons. Premièrement, la structure elle-même peut avoir un rôle à jouer, afin d'interférer avec la lecture du messenger, par exemple. Deuxièmement, la structure peut être liée par des protéines spécifiques qui destinent le messenger à divers sorts. L'étude de la fonction de ces facteurs protéiques sur la traduction ou la stabilité des ARNm permet une meilleure compréhension de la régulation de la synthèse protéique au niveau cellulaire.

1.1.1 Objectifs de la thèse

Il existe dans les cellules eucaryotes une multitude de complexes ribonucléoprotéiques dont la composition peut varier grandement en fonction des divers signaux que reçoit la cellule. Les travaux effectués dans cette thèse ont consisté en l'étude du rôle cellulaire de la protéine Staufen chez les mammifères. Staufen est une protéine qui possède plusieurs domaines de liaisons à l'ARN en double brins et qui est impliquée dans de multiples aspects du métabolisme de l'ARNm. Au moment de débiter les travaux qui sont l'objet de cette thèse, la majorité des résultats obtenus concernant la fonction de Staufen provenaient de la drosophile. Staufen y est impliqué dans la localisation des ARNm bicoid et oskar aux pôles antérieurs et postérieurs de l'ovocyte, respectivement. Il a depuis été montré qu'il existe deux gènes Staufen chez les mammifères, qui encodent Stau1 et Stau2. Ces protéines sont associées aux ribosomes et au réticulum endoplasmique rugueux (RER). Elles sont également impliquées dans le transport dendritique de l'ARNm dans les neurones. Stau1 joue également un rôle dans l'activation traductionnelle des ARNm réprimés. Le point de départ des travaux qui seront ici présentés fut de s'attaquer à la question suivante : quels sont les ARNm associés à Stau1 et Stau2 et quel(s) impact(s) cette association a-t-elle sur le métabolisme de ces ARNm?

Puisque Staufen est une protéine qui lie l'ARN en double brins, la première section de l'introduction s'intéressera à présenter la fonction de diverses protéines possédant des domaines de liaison à l'ARN en double brins (dsRBD). La deuxième section traitera de la

structure du dsRBD et de son mode d'interaction avec l'ARN. La troisième section, quant à elle, présentera ce qui est connu sur les protéines Staufen de mammifères et sur leurs fonctions. La quatrième section sera un chapitre technique sur les différentes approches qui existent afin d'identifier globalement les ARNm qui interagissent avec une protéine liant l'ARN. Finalement, la dernière section sera une présentation des mécanismes généraux de dégradation de l'ARNm, puisque tout processus agissant sur le métabolisme de l'ARN est en compétition constante avec les voies de dégradation de l'ARN.

1.2 Rôles cellulaires des protéines liant l'ARN en double brins

L'ARN, lorsqu'il adopte sa conformation mature, contient des segments en double brins (ARNdb). L'appariement des nucléotides dans l'ARN est plus varié que celui dans la double hélice d'ADN. En plus des interactions « Watson-Crick » standards, les paires guanosine-uracile sont relativement fréquentes (Ackermann et al., 1979; Chang et Marshall, 1986).

Il existe un ensemble de protéines spécialisées dans l'interaction avec les régions en double brins de l'ARN (Tableau I). Tous les membres de ces familles possèdent une ou plusieurs copies d'un motif consensus de liaison à l'ARNdb : le dsRBD (*double-stranded RNA binding domain*) (Figure 1). Les caractéristiques structurales du dsRBD seront abordées plus loin dans l'introduction, les prochaines sections présentent divers rôles des protéines à dsRBD dans la physiologie cellulaire.

Tableau I : Fonctions de diverses protéines possédant des dsRBD.

Protéines	Domaine catalytique	Fonctions caractéristiques
RNaseIII/Dicer/Drosha	Domaine RNaseIII	Biogenèse des micro-ARN et maturation des petits-ARN
ADAR1 & 2	Déaminase A ² I	Édition
RHA	Hélicase à domaine DEXH	Coactivateur transcriptionnel
PKR	Kinase de Ser/Thr	Contrôle traductionnel
TRBP/PACT/wt51	Aucun	Modulation de l'activité de PKR
NF90	Aucun	Facteur de transcription
Staufen	Aucun	Localisation de mRNP
XlrbpA	Aucun	Localisation de mRNP
R2D2/RDE4/HYL1	Aucun	Composants des voies d'interférence par l'ARN

Tableau tiré de Chang et Ramos (2005).

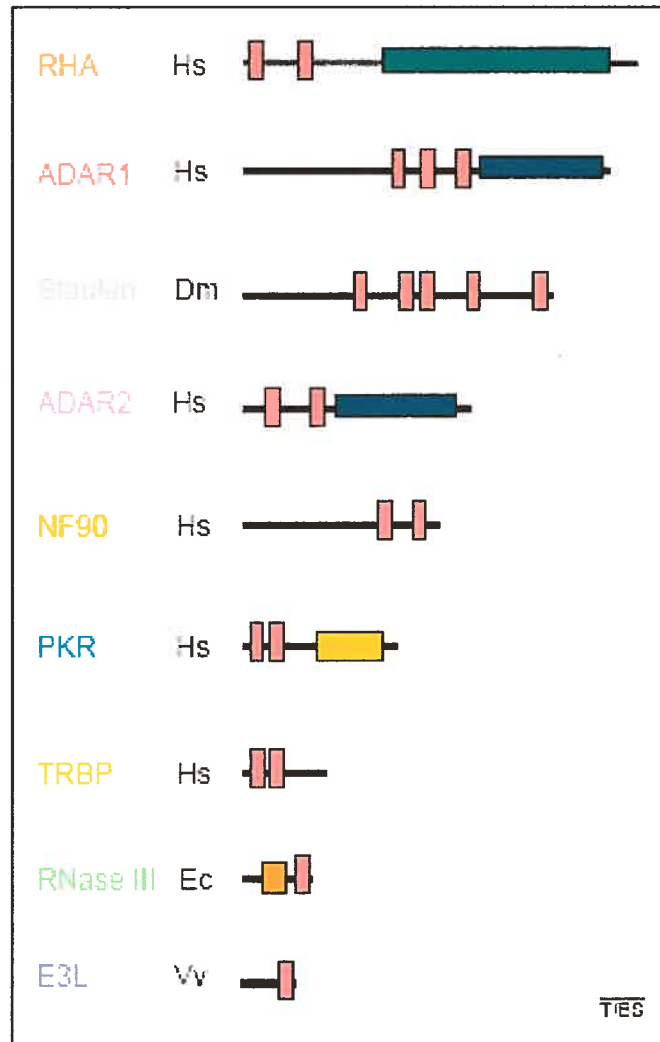


Figure 1 : Divers exemples de protéines à dsRBD.

Représentation schématique de diverses protéines contenant une ou plusieurs copies du domaine consensus de liaison à l'ARNdb (dsRBD : identifié par les rectangles roses)
 Figure tirée de Fierro-Monti et Mathews (2000).

1.2.1 Transport et localisation intracellulaire de l'ARNm

Il est parfois capital pour la cellule de retarder la traduction d'un ARNm jusqu'à ce que celui-ci soit localisé à un site cellulaire précis. La localisation intracellulaire de l'ARNm comporte plusieurs avantages. Premièrement, ce mécanisme permet à la cellule de dépenser moins d'énergie que si elle devait localiser les protéines encodées par le messenger. En effet, la localisation d'une seule molécule d'ARNm permet la synthèse de plusieurs copies de la protéine directement au site requis. Deuxièmement, la traduction des ARNm transportés est inhibée et elle n'est enclenchée que lorsque le messenger est arrivé à sa destination finale. Plusieurs RBP ont un rôle à jouer dans la localisation intracellulaire de divers ARNm, cependant, uniquement les protéines à dsRBD seront l'objet de cette section.

1.2.1.1 Staufen

L'ovogenèse chez la drosophile est un processus complexe qui requiert le positionnement de certains ARNm à des régions précises de l'ovocyte. La détermination de l'axe antéropostérieur est basée, en partie, sur la localisation du transcrit bicoid au pôle antérieur et du transcrit oskar au pôle postérieur (Riechmann et Ephrussi, 2001). L'ARNm bicoid n'est traduit qu'après fertilisation de l'ovocyte, ce qui donne lieu à l'apparition d'un gradient antérieur de la protéine bicoid. Bicoid est un morphogène qui active la transcription de gènes nécessaires à la formation des structures antérieures (Zhao et al., 2002). La localisation postérieure de l'ARNm oskar permet le recrutement et l'assemblage des facteurs responsables de la formation de l'abdomen et de la lignée germinale (Ephrussi

et Lehmann, 1992; Lehmann et Ephrussi, 1994). Staufen est impliqué dans ces deux événements de localisation. Il a été montré que Staufen peut s'associer à une région du 3'UTR de bicoid dont la structure est majoritairement en double brins. L'injection dans des embryons de drosophile de cette portion du 3'UTR de bicoid est suffisante pour un recrutement par Staufen et une localisation antérieure du transcrit (Ferrandon et al., 1994; Ferrandon et al., 1997; Macdonald et Kerr, 1997; Snee et al., 2005). La localisation au pôle postérieur de l'ARNm oskar nécessite également Staufen, mais la région du transcrit qui est reconnue n'a pas encore été identifiée. De plus, Staufen est important pour supprimer l'inhibition de la traduction de oskar, une fois le messenger localisé (Irion et al., 2006; Micklem et al., 2000). Les mécanismes moléculaires du transport de l'ARNm sur de longues distances seront examinés plus spécifiquement à la section 1.4.5.

1.2.1.2 NF90/Hf3

Les neurones sont des cellules très polarisées et le maintien de cette polarité se fait par la localisation différentielle de molécules dans les divers sous-domaines cellulaires, tels que les dendrites, le soma et l'axone. Le cytosquelette est nécessaire à la formation et au maintien de cette polarité (Bassell et Singer, 2001; Bassell et al., 1994). L'ARNm de tau, une protéine associée aux microtubules, est retrouvé dans le soma des neurones et au niveau de la région proximale de l'axone (Litman et al., 1994; Litman et al., 1993). Une région du 3'UTR de l'ARNm tau est responsable de la localisation axonale du transcrit (Aronov et al., 2001). L'ARNm tau est stabilisé par HuD, une protéine qui s'associe aux régions riches en AU (Section 1.6.1) (Aronov et al., 2002). Afin d'identifier les protéines

responsables de la localisation axonale de tau, une approche de buvardage de type *NorthWestern* a été réalisée sur des extraits de cellules neuronales en utilisant l'élément de localisation de 91 nt du 3'UTR de tau comme sonde (Larcher et al., 2004). Deux protéines ont ainsi été identifiées formellement, soit Ifl3 et NF90 qui sont en fait deux isoformes de la même protéine. Ifl3 co-localise avec la protéine tau au niveau de l'axone, ce qui est en accord avec un rôle possible d'Ifl3 dans la localisation de l'ARNm tau. D'autres travaux seront nécessaires afin de confirmer l'importance d'Ifl3 dans la reconnaissance et le transport de l'ARNm tau.

1.2.2 Activation et répression traductionnelle

La cellule doit parfois réguler avec une précision accrue la fenêtre de temps à l'intérieur de laquelle un ARNm donné peut être traduit activement. Trois exemples de régulation seront présentés : le premier fait intervenir la protéine Prbp (Zhong et al., 1999), le deuxième la protéine RHA (Hartman et al., 2006) et le troisième la protéine PKR (Saunders et Barber, 2003).

1.2.2.1 Prbp

Lors de la spermatogenèse, les histones doivent être remplacées par deux classes de protéines : les protéines de transition et les protamines (Govin et al., 2004; Zhong et al., 1999). La traduction de l'ARNm encodant la protamine-1 (Prm1) doit être régulée temporellement lors de la différenciation des spermatides. L'ARNm Prm1 possède dans son 3'UTR deux copies d'une séquence Z et une copie de la séquence complémentaire Z'.

Deux tiges peuvent donc être formées en combinant un élément Z avec l'élément Z'. La protéine Prbp (orthologue murin de la protéine humaine Trbp impliquée dans la transactivation du VIH-1) contient trois dsRBD et se lie aux éléments Z/Z' (Lee et al., 1996) permettant une activation/dérépression traductionnelle de l'ARNm Prm1 (Zhong et al., 1999).

1.2.2.2 RHA

RHA est une hélicase d'ARN de la famille « DEAD-box », elle possède des fonctions dans la transcription, l'épissage et le contrôle traductionnel. En plus de son domaine hélicase, RHA possède deux dsRBD et un domaine RGG (Zhang et Grosse, 1997). Certains ARN viraux et ARNm cellulaires possèdent des régions 5'UTR très structurées qui sont un obstacle à une initiation efficace de la traduction par le ribosome. RHA a été purifiée en complexe avec un de ces éléments viraux nommé le PCE (*post-transcriptional control element*). La liaison de RHA au PCE permet un taux de traduction plus élevé de divers ARNm rapporteurs (Hartman et al., 2006). La sous-expression ou la surexpression de RHA dans des cellules COS entraîne une diminution et une augmentation, respectivement, de la traduction d'un rapporteur contenant la séquence PCE. L'ARNm codant pour le facteur de transcription JunD possède dans son 5'UTR une région hautement structurée semblable au PCE (Short et Pfarr, 2002). La sous-expression de RHA dans des cellules COS entraîne une diminution de la synthèse protéique de JunD ainsi qu'une diminution de la quantité d'ARNm JunD dans la fraction de polysomes (Hartman et al., 2006).

1.2.2.3 Rôle de PKR et modulation par TRBP et PACT

La protéine kinase dépendante de l'ARNdb (PKR) est impliquée dans la réponse cellulaire à l'infection virale. En effet, l'expression de PKR dans les cellules est augmentée en réponse à l'interféron (Thomis et Samuel, 1993). PKR est une protéine qui contient deux dsRBD et un domaine sérine/thréonine kinase. L'activation de PKR entraîne la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 α , ce qui inhibe la synthèse protéique générale (Dar et al., 2005). Pour être activé, PKR doit se lier à un substrat d'ARNdb d'environ 30 à 80 paires de bases (Manche et al., 1992). Plusieurs virus à ARN possèdent des régions en double brins capables de recruter PKR. Les deux dsRBD doivent être en contact avec de l'ARNdb pour qu'il y ait activation (Nanduri et al., 1998). L'association de PKR avec l'ARNdb stimule la formation d'un homo-dimère et une phosphorylation en *trans* de chacun des monomères (Thomis et Samuel, 1995).

Plusieurs virus ont évolué avec des systèmes précis pour contourner l'activation de PKR. L'exemple du virus *vaccinia* est éloquent. Ce virus encode deux protéines, E3L et K3L, qui agissent de concert pour empêcher l'activation de PKR et l'inhibition de la traduction. E3L possède un dsRBD et entre en compétition avec PKR pour l'accès aux régions en double brins de l'ARN, limitant ainsi les chances de PKR de pouvoir être activé (Langland et Jacobs, 2004; Sharp et al., 1998). K3L ressemble à eIF2 α et peut donc s'associer au domaine kinase de PKR, s'assurant ainsi que eIF2 α ne soit pas phosphorylé (Kawagishi-Kobayashi et al., 1997).

Deux protéines cellulaires peuvent également moduler l'activation de PKR. TRBP (*TAR RNA binding protein*) est une protéine possédant trois dsRBD. Elle fut isolée en association à l'élément TAR (*Tat-responsive region RNA*), une structure d'ARNdb retrouvée à l'extrémité 5' de tous les transcrits du VIH-1 et capable d'activer PKR. De la même manière que E3L, il est suggéré que TRBP inhibe l'activation de PKR par compétition (Dorin et al., 2003; Ong et al., 2005). À l'inverse, la protéine PACT (*protein activator of PKR*) est capable d'activer PKR. En réponse à divers stress cellulaires, PACT est phosphorylé et permet l'activation de PKR, ce qui se traduit par un arrêt de la croissance cellulaire et une induction de l'apoptose (Patel et al., 2000; Patel et Sen, 1998a).

1.2.3 Édition par les désaminases d'adénosine

L'édition de l'ARN est la modification de l'identité de certains nucléotides au niveau co-transcriptionnel ou post-transcriptionnel. L'édition peut avoir plusieurs conséquences (Bass, 2002). Premièrement, si le nucléotide modifié se retrouve dans la région codante d'un messager, cela peut entraîner une substitution d'acide aminé ou la suppression d'un codon de terminaison. Deuxièmement, l'édition peut entraîner la création d'un nouveau site d'épissage (Rueter et al., 1999). Une troisième fonction de l'édition, récemment découverte, est la rétention nucléaire d'un messager édité, l'ARNm CTN-RNA, qui est clivé et relâché dans le cytoplasme lors d'un stress cellulaire (Prasanth et al., 2005).

Un type d'édition consiste en la conversion, par désamination, d'une adénosine en inosine, un nucléotide aux propriétés similaires à la guanosine. Les mammifères possèdent

deux enzymes ayant cette activité catalytique : ADAR1 et ADAR2 (*Adenosine Deaminase that act on RNA*). Concernant l'organisation structurale de ces enzymes, ADAR1 possède 3 dsRBD tandis que ADAR2 n'en possède que deux, en plus du domaine catalytique désaminase qui se retrouve dans la portion C-terminale (Bass, 2002). ADAR1 contient également deux domaines d'interaction avec l'ADN-Z.

Les ADAR reconnaissent leurs substrats par le biais de leurs divers dsRBD, mais le rôle précis de chacun des dsRBD, ainsi que la synergie d'association qui existe entre eux restent à être mieux étudiés. Le substrat préférentiel d'ADAR est une longue tige en double brins d'ARN. Il est à noter que la tige considérée comme minimale pouvant être éditée est de 15 paires de bases avec un mésappariement (Herbert et Rich, 2001).

1.2.4 Multiples rôles des protéines de la famille RNase III

La RNase III est une endonucléase retrouvée chez *E. coli* qui permet la maturation ou la dégradation de plusieurs types d'ARN. Toutes les espèces étudiées possèdent un ou plusieurs orthologues de la RNase III bactérienne. Le domaine catalytique de la RNase III est retrouvé dans la portion N-terminale, tandis que l'unique dsRBD est situé en C-terminal. Le domaine catalytique est identifié par un motif « signature » de onze acides aminés, dont huit sont hautement conservés, et qui est retrouvé chez tous les membres de cette famille (Sun et al., 2001a). La RNase III agit sous forme d'homo-dimère et effectue le clivage de substrats d'ARNdb (Nicholson, 1999). L'activité catalytique de la RNase III est importante pour la maturation des ARN ribosomiques 16S et 23S et 5S à partir du

transcrit précurseur (Srivastava et Schlessinger, 1990). La RNase III est également impliquée dans la maturation des ARNt et de certains ARNm, dont les ARNm du bactériophage T7.

L'activité catalytique RNase III est également importante pour la maturation de plusieurs classes de petits ARN non codants dont les micro-ARN. La section suivante aborde cet aspect du rôle des endonucléases de type RNase III que sont Drosha et Dicer.

1.2.4.1 Biogenèse des miRNA

La dernière décennie a vu naître un nouveau champ d'étude d'une nature jusque là insoupçonnée : la régulation post-transcriptionnelle via les petits ARN non-codants. Les micro-ARN (miRNA) sont une classe majeure de ces ARN non-codants. Les miRNA sont synthétisés à partir de précurseurs transcrits par l'ARN polymérase II. Deux enzymes à dsRBD sont nécessaires afin d'obtenir un miRNA mature à partir d'un transcrit précurseur : Drosha et Dicer (Figure 2). La première étape de maturation survient lorsqu'une région du précurseur se replie en une tige boucle qui est clivée dans le noyau par Drosha pour donner le pré-miRNA. Cet ARN sous forme de tige boucle de 60 à 100 nucléotides de longueur possède alors une extension de 2 nucléotides à son extrémité 3'-OH, ce qui est représentatif d'un produit de clivage d'une enzyme de la classe des RNase III, comme le sont Dicer et Drosha. Le pré-miRNA est ensuite exporté dans le cytoplasme où il subira un deuxième clivage par Dicer, cette fois du côté de la boucle pour donner un duplex d'ARN de 20 à 24

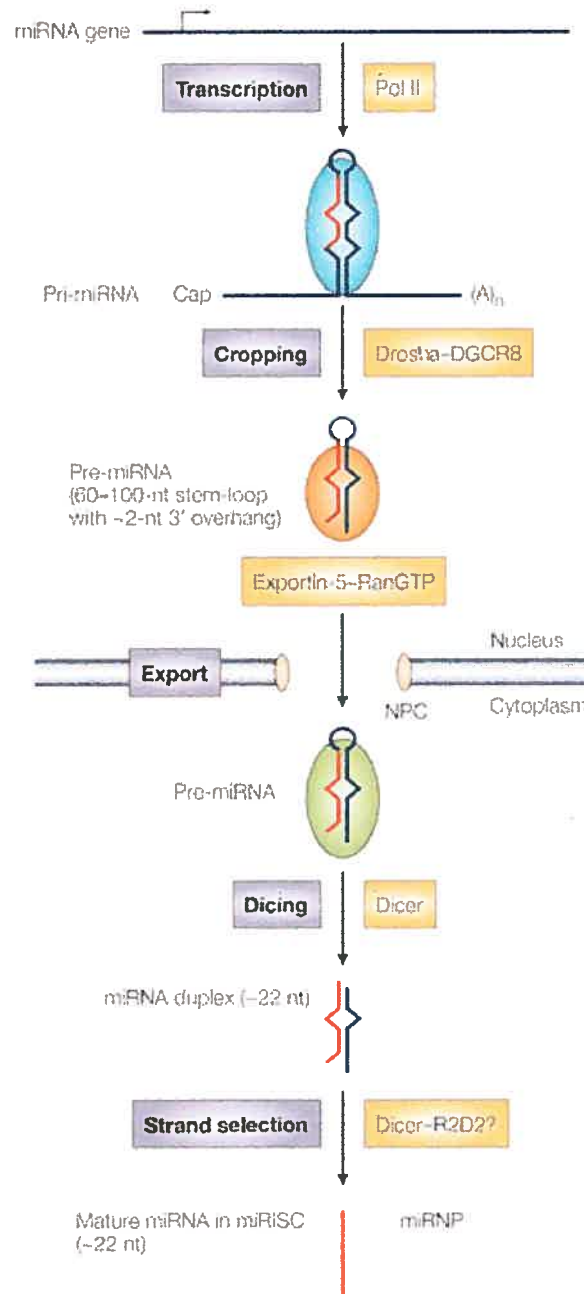


Figure 2 : Étapes de synthèse d'un miRNA

La chronologie des événements impliqués dans la synthèse et la maturation d'un miRNA est détaillée à la section 1.2.4.1. Figure tirée de Kim (2005).

nucléotides. Le miRNA mature exerce son effet sous forme simple brin, il doit donc y avoir une étape de sélection du brin effecteur. Il y a controverse sur le mécanisme de sélection, mais une règle simple qui semble s'appliquer dans la majorité des cas est que le brin mature sera celui dont la force des appariements en 5' dans le duplex est plus faible (Schwarz et al., 2003). Le miRNA mature est assemblé dans le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*), un complexe contenant différentes hélicases d'ARN et un des membres de la famille Argonaute. Les Argonautes sont des protéines possédant un domaine PIWI semblable au domaine catalytique de la RNase H et sont nécessaires pour effectuer le contrôle post-transcriptionnel médié par les miRNA (Gregory et al., 2005). Le complexe RISC reconnaît ses substrats principalement par complémentarité de séquence au niveau du 3'UTR des ARNm, en se servant du miRNA mature comme gabarit. Deux évènements peuvent alors se produire : l'ARNm ciblé peut être dégradé ou sa traduction peut être inhibée. Ces effets opposés découlent principalement du niveau de complémentarité entre le miRNA et son ARNm cible, une complémentarité totale entraîne généralement la dégradation du transcrit.

1.3 Spécificité d'interaction entre l'ARNdb et les dsRBD

La majorité des protéines liant l'ARN le font d'une manière spécifique à la séquence en nucléotides, par exemple les protéines PABP, PTB et QK1, pour n'en nommer que quelques-unes. Dans le cas des protéines contenant des dsRBD, la liaison semble dépendre beaucoup plus de la structure de la région en double brins liée (Ramos et al.,

1999; Ramos et al., 2000; Ryter et Schultz, 1998) et les rares contacts directs avec les bases azotés ne sont pas nécessaires à la stabilité de l'interaction. Les deux prochaines sections sont dédiées à la présentation structurale du dsRBD et des contraintes conformationnelles de l'ARN associé.

1.3.1 Structure des dsRBD

Le dsRBD est un motif composé de deux hélices alpha groupées sur une même face d'un feuillet bêta antiparallèle de trois brins (Fierro-Monti et Mathews, 2000). En allant du N-terminal vers le C-terminal du motif on retrouve l'hélice $\alpha 1$, suivie des brins $\beta 1, 2$ et 3 , et finalement l'hélice $\alpha 2$. Le motif entier contient entre 65 et 75 résidus d'acide aminés. La Figure 3 montre les positions les plus conservées du motif et les acides aminés qui les occupent. La conservation des acides aminés est beaucoup plus prononcée en C-terminal du motif qu'en son N-terminal.

Le dsRBD, en plus de son rôle dans la liaison d'ARN, peut aussi servir de plateforme pour des interactions protéine-protéine. Le dsRBD peut donc être vu comme un domaine multifonctionnel, dont la face comportant les deux hélices alpha servirait principalement à interagir avec les acides nucléiques et le reste du domaine servirait aux interactions protéiques. Il a été montré que PKR peut former un homo-dimère par le biais de son dsRBD-I indépendamment de son activité de liaison à l'ARN, mais d'autres résultats tendent à démontrer que l'ARN est important pour cette interaction

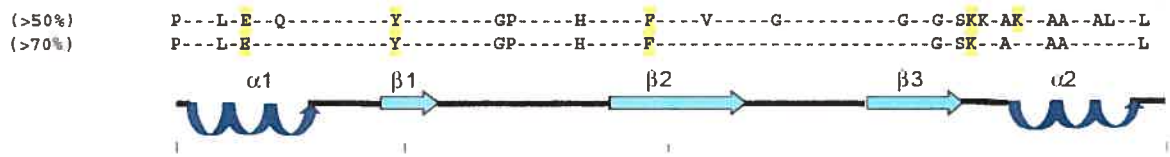


Figure 3 : Consensus en acides aminés du motif dsRBD

Un alignement de séquence a été effectué avec 80 différents dsRBD. Les acides aminés conservés à plus de 50% et à plus de 70% sont indiqués dans la portion supérieure de la figure. Les acides aminés ayant un rôle direct à jouer dans l'association avec l'ARNdb sont surlignés en jaune. La portion inférieure de la figure représente la position respective des éléments de la structure secondaire du dsRBD. Figure tirée de Fierro-Monti et Mathews (2000).

(Patel et Sen, 1998b; Zhang et al., 2001). Ces travaux diffèrent puisque certains ont été réalisés *in vitro*, tandis que d'autres ont été effectués *in vivo* chez la levure. Diverses protéines, comme PACT, NF90, PKR interagissent avec d'autres protéines via leurs dsRBD (Saunders et Barber, 2003), mais les données actuelles ne permettent pas de définir avec précision si toutes ces interactions nécessitent une surface commune du dsRBD ou bien si chacune de ces interactions est unique et qu'elles ne partagent pas de similitudes entre elles. Il est aussi important de noter que tous les dsRBD ne possèdent pas d'activité de liaison à l'ARN, ce qui suggère l'importance du domaine pour d'autres types d'interactions. Les déterminants structuraux permettant l'association dsRBD-ARN sont mieux documentés et la prochaine section s'y intéresse.

1.3.2 Interactions protéines-ARNdb

Des études majeures se sont intéressées à la détermination de la structure précise du complexe dsRBD-ARN. Les travaux de Ryter et Schultz ont permis d'obtenir la première structure cristallographique d'un dsRBD associé à de l'ARN (Figure 4). Le cristal était composé du dsRBD2 de la protéine XlrbpA et d'une pseudo-hélice continue d'ARNdb de type A formée par la juxtaposition tête-à-queue de courtes hélices de 10 paires de bases (Ryter et Schultz, 1998). Il est possible de diviser les zones d'interaction déduites en trois régions : l'hélice $\alpha 1$ interagit avec un sillon mineur, la boucle 2 interagit avec un autre sillon mineur et la boucle 4 ainsi que l'hélice $\alpha 2$ s'enfoncent dans le sillon majeur. Toutes

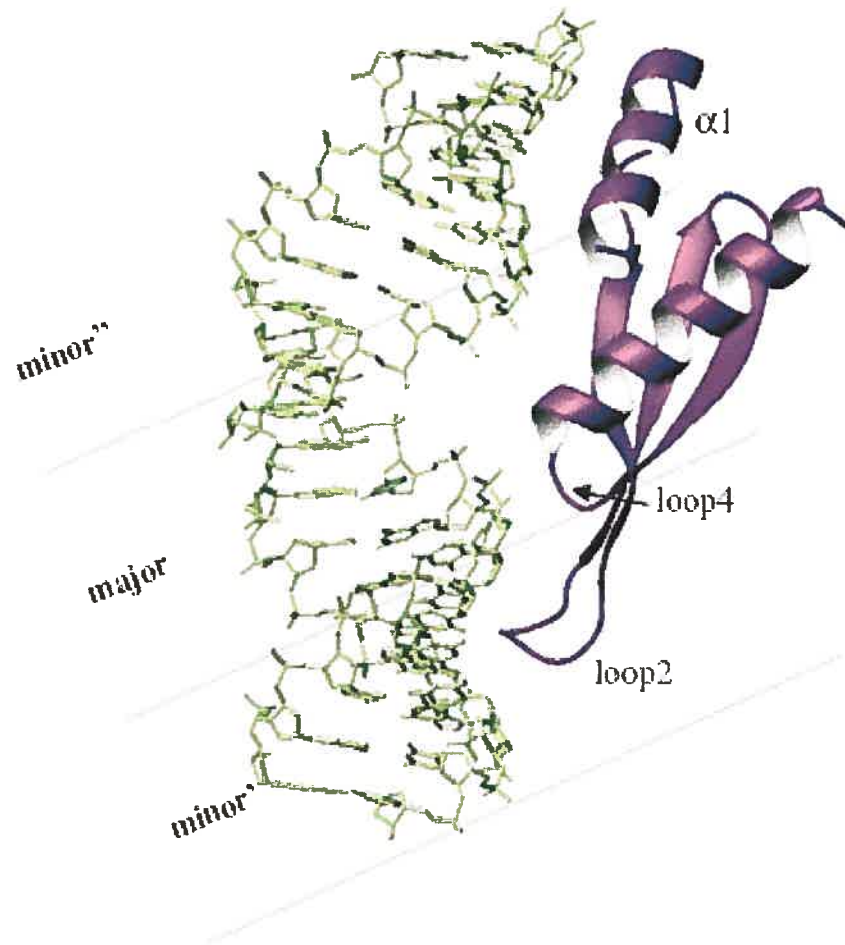


Figure 4 : Le dsRBD2 de XlrpA associé à une hélice d'ARN

Représentation de la structure cristallographique obtenue du complexe entre le dsRBD2 de la protéine XlrpA et un duplex d'ARN. La figure indique l'emplacement du sillon majeur et des deux sillons mineurs qui sont contactés par le dsRBD. Les régions du dsRBD impliquées dans l'interaction avec l'ARN sont indiquées : l'hélice $\alpha 1$, la boucle 2 (Loop 2) et la boucle 4 (Loop 4). Figure tirée de Chang et Ramos (2005).

les interactions observées, à l'exception d'une seule, indiquent que l'association est indépendante de la séquence en nucléotides de l'hélice d'ARN. La majorité des contacts entre le dsRBD et l'ARN se produisent sur les groupements phosphates des liens phosphodiester et les groupements 2'OH des résidus riboses via des ponts hydrogènes, des interactions charge-charge ou par l'intermédiaire de molécules d'eau intercalées. Il est à noter que le sillon majeur ne respecte pas la conformation absolue d'une hélice parfaite de type A, ce qui pourrait être vu comme un élément de spécificité d'association.

Concernant les déterminants de spécificité de séquence, la structure révèle deux points de contact directs avec des bases azotées. Une des interactions fait intervenir un groupement accepteur de pont hydrogène qui occuperait la même position indépendamment de la nature du nucléotide. Par contre, l'autre interaction directe se fait entre le groupement carbonyle du squelette peptidique d'une proline (P140) et le groupement amino exocyclique d'une guanosine, ce qui suggère l'importance d'une paire G-C au niveau du sillon mineur contacté par la boucle 2.

Plusieurs études de l'association dsRBD-ARN ont été effectuées par résonance magnétique nucléaire (RMN). Les travaux du groupe de Varani (Ramos et al., 1999; Ramos et al., 2000) réalisés avec le dsRBD3 de la protéine Staufen ont permis de corroborer plusieurs interactions clés déduites des travaux de Ryter et Schultz, mais quelques divergences importantes sont à noter. Premièrement, un des ARNdb utilisé pour former le complexe consiste en une tige-boucle et non pas un long duplex d'ARN. L'hélice $\alpha 1$ est

donc impliquée dans des interactions avec les nucléotides de la boucle qui est absente de la structure cristallographique. Autre différence, la tige est une double hélice d'ARN qui respecte exactement la structure de type A. Il est possible que le dsRBD2 de XlrpA et le dsRBD3 de Staufen ne possèdent pas la même spécificité d'interaction, mais deux explications peuvent réconcilier ces divergences.

Premièrement, le sillon majeur plus large observé dans la structure cristallographique est causé par la juxtaposition de deux hélices, ce qui peut être vu comme étant artificiel comparativement à une double hélice continue. Cependant, il est possible que le sillon majeur plus large soit également un réel déterminant de spécificité, car plusieurs séquences d'oligonucléotides ont été testées avant d'obtenir un cristal où le dsRBD ne se fixe qu'à un seul site. Deuxièmement, le dsRBD3 de Staufen peut également s'associer à une tige d'ARN sans boucle (Ramos et al., 1999), ce qui relativise l'importance des contacts entre l'hélice $\alpha 1$ et les nucléotides de la boucle.

1.4 Staufen, une protéine impliquée dans de multiples facettes du métabolisme de l'ARNm.

Le gène codant pour Staufen a été identifié en 1986 chez la drosophile lors d'un criblage pour découvrir de nouveaux gènes à effets maternels impliqués dans l'ovogenèse et le développement embryonnaire (Schupbach et Wieschaus, 1986). Quelques années plus tard, en 1991, il a été montré que la protéine Staufen est importante pour la localisation de certains ARNm aux pôles antérieur et postérieur de l'ovocyte (St Johnston et al., 1991). La

localisation des ARNm bicoid et oskar, durant l'ovogenèse, et de prospero, lors de la division asymétrique des neuroblastes, semble être dépendante, du moins en partie, de Staufen (Broadus et al., 1998; Ferrandon et al., 1994; Micklem et al., 2000). La découverte d'orthologues de Staufen chez les mammifères (Buchner et al., 1999; DesGroseillers et Lemieux, 1996) a ouvert une voie de recherche fascinante sur le rôle de la localisation intracellulaire de l'ARNm chez les organismes supérieurs.

1.4.1 Aperçu des protéines Staufen de mammifères

Les mammifères possèdent chacun deux gènes codant pour Staufen, soit Stau1 et Stau2 qui sont des paralogues. Par épissage alternatif chacun de ces gènes produit divers isoformes (Figure 5). En comparaison à Staufen de la drosophile (dmStau) qui possède cinq copies du dsRBD, Stau1 et Stau2 n'en contiennent que quatre copies. Les dsRBD 2 à 5 sont retrouvés dans la protéine Stau1, tandis que ce sont les dsRBD 1 à 4 qui sont inclus dans la protéine Stau2. Il est à souligner que le xenope et le poisson-zèbre expriment également Stau1 et Stau2. Cependant, chez ces deux espèces le dsRBD1 est présent dans la séquence peptidique de Stau1 (Allison et al., 2004; Ramasamy et al., 2006). Des recherches dans les bases de données provenant du séquençage du génome humain ont permis de retrouver deux exons potentiels ayant la possibilité de coder pour le dsRBD1 de Stau1, mais un codon de terminaison est retrouvé dans l'un des deux exons (communication personnelle, L. DesGroseillers). Le dsRBD1 de Stau1 a peut-être été perdu au cours de l'évolution lors

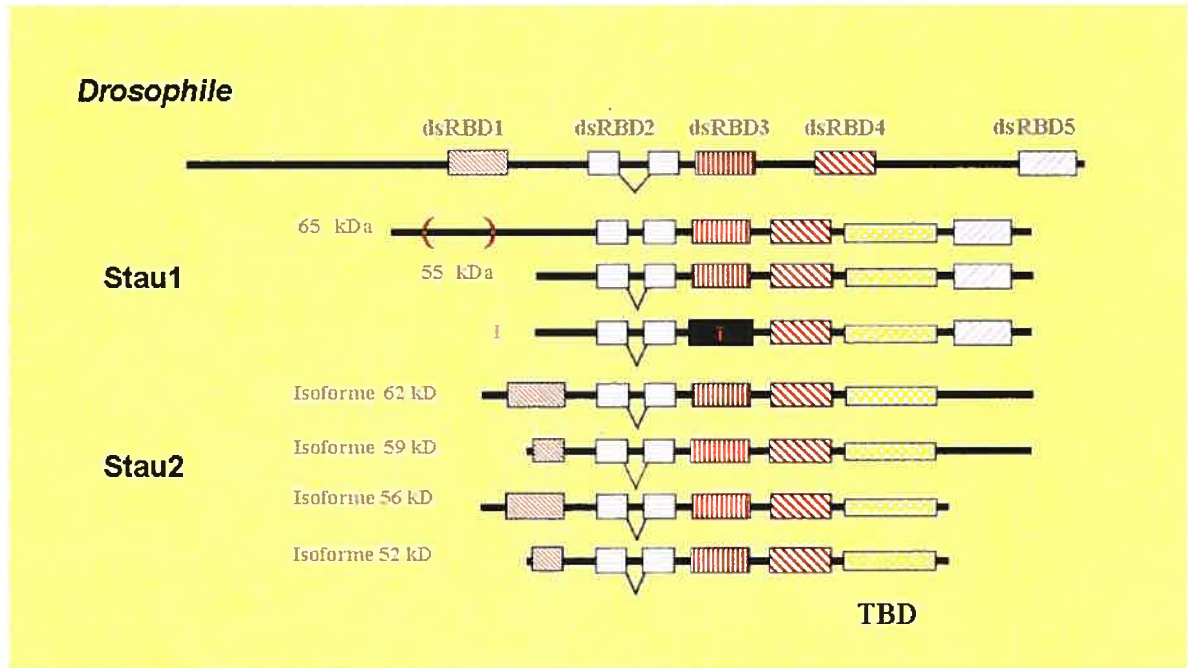


Figure 5 : Organisation des différents domaines des isoformes communs de Stau1 et Stau2 de souris et d'humain en référence à Staufen de la drosophile. (TBD : domaine de liaison à la tubuline).

d'une spécialisation des fonctions de Stau1 et Stau2. Autres divergences importantes, Stau1 et Stau2 sont beaucoup plus courtes en N-terminal que dmStau. Par contre, elles possèdent une région similaire au domaine de liaison à la tubuline de la protéine MAP2B : le TBD (tubuline binding domain), qui est absent de dmStau.

Tel que mentionné précédemment (Section 1.3.1), ce ne sont pas tous les dsRBD qui ont une activité détectable de liaison à l'ARNdb. Des expériences réalisées *in vitro* à l'aide des différents dsRBD, purifiés à partir d'extraits bactériens, ont montré que les dsRBD3 et dsRBD4 de Stau1 et de Stau2 sont les seuls à interagir avec l'ARNdb (Duchaine et al., 2002; Wickham et al., 1999). Il a été rapporté que le dsRBD1 de dmStau peut lier l'ARNdb efficacement (Micklem et al., 2000). L'absence d'activité de liaison du dsRBD1 de Stau2 pour l'ARNdb pourrait être expliquée par la substitution d'une lysine, conservée dans le domaine consensus par une sérine. Le dsRBD2, quant à lui, contient une insertion qui divise le domaine consensus en deux moitiés, l'excision de cette insertion confère au domaine le potentiel de lier l'ARNdb, du moins dans le cas de dmStau (Micklem et al., 2000). Il est important de noter que tous ces essais de liaison ont été réalisés avec des protéines recombinantes provenant d'un système de surexpression bactérien et qu'il est donc possible que l'affinité observée, *in vitro*, des divers dsRBD pour l'ARNdb ne soit pas le reflet de l'affinité *in vivo*. Des différences de conformation ou des modifications post-traductionnelles pourraient être impliquées dans l'activité de liaison des dsRBD.

La localisation intracellulaire de l'ARNm sur de longues distances s'effectue principalement sur le réseau de microtubules (Ferrandon et al., 1994; Kohrmann et al., 1999) et les granules de transport qui s'y déplacent contiennent des kinésines (Brendza et al., 2000; Kanai et al., 2004; Villace et al., 2004). Les kinésines sont une classe de moteurs moléculaires permettant un déplacement de cargo sur les microtubules. Il est donc intéressant de voir que les protéines Staufen de mammifères possèdent un domaine potentiel de liaison à la tubuline. Ce domaine pourrait théoriquement servir à ancrer les complexes de transport sur les microtubules. Le TBD de Stau1 est fonctionnel *in vitro*, son activité de liaison à la tubuline a été testée par immunobuvardage de type *Far-Western* (Wickham et al., 1999). De plus, l'expression d'un mutant de délétion de Stau2 qui ne contient pas la portion C-terminale de la protéine comprenant le TBD empêche le transport actif de l'ARNm dans les dendrites des neurones. Ce transport est dépendant des microtubules. Une description plus complète de la fonction neuronale de Stau2 sera présentée plus loin (Section 1.4.5)

1.4.2 Stau¹ : un isoforme au phénotype drastique

Lors du clonage moléculaire de Stau1 de souris (mStau1), certaines séquences présentaient une insertion de 18 nucléotides au niveau de la région codant pour le dsRBD3. Cet isoforme, Stau¹, est généré par l'utilisation d'un site accepteur alternatif lors de l'épissage (Duchaine et al., 2000). Par modélisation, il a été déduit que l'insertion de ces six acides aminés détruit presque entièrement la structure tridimensionnelle du dsRBD3, le

rendant ainsi inapte à lier l'ARN, ce qui a d'ailleurs été vérifié expérimentalement. Mais quel est le rôle de cet isoforme? Une réponse partielle à cette question est que Stau^l peut servir à réguler la quantité d'ARNm dans les complexes ribonucléoprotéiques. Étonnamment, lorsqu'introduit dans des cellules en quantité limitée, Stau^l est associé au réticulum endoplasmique rugueux et possède la même distribution tubulo-vésiculaire que la protéine de type sauvage. Cependant une surexpression de Stau^l entraîne un phénotype cellulaire très particulier : la formation de très larges granules cytoplasmiques contenant de la calnexine, un marqueur du RER. Ceci pourrait n'être qu'un artefact de surexpression, mais la co-transfection de mStau et mStau^l permet de relocaliser mStau^l à la surface périnucléaire et entraîne une disparition des énormes granules cytoplasmiques. Puisque Stau^l et Stau font parti des mêmes complexes, la balance entre les deux isoformes peut être importante pour une activité normale de recrutement et de transport de l'ARNm. L'isoforme Stau^l a été retrouvé dans tous les tissus et types cellulaires testés de souris, de singe et d'humain, cependant le rapport entre l'isoforme l et la forme sauvage peut varier. Il semble que les lignées cellulaires immortalisées possèdent un plus faible rapport Stau^l/Stau, ce qui peut indiquer une différence dans la régulation de l'épissage alternatif dans ces cellules ou l'importance du rapport entre ces deux formes de Stau l pour la physiologie cellulaire normale.

1.4.3 Transport nucléo-cytoplasmique de Stau1

La synthèse de l'ARNm ayant lieu au sein du noyau, plusieurs protéines liant l'ARN transitent entre le noyau et le cytoplasme pour transporter leurs cargos d'un site à l'autre. La première observation de Stau1 dans le noyau est venue du groupe de Juan Ortín qui, en microscopie par immunofluorescence, a détecté hStau1 principalement dans le cytoplasme, associé au RER, mais également à un faible niveau dans le noyau (Marion et al., 1999). Cependant, dans la majorité des cas, Stau1 n'est pas détectable dans le noyau. L'analyse de la séquence en acides aminés de Stau1 a révélé la présence d'un motif de localisation nucléaire (NLS) bipartite (Martel et al., 2006). La fonctionnalité de ce NLS a été prouvée par un essai d'import nucléaire chez la levure. Des travaux effectués à l'aide de cellules HeLa ont montré que l'inhibition des voies d'export nucléaire dépendantes de l'exportine 5 (Exp5), voie privilégiée d'export des protéines à dsRBD, ou de CRM1 ne permettent pas une accumulation nucléaire de Stau1. Deux hypothèses ont été développées pour tenter de réconcilier l'activité du NLS et la quasi absence de Stau1 dans le noyau en conditions normales. Premièrement, la présence d'un transit nucléo-cytoplasmique rapide qui ne permet pas une accumulation de Stau1 au noyau ou, deuxièmement, une rétention cytoplasmique forte de Stau1. Il est à noter que ces deux mécanismes ne sont pas mutuellement exclusifs. La génération d'une multitude de mutants de délétion et de mutants ponctuels de Stau1 a montré le rôle prépondérant du dsRBD3 dans le mécanisme de rétention cytoplasmique. Sans décrire en détails les conclusions tirées de l'analyse de l'activité de transit nucléaire de ces diverses constructions, il faut retenir que Stau1 peut

effectivement se rendre au noyau et au nucléole et que cette localisation semble être fortement régulée par plusieurs déterminants dont les dsRBD2 et 4.

Stau2 est également soumis à un transit nucléo-cytoplasmique. La littérature sur Stau2 présente souvent, à tort, la protéine comme étant spécifique aux neurones (Goetze et al., 2006; Macchi et al., 2004). Il est vrai que l'expression est élevée dans les neurones, mais Stau2 est également détectée dans le cœur, le rein, les testicules, les ovaires, les oligodendrocytes et plusieurs autres types cellulaires (Duchaine et al., 2002; Thomas et al., 2005). Comme pour Stau1, il est possible d'observer une faible quantité de Stau2 dans le noyau/nucléole de cellules en culture. Stau2 possède également un NLS bipartite localisé entre le dsRBD3 et 4. Le dsRBD3 de Stau2 peut interagir directement avec Exp5 et ce uniquement si l'activité de liaison à l'ARN est intacte. De plus, la sous-expression de Exp5, induite par siRNA, entraîne une accumulation nucléaire préférentielle de l'isoforme long de Stau2 (Stau2⁶²) (Macchi et al., 2004). Dans ce même article, l'utilisation de l'inhibiteur de la voie d'export CRM1, la leptomycine B, n'entraîne pas d'accumulation nucléaire de Stau2⁶² ou de l'isoforme court, Stau2⁵⁹.

Une autre équipe s'est intéressée à la localisation nucléaire de Stau2 avec des résultats partiellement contradictoires qui peuvent être réconciliés (Miki et Yoneda, 2004). Cette étude suggère que l'export nucléaire de Stau2⁶² est dépendant de la voie Exp5. L'utilisation d'un mutant ponctuel qui détruit la stabilité du dsRBD3 de Stau2⁶² entraîne son accumulation nucléaire. Par contre, Stau2⁵⁹ n'est pas accumulé dans le noyau s'il

possède la même mutation. L'analyse de la séquence en acides aminés de Stau2⁵⁹ indique la présence, en N-terminal, d'un motif consensus d'interaction avec CRM1. Cette séquence n'est pas présente chez Stau2⁶². L'utilisation de la leptomycine B, bloqueur de la voie d'export CRM1, ou la sous-expression de CRM1 par siRNA, entraîne une accumulation nucléaire de Stau⁵⁹ dont le dsRBD3 est muté, mais pas de la forme sauvage.

Résumons ces observations dans leur ensemble, Stau2⁶² est exporté du noyau via Exp5, Stau2⁵⁹ l'est également, mais uniquement d'une manière détectable si la voie CRM1 est simultanément inhibée. Cette distinction entre les voies d'export de Stau2⁵⁹ et de Stau2⁶² a été soulignée par d'autres travaux s'intéressant à un partenaire protéique de Stau2, soit la protéine ZFR. La sous-expression de ZFR dans des neurones en culture primaire entraîne une accumulation nucléaire de Stau2⁶² uniquement et n'affecte pas la localisation intracellulaire de Stau2⁵⁹ (Elvira et al., 2006a). Il est donc possible de se demander si l'inhibition conjointe des voies Exp5 et CRM1 aurait pu avoir un impact sur l'accumulation nucléaire de Stau1 en regard des travaux effectués avec Stau2.

1.4.4 Staufen est associé aux ribosomes et joue un rôle dans la traduction

Le lien entre une protéine à dsRBD et la traduction a été évoqué précédemment dans le cas de l'hélicase RHA (Section 1.2.2.2). Puisqu'il a été montré que Stau1 et Stau2 co-fractionnent avec les ribosomes et les polysomes dans des gradients de saccharose (Duchaine et al., 2002; Luo et al., 2002), un rôle pour Staufen dans la traduction peut être suggéré. Ce rôle a déjà été observé chez la drosophile, car Staufen y est impliqué dans la

dérépression traductionnelle de l'ARNm oskar (Micklem et al., 2000). Pour tester la fonction de Stau1 sur l'activation traductionnelle d'un ARNm réprimé, un système rapporteur utilisant l'élément TAR du VIH-1 fut utilisé (Dugre-Brisson et al., 2005). L'élément TAR est une tige boucle retrouvée à l'extrémité de tous les transcrits du VIH-1, elle est responsable de la répression traductionnelle de ces ARNm en empêchant la fixation des facteurs d'initiation qui reconnaissent la structure de coiffe 5'. Plusieurs protéines peuvent interagir avec l'élément TAR, dont PKR, TRBP, l'auto-antigène La et la protéine virale Tat. L'insertion de l'élément TAR en 5' de la luciférase ou de la transférase d'acétyle du chloramphénicol (CAT) réprime la traduction de ces rapporteurs. Le rapporteur TAR-CAT a été utilisé dans des expériences de traduction *in vitro*, dans des extraits de réticulocytes, et le rapporteur TAR-luciférase a été utilisé *in vivo*, dans les cellules 293T. Dans ces deux systèmes, l'ajout ou la transfection de quantités croissantes de Stau1 se traduit par une augmentation de la synthèse protéique de TAR-CAT ou de TAR-luciférase, mais pas par une augmentation générale de la traduction. De plus, l'analyse par buvardage de type *Northern* de l'ARN isolé des diverses fractions cellulaires sur un gradient de saccharose, indique que le rapporteur TAR-luciférase est bel et bien déplacé vers les fractions de polysomes plus lourdes en fonction de quantité croissante de Stau1. L'interaction entre Stau1 et TAR n'est peut-être pas artificielle, car Stau1 est encapsidé avec le VIH-1 (Mouland et al., 2000) et aurait donc possiblement un rôle à jouer dans la traduction des messagers viraux.

1.4.5 Staufen et transport dendritique d'ARNm

Un type cellulaire idéal pour étudier la localisation intracellulaire d'ARNm sur de longues distances est le neurone. La traduction locale post-synaptique d'ARNm au niveau des dendrites est importante pour le remodelage des synapses et pour l'acquisition de certains types de mémoire.

1.4.5.1 Traduction locale d'ARNm et mémoire

Un phénomène biochimique relié à l'apprentissage chez les mammifères est la potentialisation à long terme (LTP) dépendante de l'activation du récepteur NMDA (N-méthyl-D-aspartate) (Steward et Worley, 2002). Le mécanisme est le suivant : l'activité pré-synaptique entraîne l'activation du récepteur NMDA, ce qui active certaines kinases au niveau du neurone post-synaptique, dont la calmoduline kinase II et la protéine kinase dépendante de l'AMPc (PKA). PKA active ensuite les MAP kinases qui sont transloquées au noyau où elles phosphorylent le facteur de transcription CREB et la transcription des gènes de réponse immédiate débute (Hu et al., 2002). Un des transcrit exprimé code pour la protéine Arc (*Activity-regulated cytoskeleton-associated protein*), une protéine associée au cytosquelette. L'ARNm nouvellement transcrit de Arc est alors transporté jusqu'aux dendrites à l'endroit précis de la synapse activée (Steward et al., 1998; Steward et Worley, 2001) où il est localement traduit. La protéine Arc jouerait un rôle de générateur dans le réarrangement de la synapse impliquant l'actine F (Lyford et al., 1995).

Plusieurs autres travaux ont montré la localisation dendritique d'ARNm. La liste des ARNm potentiellement localisés aux dendrites a récemment atteint le nombre de 400 (Eberwine et al., 2002). De ces ARNm, certains encodent des protéines dont la fonction dendritique est mieux connue comme dans le cas de la protéine Arc. Un autre ARNm, celui de la sous-unité alpha de la calmoduline kinase II (CaMKII α), a été la cible d'études s'intéressant à son transport et à sa régulation traductionnelle dans les dendrites. En effet, les événements biochimiques qui permettent le transport dendritique de l'ARNm sont aussi importants que les événements permettant la répression traductionnelle de ces mêmes messagers durant leur transport. Afin de bien illustrer ces deux mécanismes nous prendrons pour exemple l'ARNm de la CaMKII α .

Cet ARNm est localisé dans les dendrites après la reconnaissance, par divers facteurs, de signaux de localisation dendritique situés dans son 3'-UTR (Mayford et al., 1996). Un modèle d'étude murin a été obtenu par délétion des signaux de localisation dendritique de l'ARNm de CaMKII α . Cette souris a été générée par mutagenèse ciblée au niveau du locus du gène *CamKII α* . La région 3'UTR de CaMKII α de 3.1 kb fut remplacée par la région 3'UTR du gène de l'hormone de croissance bovine d'une longueur de 312 pb. Des travaux utilisant cette souris ont permis de montrer que la distribution de la protéine CaMKII α était limitée au soma du neurone. Cette absence de la protéine au niveau des dendrites semble être responsable d'une diminution de formation de la LTP et de problèmes de mémoire spatiale, de mémoire associative et de mémoire de reconnaissance (Miller et

al., 2002). Il est donc important que l'ARNm de CaMKII α soit transporté jusqu'aux dendrites. Une fois le transcrit localisé, il est établi que le contrôle de sa traduction s'effectue principalement par l'addition d'une queue homopolymérique d'adénine (poly-A+) (Huang et al., 2002). Cette addition d'une queue poly-A+ est dépendante de l'activation du récepteur NMDA. Il a également été démontré que l'activation du récepteur NMDA entraîne l'activation de la kinase Aurora qui phosphoryle le facteur CPEB, événement qui permet le recrutement de la Poly-A-polymérase (PAP) et de la Poly-A binding protein (PABP) sur l'ARNm (Huang et al., 2003). Il est par contre important de souligner que l'analyse semi-quantitative du niveau d'expression de l'ARNm chimérique de CaMKII α montre une diminution très prononcée du signal dans les dendrites (1,4% du type sauvage), mais que cette diminution n'est pas corrélée par une augmentation du signal dans le soma (85% du type sauvage). Ces souris possèdent donc moins d'ARNm codant pour CaMKII α et ceci pourrait théoriquement être responsable d'une partie des effets observés sur la mémoire.

1.4.5.2 Stau1 et Stau2 sont retrouvés dans des granules de transport au niveau des dendrites

Dans les neurones, une sous-population de protéines est retrouvée dans les dendrites. Ces protéines possèdent de multiples fonctions : récepteurs, canaux ioniques, kinases, phosphatases et plusieurs autres groupes de protéines ayant un rôle à jouer dans la signalisation cellulaire. Tel que mentionné précédemment, certaines de ces protéines sont traduites localement et leur ARNm doit donc être transporté au site de traduction

éventuelle. Les ARNm sont transportés le long des microtubules à l'intérieur de complexes ribonucléoprotéiques de tailles importantes, appelés granules de transport d'ARNm. Stau1 et Stau2 sont des composantes de tels granules dans les neurones (Duchaine et al., 2002; Kanai et al., 2004; Kohrmann et al., 1999; Mallardo et al., 2003; Tang et al., 2001). La simple co-localisation d'une protéine avec ces granules n'indique pas l'importance de celle-ci dans le mécanisme de transport ou d'assemblage de ces complexes.

Les premières données sur un rôle primordial de Stau2 dans le transport dendritique de l'ARNm sont venues de l'expression dans des neurones en culture d'un dominant négatif de cette protéine qui consiste en une version tronquée de Stau2 (Stau2-RBD) (Tang et al., 2001). En fait, ce mutant de délétion contient la portion N-terminale de Stau2 jusqu'au dsRBD4, le TBD et la portion C-terminale étant absents. L'expression de Stau2-RBD diminue la quantité d'ARNm dans les dendrites et cette diminution est corrélée par une augmentation de la quantité d'ARNm au niveau du soma, ce qui suggère que Stau2-RBD n'entraîne pas une déstabilisation de l'ARNm dendritique, mais bien que le transport de l'ARNm est réduit. À l'inverse, la surexpression de Stau2 de type sauvage se traduit par une augmentation de la quantité d'ARNm dans les dendrites, autant au niveau des dendrites proximaux que distaux. En accord avec les résultats précédents, une diminution de la quantité d'ARNm somatique est alors observée. Ces résultats ont été appuyés récemment par d'autres travaux (Kim et al., 2005a; Kim et Kim, 2005) qui ont démontré une diminution du nombre de ribosomes dans les dendrites lorsque Stau2-RBD est exprimé dans les neurones. De plus, une corrélation directe entre Stau2 et la physiologie dendritique

a été montrée par des expériences de sous-expression de Stau2 induite par siRNA (Goetze et al., 2006). Les neurones présentent alors beaucoup moins d'épines dendritiques représentant les sites synaptiques.

D'autres travaux ont également montré un rôle de Stau1 dans le transport dendritique de l'ARNm CamKII α (Kanai et al., 2004). En effet, la sous-expression de Stau1 induite par siRNA entraîne une diminution de la localisation dendritique d'un messenger rapporteur encodant CamKII α .

1.4.6 Partenaires protéiques de Stau1

Puisque Stau1 et Stau2 co-localisent avec les polysomes, sont associés au RER, sont retrouvés dans des granules de transport neuronaux et transitent au noyau, deux études se sont intéressées à purifier les complexes ribonucléoprotéiques contenant Stau1 et d'en identifier les constituants par spectrométrie de masse. Dans un cas, Stau1 a été purifié en une seule étape de chromatographie par affinité pour un épitope PDZ (Brendel et al., 2004), dans l'autre cas, la purification a été effectuée en deux étapes par l'utilisation du système TAP (Villace et al., 2004). Les Tableau II et Tableau III présentent les protéines identifiées dans chacune de ces expériences. Il est à noter que la plupart des protéines identifiées sont communes aux deux approches de purification si on ajoute les résultats obtenus à partir d'immunobuvardages de type *Western* en plus des données de spectrométrie de masse. Ces protéines peuvent être classées en différentes catégories :

- Des protéines ribosomiques et des protéines ayant un rôle à jouer dans le contrôle de la synthèse protéique.
- Des protéines du cytosquelette et des facteurs de régulation de la dynamique du cytosquelette, ainsi que des protéines moteurs.
- Des protéines majoritairement nucléaires comme la nucléoline et RHA.

Ces diverses classes de protéines possèdent des fonctions qui sont en accord avec les différents rôles de Stau1, allant du transport de l'ARN sur de longues distances au contrôle traductionnel. Par contre, plusieurs de ces interactions sont dépendantes de l'ARN et il ne faut donc pas en conclure à des interactions directes entre Stau1 et toutes les protéines identifiées, ce qui est logique, puisque ce sont des complexes ribonucléoprotéiques qui ont été isolés. Il n'y a pas que le contenu protéique des complexes qui soit important à caractériser, le sous-chapitre suivant s'intéresse aux méthodes expérimentales qui sont disponibles afin d'identifier les ARNm associés à une protéine liant l'ARN.

Tableau II : Protéines associées à Stau1-TAP

Protein	Accession no.	Identification technique		
		Mass spectrometry	Western blot	Confocal immunofluorescence
β -5 Tubulin	gi 18088719	-(187 ^a)	-	+
α -Tubulin		-	-	+
Tau		-	-	+
hStaufen isoform 2	gi 10944134	-(273)	-	+
β -Actin		-	-	+
Myosin heavy chain	gi 7669506	+(103)	NT	NT
RNA-dependent RNA helicase A	gi 3915658	+(139)	-	+
Nucleolin	gi 21750187	-(86)	-	+
hnRNP U (SAF A)	gi 14044052	-(91)	-	-
Poly(A)-binding protein	gi 4505575	+(107)	-	+
α -Internexin (neuronal intermediate filament)	gi 14249342	-(77)	-	+
Dynein intermediate chain	-	-	-	-
Kinesin		-	-	+
P-Associated protein kinase II	gi 4759044	+(74)	NT	NT
Ras GAP	gi 627594	+(74)	NT	NT
Rac1		-	-	+
Cdc42		-	-	+
IQGAP1 protein	gi 4506787	+(87)	-	+
FMRP		-	-	+
Ribosomal protein P0	gi 12654583	-(120)	NT	NT
Ribosomal protein S4 ^b	gi 539681	+(150)	NT	NT
Ribosomal protein S6	gi 20381196	-(120)	-	+
Ribosomal protein L6 ^b	gi 18088374	-(103)	NT	NT
Ribosomal protein L28	gi 13904866	-(116)	-	+

Le tableau indique les protéines associées à Stau1 qui ont été identifiées soit par spectrométrie de masse, soit par immunobuvardage de type *Western*, soit par immunofluorescence. Tableau tiré de Villace et al. (2004).

Tableau III: Protéines associées à Stau1-PDZ.

Protéine	GenBank [®] accession no.	MS	Western blot	Band size (kDa)
RNAH	NP_076950	+	n.d.	150
hnRNP U (SAFA)	NP_114032	+	+	120
NFAR	Q12906	+	n.d.	110
Kinesin heavy chain	A41919	-	+	110
Nucleolin	NP_005372	+	+	105
PABP	P11940	-	+	75
FMRP	Q06787	-	+	75
Dynein intermediate chain	Q14576	-	+	70
β 4-Tubulin	Q13509	+	n.d.	50
α -Tubulin	P05209	-	+	50
EF1 α	Q4434756	-	-	50
Ribosomal protein P0	NP_000933	+	+	34
Ribosomal protein L6	A4H20679	+	n.d.	34
Ribosomal protein S2	NP_002943	+	n.d.	32
Ribosomal protein S6	P10660	+	+	32
Ribosomal protein S3a	L13902	+	n.d.	30
Ribosomal protein L7a	NP_000963	+	+	30
Ribosomal protein S9	S11415	+	n.d.	28
Ribosomal protein L14	P50914	+	n.d.	27
Ribosomal protein L10	S34425	+	n.d.	26
Ribosomal protein L15	P61313	+	n.d.	26
Ribosomal protein L21	S55913	+	n.d.	20

Le tableau indique les protéines associées à Stau1 qui ont été identifiées soit par spectrométrie de masse, soit par immunobuvardage de type *Western*. Tableau tiré de Brendel et al. (2004)

1.5 Approches d'identification globale des ARNm interagissant avec les protéines liant l'ARN.

Il est très rare qu'une protéine liant l'ARN ne possède qu'un seul ARNm cible. La littérature recense différentes approches qui ont été utilisées afin d'identifier plusieurs ARNm associés à une protéine. La présentation de ces techniques, ainsi qu'une description de leurs limitations, avantages et inconvénients, sera l'objet des sections suivantes.

1.5.1 SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*)

L'approche Selex consiste à enrichir, *in vitro*, une sous-population d'ARN qui possède une affinité élevée pour la protéine testée. Cette méthode a été utilisée avec succès pour diverses protéines, dont FMRP (Darnell et al., 2001), QKI (Galameau et Richard, 2005), ainsi que les dsRBD2 de ADAR1 et XlrpA (Hallegger et al., 2006). La technique Selex est basée sur le postulat que dans une très grande population de molécules d'ARN randomisées certaines sont « actives » et ont la capacité d'interagir avec la protéine d'intérêt. L'enrichissement des molécules « actives » se fait ensuite par des rondes subséquentes de RT-PCR et de transcription *in vitro*. La banque d'oligonucléotides de départ peut compter jusqu'à environ 1×10^{15} molécules uniques.

Le Selex est plus approprié pour enrichir les ligands des protéines ayant des domaines d'interaction à l'ARN simple brin. En effet, il est plus simple de ressortir une séquence consensus de liaison qu'une structure en double brins. Ceci peut s'expliquer par le

fait que lors des rondes d'enrichissement, l'évolution de chaque nucléotide d'une séquence simple brin se fait indépendamment des autres nucléotides, tandis que dans une séquence en double brins, il doit y avoir coévolution des nucléotides pairés.

Les avantages principaux du Selex sont la rapidité d'exécution de la technique et l'absence de variations d'ordre biologique. Cependant, le Selex ne permet pas d'identifier directement des cibles cellulaires d'une protéine, il faut passer par une approche bioinformatique afin d'aller chercher quels ARNm cellulaires contiennent la séquence consensus. Cette tâche est encore plus ardue lors de la recherche d'un motif structural.

1.5.2 Co-immunoprécipitation de l'ARNm

L'immunoprécipitation (IP), l'utilisation d'anticorps hautement spécifiques pour purifier des protéines à partir d'extraits cellulaires, est une technique courante utilisée depuis des décennies. Une variation de cette technique est de réaliser l'IP dans des conditions plus douces où la protéine, contre laquelle l'anticorps est dirigé, est co-purifiée en complexe avec ses partenaires protéiques et/ou acides nucléiques associés. Il est alors possible d'isoler ces composantes et de les identifier par une multitude d'approches : immunobuvardage de type *Western* ou spectrométrie de masse pour les composantes protéiques et clonage ou utilisation de micropuces d'ADN pour les composantes d'acides nucléiques.

Une des premières utilisations de cette approche pour identifier les ARNm associés à diverses protéines liant l'ARN a été effectuée par l'équipe de Keene (Tenenbaum et al.,

2000). Dans ces travaux, trois protéines, soit HuB, eIF4-E et PABP, ont été immunoprécipitées à partir d'extraits de cellules souches de carcinome embryonnaire. L'ARNm isolé des complexes ribonucléoprotéiques obtenus a été utilisé pour synthétiser des sondes afin d'hybrider des micropuces d'ADN. La démonstration de la validité de cette approche est venue de deux observations : 1- Les sous-populations d'ARNm associées à chacune de ces protéines sont distinctes entre elles et sont également distinctes du profil d'ARNm cellulaire total. 2- Le traitement des cellules avec de l'acide rétinoïque, qui induit une différenciation cellulaire, modifie la composition en ARNm des complexes ribonucléoprotéiques isolés, démontrant une dynamique dans la reconnaissance et l'association des ARNm à ces protéines.

L'utilisation conjointe de l'IP et des micropuces d'ADN a depuis été utilisée avec succès pour découvrir le contenu en ARNm des complexes associés à FMRP (Brown et al., 2001), SLBP (Townley-Tilson et al., 2006) et YB-1 (Evdokimova et al., 2006).

1.5.3 Amplification d'ARN par positionnement d'anticorps (APRA)

Une approche innovatrice développée par l'équipe de J. Eberwine a été utilisée pour identifier les ARNm qui sont à proximité d'une protéine dans un complexe (Miyashiro et al., 2003). En effet, certains complexes ribonucléoprotéiques sont très larges, plus de 10 millions de Dalton, et il est donc fort probable qu'un ARNm identifié comme faisant partie d'un complexe ne soit pas nécessairement lié directement par toutes les protéines du complexe. De là l'importance de pouvoir discriminer quels sont les ARNm les plus

rapprochés de la protéine d'intérêt. La technique APRA consiste à attacher par un lien covalent un oligonucléotide d'ADN à un anticorps. L'oligonucléotide contient une région 3' dégénérée, le promoteur de l'ARN polymérase T7 et un site de restriction. La rationnelle derrière cette approche est que si l'anticorps va se fixer sur la protéine d'intérêt, alors la région dégénérée de l'oligonucléotide peut s'apparier avec un ARNm environnant. Il s'agit ensuite d'effectuer une reverse transcription *in situ*, de purifier l'anticorps, de synthétiser le second brin du cDNA, de détacher le cDNA de l'anticorps avec une enzyme de restriction et, finalement, de synthétiser des sondes d'ARN pour hybrider des micropuces d'ADN.

L'approche APRA possède quelques limitations, l'anticorps doit être très spécifique pour la protéine d'intérêt et la liaison de l'anticorps à l'antigène doit prévaloir sur l'affinité de l'oligonucléotide à s'hybrider sur les acides nucléiques. Un avantage de cette technique est que l'association de l'anticorps se fait *in situ*, dans un contexte physiologique où les complexes ribonucléoprotéiques sont dans leur état natif et non pas dans un extrait cellulaire.

1.5.4 Purification de l'ARNm par affinité

Une approche inverse existe également, c'est-à-dire que pour démontrer qu'une protéine s'associe effectivement avec un ARNm ou pour découvrir toutes les protéines associées à un ARNm particulier, il est possible de purifier directement un ARNm à partir d'un extrait cellulaire et d'identifier les protéines qui y sont liées. Deux méthodes équivalentes seront présentées.

La première technique consiste à incuber un extrait cellulaire avec un oligonucléotide de séquence complémentaire avec une région de l'ARNm à être purifié. Le duplex formé entre l'ARNm cible et l'oligonucléotide, qui est biotinylé, est purifié sur une colonne d'affinité utilisant l'avidine comme ligand. Cette approche a été utilisée pour purifier l'ARN génomique du virus HCV et identifier toutes les protéines associées (Waris et al., 2004).

La seconde technique se résume à fusionner une séquence de 40 nucléotides à un ARNm, cette séquence se replie en une structure qui possède une très forte affinité pour l'antibiotique tobramycine. L'ARNm et les protéines associées sont purifiés par affinité sur une résine couplée à la tobramycine. Cette approche a été utilisée pour identifier les composantes protéiques du « spliceosome » (Hartmuth et al., 2002; Hartmuth et al., 2004).

1.6 ARNm et facteurs d'instabilité

La demi-vie de l'ARNm est influencée par les protéines qui lui sont associées. Dans cette section, il sera question des mécanismes généraux de déstabilisation des ARNm.

1.6.1 Séquence riche en AU et polyadénylation

Les ARNm sont stabilisés dans la cellule par deux structures : la coiffe 5' constituée d'un résidu 7-méthylguanosine en lien 5'-5' triphosphate avec le premier nucléotide du transcrit et la queue de polyadénosines en 3'. Cet effet de stabilisation s'explique par le fait que ces éléments empêchent le recrutement sur l'ARNm des nucléases impliquées dans la

dégradation (Bernstein et al., 1989; Bernstein et Ross, 1989; Filipowicz, 1978). La queue de polyadénosines est liée sur toute sa longueur par la protéine PABP (*poly-A-binding protein*). Si PABP se détache de la queue de polyadénosines, de multiples nucléases peuvent s'y associer et débiter sa dégradation dans la direction 3'→5'. Les principales nucléases incluent PAN (*poly-A nuclease*), PARN (*poly-A-specific ribonuclease*) et le complexe de déadénylation CCR4-NOT (Albert et al., 2000; Beelman et Parker, 1995; Uchida et al., 2004). Ensuite, deux voies de dégradation de l'ARNm sont présentes dans la cellule :

- la dégradation 5'→3' exécutée par l'exonucléase Xrn1 suivant l'enlèvement de la coiffe 5' par Dcp2 (Bashkirov et al., 1997; Lykke-Andersen, 2002)
- la dégradation 3'→5' exécutée par l'exosome (Anderson et Parker, 1998; Chen et al., 2001)

La demi-vie de la plupart des ARNm découle d'un équilibre entre la liberté d'accès des facteurs de dégradation aux extrémités 5' et 3' du transcrit et la protection de ces mêmes extrémités par plusieurs protéines dont certains facteurs d'initiation de la traduction et PABP. Par contre, il est possible de moduler ou de faciliter l'accès des facteurs de dégradation sur un ARNm et le mécanisme le plus connu fait appel aux régions riches en AU (adénosines et uridine).

La demi-vie de 5 à 8 % des ARNm serait contrôlée par la présence dans leur portion 3'UTR d'une région riche en AU (Bakheet et al., 2003). Les AUBP (*AU-rich binding*

proteins), dont la tristétrapoline (TTP)(Blackshear, 2002), AUF1 (Wagner et al., 1998) et les membres de la famille Hu/ELAV (Brennan et Steitz, 2001) reconnaissent spécifiquement ces régions. TTP et AUF1 ont des effets déstabilisants, tandis que les protéines Hu stabilisent l'ARNm. De multiples stimuli peuvent affecter les niveaux cellulaires de ces protéines qui sont en compétition entre elles pour la liaison aux régions AU riches.

Prenons l'exemple de AUF1 pour mieux saisir comment les AUBP modifient la stabilité des transcrits. Il est postulé que les ARNm activement traduits sont circularisés via une interaction entre PABP et le facteur d'initiation de la traduction eIF4G (Hentze, 1997). En plus de sa capacité à s'associer aux régions riches en AU, AUF1 interagit également avec eIF4G et PABP (Laroia et al., 1999), il est donc probable que AUF1 inhibe la circularisation de l'ARNm ce qui faciliterait le recrutement des facteurs de dégradation.

1.6.2 NMD « *Nonsense-mediated decay* »

Le codon stop, ou non-sens, signale à l'outillage traductionnel la fin de la séquence peptidique encodée par le cadre ouvert de lecture de l'ARNm. Il arrive qu'une mutation ou un épissage déficient fasse apparaître un codon stop prématuré dans la séquence codante d'un ARNm, ce qui peut entraîner la synthèse d'une protéine tronquée ayant potentiellement des effets délétères sur le métabolisme cellulaire (Frischmeyer et Dietz, 1999). Pourtant, il est très rare que ces versions tronquées de protéines soient synthétisées, car la cellule possède un mécanisme de reconnaissance et de destruction de ces formes

altérées d'ARNm. Mais comment la cellule fait-elle pour différencier le codon stop endogène d'un codon stop inapproprié? Étonnamment, la réponse à cette question est qu'il existe une relation entre les événements d'épissage du pré-ARNm et la première ronde de traduction de l'ARNm néo-synthétisé, également nommée ronde pionnière de traduction (Ishigaki et al., 2001; Le Hir et al., 2001; Le Hir et al., 2000a; Le Hir et al., 2000b). Nous nous intéresserons surtout au mécanisme du NMD chez les mammifères. Des variations mécanistiques existent chez la levure (Amrani et al., 2004), la drosophile (Gatfield et Izaurralde, 2004) et les plantes (Arciga-Reyes et al., 2006), cependant l'objet de cette section n'est pas de présenter exhaustivement toute la littérature sur le sujet, mais plutôt de présenter l'essentiel de ce système de contrôle de la qualité qu'est le NMD.

Lors de la transcription en ARNm des gènes contenant des introns, il y a dépôt d'un complexe protéique au niveau de chacune des jonctions exon-exon (Le Hir et al., 2000a; Le Hir et al., 2000b). Ce complexe, le complexe de jonction exon-exon (EJC), contient au moins cinq protéines : SRm160, DEK, RNPS1, Y14 et REF qui sont associées fortement entre elles et qui se retrouvent 20 à 24 nucléotides en amont de la jonction exon-exon. D'autres facteurs s'associent à l'EJC de manière transitoire comme les protéines eIF4AIII et Barentsz (Palacios et al., 2004) ainsi que la famille d'hélicase d'ARN Upf qui contient trois membres : Upf1, Upf2 et Upf3 (Kashima et al., 2006; Kunz et al., 2006).

Lors de l'export de l'ARNm du noyau, la coiffe 7-méthylguanosine est liée par l'hétérodimère CBP20.CBP80 (Calero et al., 2002). Ces ARNm possèdent également des

EJC à chaque jonction exon-exon et ont la capacité de recruter le ribosome et d'être traduit indépendamment de eIF4E, le facteur d'initiation normalement retrouvé associé à la coiffe des ARNm activement traduits (Chiu et al., 2004). Au moment de la ronde pionnière de traduction, le ribosome se déplace le long de l'ARNm et enlève les EJC lorsqu'il les rencontre. Cependant, si le ribosome fait une pause sur un codon stop qui se trouve à plus d'une vingtaine de nucléotides en amont d'un EJC, il y aura interaction entre les deux facteurs de terminaison de la traduction eRF1 et eRF3, et la protéine Upf1 qui est alors recrutée sur l'EJC par le dimère pré-assemblé Upf2/Upf3 (Kashima et al., 2006). L'interaction entre Upf1 et Upf2 est également stimulée par CBP80 (Hosoda et al., 2005). Ensuite, la kinase SMG1 phosphoryle Upf1 et l'ARNm est alors ciblé vers la voie de dégradation. Les événements moléculaires suivant la phosphorylation de Upf1 sont, par contre, moins bien connus.

Le NMD ne s'attaque pas à la majorité des ARNm cellulaires, car la plupart d'entre eux possèdent le codon de terminaison dans le dernier exon et qu'il n'y a donc pas d'EJC en aval du codon stop endogène. Cependant, les ARNm encodant des protéines à sélénocystéines (un acide aminé non classique spécifié par le codon de terminaison UGA (Sun et al., 2001b)), les ARNm ayant de courts cadres de lecture ouverts en 5' et les ARNm dont le 3'UTR est formé à partir de plus d'un exon, sont tous des cibles potentielles du NMD (Mendell et al., 2004). Donc le NMD, en plus de son rôle dans le contrôle de la qualité des ARNm, sert également à réguler la quantité de certains transcrits normaux.

1.7 Projet de recherche

Les résultats qui seront présentés dans cette thèse ont été obtenus en étudiant principalement trois thèmes se rapportant aux rôles physiologiques des protéines Staufen de mammifères. Premièrement, nous avons voulu identifier les ARNm liés *in vivo* par Stau1. Tel que mentionné précédemment, les protéines à dsRBD présentent souvent peu de spécificité de liaison pour différents ARN en double brins *in vitro*. Nous avons donc utilisé une approche combinant l'immunoprécipitation de Stau1 suivie par l'hybridation de micropuces d'ADN, afin de découvrir l'identité des ARNm associés à Stau1. Plusieurs transcrits liant potentiellement Stau1 ont ainsi été découverts.

Deuxièmement, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des régions de certains de ces transcrits qui sont responsables de l'association à Stau1. Parmi ces ARNm, celui de Arf1 (*ADP-ribosylation factor-1*) fut particulièrement étudié. Cet ARNm contient une région en son 3'UTR qui est responsable de la liaison à Stau1. De plus, le recrutement par Stau1 de la protéine Upf1 au niveau du 3'UTR de Arf1 entraîne la dégradation du transcrit. Une étude plus approfondie du mécanisme moléculaire responsable de cette dégradation a conduit à l'identification d'un nouveau mode de régulation post-transcriptionnel de l'expression génétique que nous avons nommé le SMD (*Staufen-mediated decay*). Dans le but de mieux saisir l'importance du SMD dans le métabolisme cellulaire, nous avons entrepris l'identification globale des ARNm dont la stabilité est affectée par Stau1.

Finalement, nous avons tenté de déterminer si Stau1 et Stau2 sont associés aux mêmes ARNm dans la cellule. L'utilisation de micropuces d'ADN nous a permis d'identifier des sous-populations d'ARNm enrichies spécifiquement avec l'une ou l'autre de ces deux protéines. Les prochains chapitres, présentés sous forme d'articles scientifiques, contiennent les résultats obtenus au cours de ces travaux.

Résultats

2 Article 1

Kim, Y. K., Furic, L., Desgroseillers, L., and Maquat, L. E. (2005). Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* 120, 195-208.

2.1 Mise en contexte

Les travaux présentés dans cet article ont été effectués suite à la découverte d'une interaction directe entre la protéine Stau1 et l'hélicase d'ARN Upf1 qui est impliquée dans le NMD. Il a alors été entrepris de caractériser le rôle de cette interaction sur le mécanisme du NMD. Parallèlement, nous avons identifiés des ARNm associés à Stau1 dans des cellules humaines 293T. Un impact possible de l'interaction Stau1-Upf1 sur le métabolisme de ces ARNm a également été étudié. Ceci a mené à la découverte d'un nouveau mécanisme de dégradation de l'ARNm : le SMD (« *Staufen mediated decay* »).

2.2 Contributions des auteurs

Yoon Ki Kim : Recherche de partenaires protéiques de Upfl par double hybride. Analyse par RT-PCR du niveau stationnaire de divers transcrits. Transfection de siRNA. Co-immunoprécipitations. « GST-pulldown ». Immunobuvardage de type *FarWestern*. Études de demi-vies d'ARNm. Construction de plasmides. Rédaction.

Luc Furic : Co-immunoprécipitations. Analyse de micro-puces d'ADN. Construction de plasmides. Analyse par RT-PCR de l'association de transcrits rapporteurs à Stau1. Rédaction.

Luc DesGroseillers : Supervision générale. Rédaction.

Lynne E. Maquat: Supervision générale. Rédaction.

2.3 Mammalian Staufen1 Recruits Upf1 to Specific mRNA 3'UTRs so as to Elicit mRNA Decay

Yoon Ki Kim¹, Luc Furic², Luc DesGroseillers² and Lynne E. Maquat^{1,*}

¹Department of Biochemistry and Biophysics, School of Medicine and Dentistry, 601 Elmwood Avenue, Box 712, University of Rochester, Rochester, NY 14642, USA

²Département de Biochimie, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre Ville, Montréal, (Qué) Canada H3C 3J7

*Correspondence: 

Running title: Stau1-mediated mRNA decay

2.3.1 Summary

We describe a novel mRNA decay mechanism that involves mammalian Staufen (Stau)1, the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) factor Upf1, and a termination codon. Unlike NMD, this mechanism does not involve pre-mRNA splicing or NMD factors Upf2 or Upf3X. We show that Stau1 binds directly to Upf1 and can elicit mRNA decay when tethered downstream of a termination codon. We also show that Stau1 interacts with the 3' untranslated region of ADP-ribosylation factor (Arf)1 mRNA. Accordingly, down-regulating Stau1, while of no detectable consequence to the splicing-dependent NMD of either β -globin or glutathione peroxidase 1 mRNA, increases Arf1 mRNA stability. Similarly, down-regulating Upf1 also increases Arf1 mRNA stability. These findings suggest that Arf1 mRNA is a natural target for Stau1-mediated decay, and data indicate that other mRNAs are also natural targets. We discuss this new pathway as a means for cells to down-regulate the expression of Stau1-binding mRNAs.

2.3.2 Introduction

Mammalian Staufen (Stau)1 is an RNA binding protein that binds to extensive RNA secondary structures, primarily through one or more double-stranded RNA-binding domains (Marion et al., 1999; Wickham et al., 1999). The role of Staufen is best characterized in *Drosophila*, where it functions in the transport and localization of bicoid and oskar mRNAs to, respectively, the anterior and posterior poles of oocytes, and prospero mRNA during asymmetric divisions of embryonic neuroblasts (Broadus et al., 1998; Li et al., 1997; Matsuzaki et al., 1998; Schuldt et al., 1998; Shen et al., 1998; St Johnston, 1995). *Drosophila* Staufen also functions in the translational derepression of oskar mRNA once the mRNA has been localized to the posterior pole (Ephrussi et al., 1991; Kim-Ha et al., 1991, 1995; Micklem et al., 2000).

In mammals, the Stau1 gene is ubiquitously expressed and generates protein isoforms having apparent molecular weights of 55 and 63 kDa (Kiebler et al., 1999; Marion et al., 1999; Monshausen et al., 2001; Wickham et al., 1999). The 55-kDa isoform associates with 40S and 60S ribosomal subunits and co-localizes with the rough endoplasmic reticulum (Luo et al., 2002; Marion et al., 1999; Wickham et al., 1999). A role for Stau1 in mRNA transport and translational control has been inferred from its presence in RNA granules that migrate within the dendrites of hippocampal neurons in a microtubule-dependent manner (Kanai et al., 2004; Kiebler et al., 1999; Kohrmann et al., 1999; Krichevsky and Kosik, 2001; Mallardo et al., 2003; Ohashi et al., 2002), as well as

its encapsidation together with HIV-1 RNA in virus particles (Mouland et al., 2000). Additionally, Stau1 interacts with telomerase RNA, suggesting that it functions during DNA replication, cell division or both, possibly by influencing telomerase RNA processing or RNP assembly or localization (Bachand et al., 2001; Le et al., 2000).

In this study, we add Stau1 to the repertoire of proteins that are involved in mRNA decay. Furthermore, we demonstrate that Stau1-mediated mRNA decay (SMD) involves the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) factor Upf1. NMD in mammalian cells is generally a splicing-dependent mechanism that degrades newly synthesized mRNAs that prematurely terminate translation (reviewed in Frischmeyer and Dietz, 1999; Hentze and Kulozik, 1999; Li and Wilkinson, 1998; Maquat, 2004a, 2004b; Wilusz et al., 2001). By so doing, NMD precludes the synthesis of the encoded truncated proteins, which can function in deleterious ways (see, e.g., Inoue et al., 2004). NMD also targets naturally occurring mRNAs such as certain selenoprotein mRNAs and an estimated one-third of alternatively spliced mRNAs, some of which encode functional protein isoforms (Hillman et al., 2004; Mendell et al., 2004).

The dependence of NMD on splicing reflects the deposition of an exon junction complex (EJC) of proteins ~20-24 nucleotides upstream of splicing-generated exon-exon junctions (Kataoka et al., 2000; Kim et al., 2001; Le Hir et al., 2000a, 2000b; Lykke-Andersen et al., 2001). This EJC includes NMD factors Upf3 (also called Upf3a) or Upf3X (also called Upf3b), Upf2 and, presumably, Upf1 (Gehring et al., 2003; Kim et al., 2001;

Lejeune et al., 2002; Lykke-Andersen et al., 2000, 2001). Upf3 and Upf3X appear to play a comparable role in NMD (Kim et al., 2001; Lykke-Andersen et al., 2001), although different isoforms of Upf3 can form distinct protein complexes (Ohnishi et al., 2003; Upf3X was not studied). Other constituents of the EJC include Y14, RNPS1, SRm160, REF/Aly, UAP56, Magoh, Pnn/DRS, and eIF4AIII (Chan et al., 2004; Ferraiuolo et al., 2004; Kataoka et al., 2000; Kim et al., 2001; Le Hir et al., 2000b, 2001; Lejeune et al., 2002; Li et al., 2003; Luo et al., 2001; Palacios et al., 2004; Shibuya et al., 2004). EJCs are present on mRNA that is bound at the cap by the major nuclear cap binding protein (CBP)80-CBP20 heterodimer, which is consistent with data indicating that NMD targets CBP80-bound mRNA as a consequence of a pioneer round of translation (Chiu et al., 2004; Ishigaki et al., 2001; Lejeune et al., 2002, 2004).

Here we show that mammalian Stau1 binds the NMD factor Upf1 and the 3' untranslated region (UTR) of mRNA that encodes ADP-ribosylation factor (Arf)1. As a result, Stau1 mediates Arf1 mRNA decay in a mechanism that differs from NMD by occurring independently of splicing, Upf2 or Upf3X. Analogously to the SMD of Arf1 mRNA, artificially tethering Stau1 downstream of a normal termination codon also reduces mRNA abundance in a mechanism that depends on the normal termination codon and Upf1 but neither splicing nor the other Upf factors. Notably, Stau1 plays no detectable role in the EJC-dependent NMD of either β -globin or glutathione peroxidase 1 mRNA. Microarray analyses have identified a number of transcripts in addition to Arf1 mRNA that bind Stau1 and, therefore, may also be regulated by SMD.

2.3.3 Results

2.3.3.1 Human Upf1 Interacts With Human Stau1

Using yeast two-hybrid analysis to screen a HeLa-cell cDNA library for encoded proteins that interact with full-length human Upf1, human Stau1 was identified in four out of one million transformants on the basis of growth at 37°C in galactose-containing medium but not glucose-containing medium (Figure 1A, upper). Galactose promoted transcription of cDNAs in the library, and the interaction of cDNA-encoded protein with Upf1 allowed for growth at 37°C. Sequence analysis of partial cDNAs that were obtained in the screen indicated that Upf1 interacts with Stau1 within the fourth double-stranded RNA binding domain, the tubulin binding domain, or both (Figure 1A, lower).

The ability of Upf1 to interact directly with Stau1 was confirmed using co-purification assays. First, GST-Upf1 that had been produced in *E. coli* interacted with 6xHis-Stau1 that had also been produced in *E. coli*. This was evident using GST pull-down to isolate GST-Upf1 (Figure 1B, upper) followed by either Western blotting using α -His antibody (Figure 1B, middle) or Coomassie Blue staining (Figure 1B, lower) to confirm the presence of 6xHis-Stau1. Notably, 6xHis-Stau1 was not detected in the GST pull-down in the absence of GST-Upf1 (data not shown).

Second, FLAG-Upf1 that had been purified from HeLa cells as well as GST-Upf1 that had been purified from *E. coli* were shown by Far-Western analysis to interact with 6xHis-Stau1 or GST-Stau1 that had been produced in *E. coli*. To this end, each tagged

Stau1 protein was electrophoresed in SDS-polyacrylamide and probed with either FLAG-Upf1 followed by Western blotting using α -FLAG antibody (Figure 1C, middle) or GST-Upf1 followed by Western blotting using α -GST antibody (Figure 1C, right). Coomassie Blue staining confirmed the presence of 6xHis-Stau1 and GST-Stau1 (Figure 1C, left).

Third, Stau1-HA3 that had been immunopurified from Cos cells using α -HA antibody co-purified with cellular Upf1 in a manner that was resistant to the addition of RNase A prior to immunopurification (IP) (Figure 1D, upper). This suggests that the interaction of Stau1 and Upf1 is stable in the absence of RNA. RNase A treatment was effective as demonstrated by the disappearance of cellular SMG7 mRNA in samples that were analyzed before IP (Figure 1D, lower). Stau1-HA3 also co-immunopurified with Barentsz and CBP80, although in an RNase A-sensitive manner, but did not co-immunopurify with eIF4E or a non-specific control, Vimentin, which is a component of intermediate filaments (Figure 1D, upper). The co-IP of Stau1 with Barentsz had previously been shown to be RNase A-sensitive (Macchi et al., 2003). Since Barentsz is essential for EJC-dependent NMD (Palacios et al., 2004), and since CBP80 and the EJC are components of the pioneer translation initiation complex (Chiu et al., 2004; Ishigaki et al., 2001; Lejeune et al., 2002), Stau1 and Barentsz are also likely to be components of this complex. While antibodies to EJC components Upf3 and Upf3X immunopurified the EJC component Upf2, they failed to immunopurify either Stau1 or Barentsz (Figure 1E). These results suggest that: (i) the interaction of Stau1 and Barentsz with the EJC was destabilized by the experimental conditions, (ii) Stau1 and Barentsz only transiently interact with the

EJC, as appears to be the case for Upf1 (Ishigaki et al., 2001), or (iii) neither Stau1 nor Barentsz are components of the EJC.

Fourth, FLAG-Upf1 that had been isolated from HeLa cells using α -FLAG antibody that was covalently conjugated to an agarose affinity gel (Pal et al., 2001) co-purified with both the 55-kDa and 63-kDa isoforms of Stau1 as well as Upf2 and Upf3X but not Vimentin (Figure 1F). These data also indicate that Stau1 and Upf1 are components of the same complex.

2.3.3.2 Down-Regulating Cellular Stau1 Has No Detectable Consequence to the EJC-Dependent NMD of Gl or GPx1 mRNA

To gain insight into the possibility that Stau1 functions in EJC-dependent NMD, the effect of down-regulating the level of cellular Stau1 on the NMD of mRNAs for β -globin (Gl) and glutathione peroxidase (GPx)1 was examined using small interfering (si)RNAs. As a control, Upf3X was down-regulated in parallel. HeLa cells were transfected with Stau1 siRNA, Upf3X siRNA or a non-specific "Control" siRNA and, two days later, with three plasmids: (i) the pmCMV-Gl test plasmid that was either nonsense-free (Norm) or nonsense-containing (39Ter), (ii) the pmCMV-GPx1 test plasmid, either Norm or 46Ter, and (iii) the phCMV-MUP reference plasmid.

The level of each Stau1 isoform was down-regulated to 28% of normal, where normal is defined as the level in the presence of the non-specific Control siRNA, and the level of Upf3X was down-regulated to 24% of normal (Figure 2A). Using the level of Gl

39Ter or GPx1 46Ter mRNA as a measure of NMD, down-regulating Stau1 was of no detectable consequence to the NMD of either mRNA, whereas down-regulating Upf3X abrogated NMD 5-fold or 3-fold, respectively (Figure 2B). Therefore, Stau1 does not detectably function in the EJC-dependent NMD of nonsense-containing Gl and GPx1, which is consistent with our failure to detect Stau1 as a stable component of the EJC (Figure 1).

2.3.3.3 Tethered Stau1 Reduces mRNA Abundance in a Mechanism that Involves Upf1 and an Upstream Termination Codon but Not Upf2 or Upf3X

In theory, Stau1 could elicit a type of EJC-independent mRNA decay based on our finding that it binds to Upf1 and given that it is known to bind RNA. Previously, fusions of each Upf protein and the bacteriophage MS2 coat protein were shown to reduce mRNA abundance when tethered to a series of MS2 coat protein binding sites that were located more than 50 nts downstream of a normal termination codon (Lykke-Andersen et al., 2000). Since the reduced mRNA abundance was dependent on the normal termination codon, it was attributed to NMD. This or similar tethering methods have subsequently been used to provide evidence that Y14, RNPS1, PYM and Barentsz also function in NMD (Bono et al., 2004; Gehring et al., 2003; Lykke-Andersen et al., 2001; Palacios et al., 2004).

Tethered Stau1 was similarly tested for the ability to reduce mRNA abundance depending on an upstream termination codon. HeLa cells were transiently transfected with three plasmids: (i) a pcFLuc test plasmid that produces Firefly (F) luciferase (Luc) from

intronless FLuc cDNA that either did or did not harbor eight MS2 coat protein binding sites (MS2bs) within the 3'UTR (Figure 3A), (ii) the pRLuc reference plasmid that produces Renilla (R)Luc (Figure 3A), and (iii) a pMS2-HA or pMS2-HA-Stau1 effector plasmid that, respectively, harbored no insert so as to encode only MS2 coat protein (MS2)-HA or HA-Stau1 cDNA so as to encode a MS2-HA-Stau1 fusion protein.

Cells that had been transfected with pMS2-HA or pMS2-HA-Stau1 produced the expected fusion protein as evidenced by Western blotting using α -HA antibody (Figure 3B, left). As demonstrated using RT-PCR, while neither MS2-HA nor MS2-HA-Stau1 affected the level of FLuc mRNA that lacked the MS2bs, MS2-HA-Stau1 elicited a 3-to-4-fold reduction in the level of FLuc mRNA that harbored the MS2bs (Figure 3B, right). In control experiments that were performed in parallel, MS2-Upf1 and MS2-Upf2 (Lykke-Andersen et al., 2000) were also of no consequence to the level of FLuc mRNA that lacked the MS2bs but elicited a 2-to-5-fold reduction in the level of FLuc mRNA that harbored the MS2bs (Figure 3B, right). Furthermore, tethering an unrelated protein, HA-eIF4AIII, or expressing Stau-HA₃ or myc-Upf1 that could not be tethered failed to affect the abundance of FLuc-MS2bs mRNA (Figure S1).

These data are consistent with the possibility that tethering Stau1 downstream of a normal termination codon elicits mRNA decay. This possibility was examined in two ways. First, the effects of down-regulating the level of cellular Upf1, Upf2 or Upf3X on the Stau1-mediated reduction of FLuc-MS2bs mRNA abundance was examined. To this

end, HeLa cells were transiently transfected with the appropriate siRNA and, two days later, with a combination of plasmids. One combination consisted of the pmCMV-G1 test plasmid, either Norm or 39Ter, and the phCMV-MUP reference plasmid. The other combination consisted of the pcFLuc-MS2bs test plasmid, the pRLuc reference plasmid, and an effector plasmid that produces MS2-HA, MS2-HA-Stau1, MS2, MS2-Upf1, MS2-Upf2 or MS2-Upf3.

Using Western blotting and the appropriate α -Upf antibody, the level of Upf1 or Upf3X (Figure 4A, left) or Upf2 (Figure 4B, left) was shown to be down-regulated, respectively, to 4%, 28% or 13% of normal. In control experiments, down-regulating each protein abrogated the NMD of G1 39Ter mRNA 3-to-5-fold (Figures 4A and 4B, middle), as expected. Down-regulating Upf1 but not Upf3X abrogated the decrease in the abundance of FLuc-MS2bs mRNA that was mediated by tethered Upf2 (Figure 4A, right). Furthermore, down-regulating Upf2 abrogated the decrease in the abundance of FLuc-MS2bs mRNA that was mediated by tethered Upf3 but had no effect on the decrease that was mediated by tethered Upf1 (Figure 4B, right). Therefore, tethering Upf2 obviates the need for Upf3X but not Upf1 in EJC-dependent NMD, and tethering Upf1 obviates the need for the other Upf proteins in EJC-dependent NMD. We conclude that Upf2 functions in NMD after Upf3 or Upf3X but before Upf1. Additionally, down-regulating Upf1 but not Upf3X or Upf2 abrogated the decrease in the abundance of FLuc-MS2bs mRNA that was mediated by tethered Stau1 (Figures 4A and 4B, right). We conclude that (i) Upf1 function obviates Stau1 function in the Stau1-mediated reduction in mRNA abundance, and (ii)

Stau1 reduces mRNA abundance in a mechanism that is not likely to involve Upf2 or Upf3X. These results make sense given that Stau1 binds Upf1 (Figure 1), and that Upf1 is the last of the Upf proteins to function in EJC-dependent NMD (Lykke-Andersen et al., 2000).

In related experiments, the effect of down-regulating the level of cellular Stau1 or, as a control, cellular Upf1 on NMD that was elicited by tethering Upf1, Upf2 or Upf3 to FLuc mRNA was determined. The level of each Stau1 isoform was down-regulated to 29% of normal, and the level of Upf1 was down-regulated to 7% of normal as evidenced using Western blotting (Figure 4C, left). According to expectations, down-regulating Upf1 abrogated NMD that was elicited by tethering either Upf2 or Upf3 as evidenced using RT-PCR (Figure 4C, right). In contrast, however, down-regulating Stau1 had no effect on NMD that was elicited by tethering Upf1, Upf2 or Upf3 (Figure 4C, right). These results are consistent with our finding that Stau1 does not detectably affect EJC-dependent NMD (Figure 2).

Moving the translation termination codon from a position that resides upstream of the MS2-HA-Stau1 tethering site to a position that resides downstream of the site was found to inhibit the Stau1-mediated reduction of either FLuc-MS2bs or GI-MS2bs mRNA abundance (Figure S2). While we cannot discount the possibility that inhibition is due to Stau1 removal by translating ribosomes, this result is consistent with the possibility that

Stau1 reduces mRNA abundance by recruiting Upf1 to a position that resides downstream of a termination (i.e., nonsense) codon (see below).

2.3.3.4 Stau1 Binds the 3'UTR of Arf1 mRNA and Reduces Arf1 mRNA Abundance Independently of an EJC

In search of substrates that could be natural targets of Stau1-mediated effects, ADP-ribosylation factor (Arf)1 mRNA, which encodes a Ras-related G protein that regulates membrane traffic and organelle structure (Donaldson and Jackson, 2000), was identified as a natural ligand of Stau1 using two methods. First, Stau1-containing RNPs were immunopurified from human 293 cells that transiently expressed either Stau1-HA3 or, as a control for IP specificity, Stau1-6xHis using α -HA antibody (Figure S3A). When biotin-labeled cRNAs were generated from the constituent RNAs and used to probe oligonucleotide arrays of 22,000 human genes, Arf1 mRNA was identified as one of at least 23 ligands of Stau1 (Figure S3B; Table S1). Second, using RT-PCR and a primer pair that specifically amplifies Arf1 mRNA, Arf1 mRNA was shown to be among the 293-cell transcripts that co-immunopurified with (i) α -HA antibody in cells that expressed Stau1-HA3 (Figure S3C) and (ii) α -Stau1 antibody in untransfected cells (Figure S3C).

We rationalized that if Stau1 binds to Arf1 mRNA at a position that reduces mRNA abundance, then down-regulating either Stau1 or Upf1 should up-regulate the level of Arf1 mRNA. Furthermore, down-regulating either Stau1 or Upf1 should fail to up-regulate the level of Arf1 mRNA that lacks the Stau1 binding site. To test these

possibilities, HeLa cells were transiently transfected with Control siRNA or siRNA that down-regulates Stau1, Upf1, Upf2 or Upf3X. Two days later, cells were transiently transfected with two plasmids in order to measure effects on the abundance of Arf1 mRNA that was transiently produced from Arf1 cDNA. These plasmids consisted of: (i) a pSport-Arf1 or pSport-Arf1 Δ (3'UTR) test plasmid, the latter of which lacks all nucleotides that reside downstream of the normal termination codon (Figure 5A), and (ii) the pCMV-MUP reference plasmid. Notably, the HeLa-cell Arf1 gene contains four introns (Lee et al., 1992) so that the resulting newly synthesized mRNA would harbor four EJCs. In contrast, since Arf1 cDNA within either pSport plasmid lacks all introns, the resulting newly synthesized mRNA would lack EJCs.

The results of Western blotting demonstrated that the level of each Stau1 isoform was down-regulated to 26% of normal, and the level of Upf1, Upf2 or Upf3X was down-regulated to, respectively, 21%, 22% or 13% of normal (Figure 5B, upper). The results of RT-PCR using RNA from the same cells demonstrated that the abundance of endogenous HeLa-cell Arf1 mRNA relative to the abundance of SMG7 as well as the abundance of Arf1 mRNA that derived from Arf1 cDNA relative to MUP mRNA was increased 2-to-4-fold in the presence of Stau1 or Upf1 siRNA relative to Control siRNA (Figure 5B, middle and lower; see also Figure S4 for comparable results using a different Stau1 or Upf1 siRNA). In contrast, and as expected from the Stau1 tethering results (Figures 3 and 4), the abundance of Arf1 mRNA from the gene or cDNA was unaffected by down-regulating Upf3X (Figure 5B, middle and lower). For reasons that are not entirely clear, the

abundance of Arf1 mRNA was decreased by down-regulating Upf2 (Figure 5B, middle and lower). This decrease may simply reflect competition between Stau1 and Upf2 for binding to Upf1. Possibly, down-regulating Upf2 augments the interaction of Stau1 with Upf1, which could increase the efficiency of NMD. Consistent with this interpretation, Upf2 is not detected in association with Stau1 (data not shown), whereas both Upf2 and Stau1 are detected in association with Upf1 (Figure 1F). However, down-regulating Upf2 did not augment NMD when Stau1 was tethered (Figure 4B). These data suggest that Stau1 reduces the abundance of Arf1 mRNA in a mechanism that involves Upf1 but not Upf2 or Upf3X.

These findings also suggest that Stau1 binds Arf1 mRNA at a position that is located within the 3'UTR. Consistent with this, deletion of the 3'UTR increased the level of Arf1 mRNA 7-fold (Figure 5C). Moreover, in contrast to Arf1 mRNA, the abundance of Arf1 Δ (3'UTR) mRNA was unaffected by Stau1 siRNA relative to Control siRNA (Figure 5C).

In order to test for Stau1 binding to the 3'UTR of Arf1 mRNA, Cos cells were transiently transfected with the Stau1-HA3 expression vector, the pSport-Arf1 or pSport-Arf1 Δ (3'UTR) test plasmid, and the pCMV-MUP reference plasmid. Notably, cells were transfected with only half as much pSport-Arf1 Δ (3'UTR) as pSport-Arf1 in order to compensate for the difference in the level of product mRNA. Cell extract was prepared two days later, and a fraction was immunopurified using α -HA antibody or, as a control for

nonspecific IP, rat (r) IgG. Western blotting of immunopurified protein demonstrated that the efficiency of IP was 11% (Figure 5D, upper). RT-PCR of immunopurified RNA demonstrated the presence of Arf1 mRNA, a low level of Arf1 Δ (3'UTR) mRNA, and no detectable MUP mRNA (Figure 5D, lower). We conclude that Stau1 binds to the 3'UTR of Arf1 mRNA, as was predicted from data demonstrating that Arf1 mRNA but not Arf1 Δ (3'UTR) mRNA is naturally targeted for a Stau1-mediated reduction in abundance. Additionally, we conclude that Stau1 also binds elsewhere within Arf1 mRNA, albeit to a lesser extent. Consistent with this conclusion, and in support of the idea that a termination codon must reside upstream of a Stau1 binding site in order for Stau1 to mediate a reduction in mRNA abundance (Figure S2), the level of Arf1 mRNA that derived from cDNA harboring a premature termination codon at position 35 was up-regulated 2-fold when Stau1 was down-regulated (data not shown). It follows that Stau1 binds between codon 35 and the normal termination codon with less efficiency than it binds to the 3'UTR. Notably, the specificity of Stau1 binding to Arf1 mRNA was illustrated by the failure of Stau1 to bind to MUP mRNA (Figure 5D).

2.3.3.5 A Minimized Stau1 Binding Site Resides \geq 67 Nucleotides Downstream of the Normal Termination Codon of Arf1 mRNA and Mediates Arf1 mRNA Decay

To further localize the Stau1 binding site within the Arf1 3'UTR, a series of deletions was generated from the distal-most nucleotide of the Arf1 3'UTR within pSport-Arf1 (Figure 6A). Each of the resulting test plasmids was transiently introduced into 293 cells together with the Stau-HA3 expression vector. Cell extract was prepared two days

later, and a fraction was immunopurified using α -HA antibody. Western blotting of immunopurified protein revealed relative IP efficiencies (Figure 6B, upper). RT-PCR of immunopurified RNA demonstrated that Stau1 binds between nucleotides 689 and 919 (Figure 6B, lower, where the first transcribed nucleotide of endogenous Arf1 mRNA is defined as 1). Notably, the small amount of Stau1 binding that is detected using mRNAs that terminate at nucleotide 621 or 688 reflects our finding that Stau1 binds less efficiently to the coding region than to the 3'UTR (Figures 5D and 6B). While these data do not rule out the possibility that Stau1 also binds within the 3'UTR downstream of nucleotide 919 or upstream of nucleotide 688, our finding that inserting the Stau1 binding site (SBS, nucleotides 622-924) within the heterologous FLuc mRNA reduced FLuc mRNA abundance (Figure S5A) corroborates that Stau1 indeed binds between nucleotides 689 and 919. We conclude that Stau1 binds to the 3'UTR of Arf1 mRNA at a position that is predicted to reduce mRNA abundance.

To determine if Stau1 and Upf1 mediate a reduction in Arf1 mRNA half-life, the expression of Arf1 cDNA harboring the SBS in place of the full-length 3'UTR was driven by the *fos* promoter (Figure 6C, upper). This promoter is transiently inducible upon the addition of serum to serum-deprived cells and, thus, provides a way to analyze mRNA half-life (Lejeune et al., 2003). L cells were transfected with mouse (m)Stau1 siRNA, mUpf1 siRNA or, as negative controls, mUpf2 siRNA or Control siRNA and, two days later, with the *pfos-Arf1-SBS* test plasmid and the *phCMV-MUP* reference plasmid in the absence of serum. One day later, serum was added, and protein and RNA were purified from,

respectively, cytoplasmic and nuclear fractions at 0, 30, 60, 90 and 120 min. Western blotting demonstrated that the levels of mStau1, mUpf1 and mUpf2 were down-regulated to 21%, 18%, and 26% of normal (Figure 6C, second-from-top, left and right). RT-PCR demonstrated that down-regulating mStau1 or mUpf1 increased the half-life of nucleus-associated fos-Arf1-SBS mRNA, whereas down-regulating mUpf2 did not (Figure 6C, second-from-bottom and bottom, left and right). These data reveal that Stau1 together with Upf1 mediate the nucleus-associated decay of Arf1 mRNA, which we call Stau1-mediated mRNA decay (SMD). The specificity of the SBS involvement in SMD was evident with the finding that down-regulating mStau1 to 29% of normal also increased the half-life of nucleus-associated fos-FLuc-SBS mRNA (Figure S5B). Furthermore, down-regulating mStau1 to a comparable level (21% of normal) had no effect on the half-life of nucleus-associated fos-Arf1 Δ (3'UTR) mRNA (Figure S6). These data, like the steady-state data (Figures 4, 5, S4, and S5A), indicate that the SMD of Arf1 mRNA involves the Arf1 SBS and Upf1 but not Upf2.

2.3.4 Discussion

In this communication, we describe a novel role for Stau1 and new type of mRNA decay that involves Upf1 but not an EJC. We demonstrate that mammalian Stau1 directly binds the NMD factor Upf1 (Figure 1). We also demonstrate that tethering Stau1 downstream of a termination codon reduces mRNA abundance (Figure 3) in a mechanism that appears to involve the termination codon (Figure S2; unpub. data demonstrating that

down-regulating Stau1 increases the level of Arf1 35Ter mRNA) and Upf1 but not Upf2 or Upf3X (Figure 4). This mechanism is shown to be physiologically relevant with the finding that Stau1 binds to an ~230-nt region of the 3'UTR of Arf1 mRNA so as to recruit Upf1 independently of other Upf proteins and, as a consequence, reduce Arf1 mRNA half-life (Figures 5, 6, and S3-S6). Consistent with these conclusions, we demonstrate that Upf1 is the last of the Upf proteins to function in EJC-dependent NMD, and that Upf3X functions prior to Upf2 (Figure 4).

We find that Stau1 plays no detectable role in the EJC-dependent NMD of Gl and GPx1 mRNAs (Figure 2). This is despite the ability of Stau1 to interact with Barentsz (Macchi et al., 2003; Figure 1), which interacts directly with the EJC component eIF4AIII (Chan et al., 2004; Palacios et al., 2004). However, neither Stau1 nor Barentsz is detected as a stable component of the EJC (Figure 1).

As a rule, a termination codon that resides more than ~50-55 nt upstream of an exon-exon junction elicits NMD (Nagy and Maquat, 1998). Considering that an EJC resides ~20-25 nts upstream of an exon-exon junction (Le Hir et al., 2000a), it follows that a termination codon that resides more than ~25 nt upstream of a Stau1 binding site should elicit SMD. These two scenarios are exemplified for Arf1 mRNA, which harbors four exon-exon junctions and binds Stau1 \geq 67 nt downstream of the normal termination codon (Figure 7). In theory, it may be possible for a termination codon to be situated so that it elicits both EJC-independent SMD and EJC-dependent NMD. In fact, our data indicate

that this possibility exists for Arf1 mRNA, which is normally a product of pre-mRNA splicing and binds Stau1 within its coding region as evidenced by the ability of 35Ter within Arf1 cDNA to elicit SMD (unpub. data).

We have found in two independently performed microarray analyses that there are at least 22 293-cell mRNAs in addition to Arf1 mRNA that bind Stau1 (Table S1). This suggests that SMD is used by cells to coordinately regulate a battery of genes in response to changes in the cellular abundance or specific activity of Stau1, Upf1 or both (see below). If binding is sufficiently downstream of the normal termination codon, then these mRNAs should, like Arf1 mRNA, be natural targets of SMD in a mechanism that is EJC-independent. For example, Stau1 also binds the 3'UTR of PAICS mRNA (and also elsewhere within PAICS mRNA), and down-regulating Stau1 increases PAICS mRNA abundance ~2-fold (Figure S7). Natural substrates for SMD could arise when a termination codon is generated by alternative splicing, which has been proposed to occur one-third of the time (Hillman et al., 2004), provided that the termination codon resides a sufficient distance upstream of a Stau1 binding site. Notably, there may be mRNAs that are more efficiently targeted for SMD than those identified to date, i.e., that would have insufficient abundance to be detected in a microarray analysis of Stau1-bound transcripts (Table S1). In fact, some of these may be among the mRNAs that increase in abundance when Upf1 is down-regulated but not in accordance with rules that pertain to NMD (Mendell et al., 2004).

With regard to the possible regulation of SMD, Stau1 is ubiquitously expressed, but its level of expression varies among tissues (Marion et al., 1999; Monshausen et al., 2001; Wickham et al., 1999). For example, Stau1 is highly expressed in brain, heart, liver, testis, pancreas and placenta, whereas it is generally expressed to lesser but varying degrees in other tissues. As another example, Stau1 expression is up-regulated following myogenic differentiation and, in muscle cells, after denervation or treatment with trophic factors (Belanger et al., 2003). Additionally, differential splicing generates several Stau1 isoforms that are not uniformly expressed among tissues. Stau1 also contains several putative phosphorylation sites that could regulate its function, and Stau1 has been shown to interact with protein phosphatase-1 (Monshausen et al., 2002). Therefore, the functions of Stau1 are likely to be modulated in different tissues according to the level and nature of each expressed isoform and, possibly, post-translational modifications. Since Upf1 phosphorylation influences Upf1 function in NMD (Ohnishi et al., 2003; Pal et al., 2001), it is possible that Upf1 phosphorylation also regulates Upf1 function in SMD.

Several Stau1-bound mRNAs encode key regulatory enzymes that control cell metabolism, proteins involved in organelle trafficking, cell division or the cell cycle, or both (Table S1). Arf1 is involved in protein trafficking, and it may modulate vesicle budding and uncoating within the Golgi apparatus. PAICS controls steps 6 and 7 of the purine nucleotide biosynthetic pathway. Interestingly, the level of PAICS mRNA varies with the cell cycle in synchronized rat 3Y1 fibroblasts (Iwahana et al., 1995). At least in theory, this variation may be controlled by SMD. From these and other examples, it is

conceivable that modulation of Stau1, Upf1 or both may control the level of SMD in response to signal transduction or other regulatory pathways.

In addition to its involvement in this new type of mRNA decay, Stau1 is a component of mRNPs that are transported and localized within dendrites of mature hippocampal neurons (Kanai et al., 2004; Kiebler et al., 1999; Kohrmann et al., 1999; Krichevsky and Kosik, 2001; Mallardo et al., 2003; Ohashi et al., 2002). There are a number of RNP proteins that function in two distinct RNA metabolic processes, one of which involves mRNA localization coupled to translational control. As one example, Hrb27C inhibits the removal by nuclear splicing of intron 3 from P-element encoded transposase pre-mRNA in *Drosophila* (Hammond et al., 1997; Siebel et al., 1994), and it also binds directly to *Drosophila gurken* mRNA so as to regulate *gurken* mRNA cytoplasmic localization and translation (Goodrich et al., 2004). As other examples, Barentsz and Y14, the latter of which is a component of the EJC (Kim et al., 2001; Lau et al., 2003; Palacios et al., 2004), are essential for EJC-dependent NMD in mammalian cells (Ferraiuolo et al., 2004; Gehring et al., 2003; Palacios et al., 2004; Shibuya et al., 2004), and they also function in localizing *Drosophila oskar* mRNA to the posterior pole of the oocyte (Hachet and Ephrussi, 2001, 2004; Mohr et al., 2001; van Eeden et al., 2001).

In summary, our findings expand the role of Stau1 in post-transcriptional gene control. Significant issues that have been brought to light by our studies include if the Stau1-mediated recruitment of Upf1 to mRNAs impacts mammalian development,

neuronal transmission, or cellular growth control. It will also be important to determine if Staufen and Upf1 interact in *Drosophila* so as to elicit mRNA decay.

2.3.5 Experimental Procedures

2.3.5.1 Plasmid Constructions

To construct the pSos-Upf1 yeast two-hybrid bait plasmid, the HindIII/Klenow-filled NotI fragment that contains human UPF1 cDNA from pCI-neo-FLAG-UPF1 (Sun et al., 1998) was inserted into the NotI/Klenow-filled Sall fragment from pSos (Stratagene).

For the bacterial production of human Upf1 that harbors an N-terminal GST tag, pGEX-UPF1 was constructed by ligating the NotI/Klenow-filled EcoRI fragment from pCMV-Myc-UPF1 (unpub. data) that contains UPF1 cDNA to the NotI/Klenow-filled BamHI fragment from pGEX-6p-1+NdeI (S. Burley, unpub. data).

For the bacterial production of human Staufen1 (Stau1) that harbors an N-terminal GST tag, pGEX-Stau1 was constructed by ligating the BamHI/NotI fragment from pGEX-6p-1+NdeI to a PCR-amplified fragment that had been digested with BglII and NotI. The PCR fragment was amplified using the human Stau1 cDNA expression vector phStau155-HA3 (Luo et al., 2002) and two primers: 5'-GAAGATCTAGAATGAAACTTGGAAAAAACCAATGTATAAG-3' (sense) and 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTCAGCACCTCCCACACACAGACATTGGTCC-3' (antisense), where underlined nucleotides specify the BglII or NotI site, respectively.

For the bacterial production of human Stau1 that harbors an N-terminal 6xHis tag, pRSET B-Stau1 was constructed by ligating the Klenow-filled NdeI/NotI fragment from pGEX-Stau1 to the Klenow-filled BglII fragment from pRSET B (Invitrogen).

To construct pMS2-HA-Stau1 that encodes N-terminal oligomerization-defective MS2 coat protein followed successively by an HA tag and full-length human Stau1, pCI-neo (Promega) that had been digested with NheI and NotI was ligated to two fragments: a PCR-amplified fragment that contains the MS2 coat protein-encoding sequence that had been digested with NheI and BamHI, and a PCR-amplified fragment that contains human Stau1 cDNA that had been digested with BglII and NotI. The MS2 coat protein-encoding fragment was amplified using pET-MS2 (Coller et al., 1998) and two primers: 5'-CGCTACTAGCTAGCCGCCATGGCTTCTAACTTTACTCAGTTCGTTTC-3' (sense) and 5'-ATAAGAATGCGGCCGCCTAGGATCCAGCGTAGTCTGGAACGTCGTATGGGTAGATGCCGAGTTTGCTGCGATTG-3' (antisense), where underlined and bold nucleotides specify the NheI or NotI site and HA tag sequence, respectively. The Stau1 cDNA-containing sequence was amplified using phStau155-HA3 and two primers: 5'-GAAGATCTAGAATGAAACTTGGAAAAAACCAATGTATAAG-3' (sense) and 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTCAGCACCTCCCACACACAGACATTGGTCC-3' (antisense), where underlined nucleotides specify the BglII or NotI site, respectively.

To construct pMS2-HA that harbors an N-terminal MS2 coat protein followed by an HA tag, pCI-neo that had been digested with Nhe1 and Not1 was ligated to the same PCR-amplified fragment that contains the MS2 coat protein-encoding sequence and was similarly digested with Nhe1 and Not1 (see above).

pcFLuc-MS2bs, which contains eight tandem repeats of the MS2 coat protein-binding sites within the 3'UTR of firefly luciferase (FLuc) cDNA, was generated from pc β -8bs (Lykke-Andersen et al., 2000) by replacing β -globin cDNA with FLuc cDNA. pcFLuc, which lacks the MS2 coat protein-binding sites, was generated from pcFLuc-8bs by cleaving with PspOMI and NotI followed by self-ligation after generating blunt ends using Klenow (New England Biolabs).

pRLuc, which encodes renilla luciferase (RLuc), was generated from p2luc (Grentzmann et al., 1998) by precisely deleting FLuc cDNA.

Full-length Arf1 cDNA was obtained by RT-PCR (RNA PCR Core Kit, Applied Biosystems) using total HEK293-cell RNA and two primers: 5'-AGGTCTAGATCGGAGCAGCAGCCTCTGAGGTGT-3' (sense) and 5'-GGCTCGAGCTAATAGCTATAATTACAGTGCTTGTTTGTCGAAATG-3' (antisense), where underlined nucleotides specify the XbaI and XhoI site, respectively. The PCR product was digested with XbaI and XhoI and ligated to pSport β -gal (Invitrogen) that had been digested with XbaI and XhoI. The resulting plasmid, pSport β -gal-Arf1, was digested with NotI, purified, and self-ligated to generate pSport-Arf1.

To construct pSport-Arf1 Δ (3'UTR), pSport-Arf1 was digested with KpnI and XhoI. The resulting vector-containing fragment was ligated to a PCR-amplified fragment that contains the Arf1 open translational reading frame and had been digested with KpnI and XhoI. PCR was carried out using pSport-Arf1 and two primers: 5'-GCTATTTAGGTGACACTATAGAAGGTAC-3' (sense) and 5'-CCGCTCGAGTTCACCTTCTGGTTCGGAGCTGATTG-3' (antisense), where underlined nucleotides specify the HindIII site.

Deletions within the 3'UTR of Arf1 cDNA were generated using pSport-Arf1, 5'-CATTTGACAAACAAGCACTGTAATTATAGCTATTAG-3' (sense) and one of the following antisense primers: 5'-CCAAGGACAAGCGAGTTGCG-3'(Δ 1229-1794), 5'-CGACTGGCATCCAGGCCGTAAC-3'(Δ 1123-1794), 5'-GTGCCCATGGGCCTACATCC-3'(Δ 920-1794), 5'-ACGAGCCGCACGTTTGCCA-3'(Δ 689-1794), 5'-GTTCACCTTCTGGTTCGGAGCTG-3'(Δ 622-1794). PCR amplifications were carried out using Pfu Ultra (Stratagene). PCR products were incubated with DpnI to digest the methylated template DNA, phosphorylated at the 5' ends using T4 polynucleotide kinase (Fermentas), and circularized by ligation.

To construct pfos-Arf1-SBS or pfos-Arf1 Δ 3'UTR, pfos-GI (Lejeune et al., 2003) was digested with NcoI and EcoRI and ligated to a PCR-amplified fragment that contains Arf1-SBS cDNA or Arf1 Δ 3'UTR) cDNA. PCR was carried out using pSport-Arf1 and two primers: 5'-ACAACCATGGGGAACATCTTCGCCAACCTCTTC-3' (sense) and either

5'-CCGGAATTCTGGGCCTACATCCCCTCTCAGCACTGAAC-3' (antisense) for Arf1-SBS cDNA or 5'-CCGGAATTCTCACTTCTGGTTCCGGAGCTGATTGGAC-3' (antisense) for Arf1Δ3'UTR) cDNA, where underlined nucleotides specify the NcoI or EcoRI site.

2.3.5.2 Yeast Two-Hybrid Analysis

Proteins that interact with human Upf1 were identified using the CytoTrap Two-Hybrid System (Stratagene). The yeast strain *cdc25H* was transformed with pSos-Upf1 and the pMyr library of HeLa-cell cDNAs (Stratagene). Transformants were processed following manufacturer instructions.

2.3.5.3 siRNA-Mediated Down-Regulation of Human Upf1, Upf2, Upf3X or Stau1

HeLa cells (2×10^6) were grown in DMEM medium (Gibco-BRL) containing 10% fetal bovine serum (Gibco-BRL) in 60-mm dishes and transiently transfected with 100 nM of *in vitro*-synthesized small interfering (si)RNA (Xeragon or Dharmacon) using Oligofectamine (Invitrogen). Upf1, Upf2, Upf3X or Stau1 were down-regulated using, respectively, 5'-r(GAUGCAGUCCGCUCCAUU)d(TT)-3', 5'-r(GGCUUUUGUCCCAGCCAUC)d(TT)-3', 5'-r(GGAGAAGCGAGUAACCCUG)d(TT)-3', or 5'-r(CCUAUAACUACAACAUGAG)d(TT)-3'.

In experiments that involved siRNA and tethering (see below), cells were re-transfected 48 h later with the specified reporter, effector, and reference plasmids. Cells

were harvested two days later. To test for the abrogation of Gl, GPx1 or Arf1 NMD, cells were re-transfected 48 h after siRNA introduction with (i) 0.05 μg of a pmCMV-Gl test plasmid, either nonsense-free (Norm) or nonsense-containing (39Ter) (Zhang et al., 1998), (ii) or 0.05 μg of a pmCMV-GPx1 test plasmid, either Norm or 46Ter (Moriarty et al., 1998), (iii) 0.05 μg of a pSport-Arf1 or pSport-Arf1 Δ (3'UTR) test plasmid, and (v) 0.1 μg of the phCMV-MUP reference plasmid (Belgrader and Maquat, 1994) using Lipofectamine Plus Reagent (Invitrogen).

2.3.5.4 Tethering Experiments

HeLa cells (2×10^6) were transiently transfected using Lipofectamine Plus (Invitrogen) with 0.3 μg of the reporter plasmid pcFLuc or pcFLuc-MS2bs, 0.02 μg of the reference plasmid pRLuc, and 3 μg of one of the following effector plasmids: pMS2-HA, pMS2-HA-Stau1, pcNMS2, pcNMS2-Upf1, pcNMS2-Upf2 or pcNMS2-Upf3. Cells were harvested two days later. Protein was purified from half of the cells using passive lysis buffer (Promega), and total RNA was purified from the other half using TRIzol Reagent (Invitrogen).

2.3.5.5 fos Promoter Induction Experiments

Ltk- cells (4×10^6) were transiently transfected with 200 nM of Control siRNA, 100 nM of each of two different mouse Stau1 siRNAs [5'-r(CAACUGUACUACCUUUCCA)d(TT)-3' or 5'-r(AACGGUAAACUGCCAUGAUA)d(TT)-3'], or 200 nM of mouse Upf1 siRNA, [5'-

r(UCAAGGUUCCUGAUAAUUA)d(TT)-3'] or mouse Upf2 siRNA [5'-r(GAAACUUCUUGAUGAACAA)d(TT)-3']. Two days later, cells were retransfected with 0.3 µg of the pfos-Arf1-SBS test plasmid and the 1.0 µg of the pHCMV-MUP reference plasmid as described above. The fos promoter was transiently induced, and cells were fractionated as described (Lejeune et al., 2003). However, serum was eliminated from the second transfection and added back one day later.

2.3.5.6 Immunopurifications

Cos-7 or HeLa cells were cultured as described above but in 150-mm dishes. Transfections and immunopurifications were performed as described (Chiu et al., 2004; Ishigaki et al., 2001; Lejeune et al., 2002)

2.3.5.7 Western Blotting

Protein was electrophoresed in SDS-polyacrylamide, transferred to Hybond ECL nitrocellulose (Amersham), and probed with antibodies that recognize FLAG (Sigma), GST (Qiagen), HA (Roche), Upf1 (Lykke-Andersen et al., 2000), Upf2 (Serin et al., 2001), Upf3/3X (Serin et al., 2001), Barentsz (Macchi et al., 2003), CBP80 (Izaurrealde et al., 1994), eIF4E (Santa Cruz), Vimentin (Santa Cruz), human Stau1 (Wickham et al., 1999), mouse Stau1 (Marion et al., 1999) or eIF3b (a gift from N. Sonenberg) as described (Chiu et al., 2004; Lejeune et al., 2002, 2003).

2.3.5.8 RT-PCR

The levels of specific RNAs were quantitated using RT-PCR as described (Sun et al., 1998). FLuc, β -Gl and MUP mRNAs were amplified as described previously (Chiu et al., 2004; Lejeune et al., 2003), and RLuc mRNA was amplified using the primers 5'-ATGACTTCGAAAGTTTATG-3' (sense) and 5'-TTCAGATTTGATCAACGCA-3' (antisense). Cellular Arf1 mRNA or Arf1 mRNA that derived from a pSport vector was amplified using the primers 5'-AACCAACGCCTGGCTCGG-3' (sense) and 5'-AGTCCTTCATAGAGCCCGTCG-3' (antisense) or 5'-GCTATTTAGGTGACACTATAGAAGGTAC-3' (sense) and 5'-TTCTTGACTCCACGGTTTC-3' (antisense), respectively. fos-Arf1-SBS mRNA was amplified using the primers 5'-GCAGCGAGCAACTGAGAAGC-3' (sense) and 5'-TTCTTGACTCCACGGTTTC-3' (antisense).

RT-PCR products were electrophoresed in 5% polyacrylamide and quantitated by PhosphorImaging (Molecular Dynamics).

In experiments that mapped Stau1-HA binding within the Arf1 mRNA 3'UTR, RT-PCR analysis of Arf1 mRNA was performed using One Step RT-PCR (Qiagen), the primer pair 5'-GCTATTTAGGTGACACTATAGAAGGTAC-3' (sense) and 5'-CTCTGTCATTGCTGTCCACCACG-3' (antisense), and ethidium bromide staining.

2.3.5.9 Far-Western Blotting

FLAG-Upf1 was purified from HeLa cells that had been stably transfected with pCI-neo-FLAG-UPF1 as previously described (Pal et al., 2001). GST-Upf1 was purified from *E. coli* using Bulk GST Purification Modules (Amersham).

Lysates of *E. coli* that were or were not induced to express 6xHis-Stau1 or GST-Stau1 using IPTG (Invitrogen) were resolved in 8% SDS-polyacrylamide and transferred to Hybond ECL nitrocellulose (Amersham). Membranes were incubated for 12 h at 4°C in blocking buffer [20 mM Hepes (pH 7.4), 50 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1% NP-40 and 2% milk], and then incubated overnight at 4°C in blocking buffer containing 10 µg of purified FLAG-Upf1 or GST-Upf1. Interacting proteins were detected using Western blotting and α-FLAG or α-GST antibody.

2.3.6 Acknowledgements

We thank the University of Rochester Nathan Shock Proteomic Core, in particular Sarah Leistman and David Pearce, for undertaking the two-hybrid analyses; the Genome Quebec Innovation Centre, in particular Rob Sladek and André Ponton, for microarray screening and analysis; and Véronique Trépanier for technical assistance with cDNA cloning. We are grateful to Jens Lykke-Andersen for pcβ-6bs, pcβUAC-6bs, pcβ-8bs, pcNMS2, pcNMS2-Upf1, pcNMS2-Upf2, pcNMS2-Upf3, and α-Upf1 antibody; John Atkins for p2luc; Steve Burley for pGEX-6p-1+NdeI; Marv Wickens for pET-MS2; Nahum Sonenberg for α-eIF3b antibody; Michael Kiebler for α-Barentsz antibody; Juan

Ortín for α -human Stau1 antibody; Joseph Wedekind and Trudi Schüpbach for help conversations, and Fabrice Lejeune for comments on the manuscript. This work was supported grants from the NIH to L.E.M. and grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to L.D.G. L.F. was supported by scholarships from Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) and NSERC.

2.3.7 References

- Bachand, F., Triki, I., and Autexier, C. (2001). Human telomerase RNA-protein interactions. *Nucleic Acids Res.* 29, 3385-3393.
- Belanger, G., Stocksley, M. A., Vandromme, M., Schaeffer, L., Furic, L., DesGroseillers, L., and Jasmin, B. J. (2003). Localization of the RNA-binding proteins Staufen1 and Staufen2 at the mammalian neuromuscular junction. *J. Neurochem.* 86, 669-677.
- Belgrader, P., and Maquat, L. E. (1994). Nonsense but not missense mutations can decrease the abundance of nuclear mRNA for the mouse major urinary protein, while both types of mutations can facilitate exon skipping. *Mol. Cell. Biol.* 14, 6326-6336.
- Bono, F., Ebert, J., Unterholzner, L., Guttler, T., Izaurralde, E., and Conti, E. (2004). Molecular insights into the interaction of PYM with the Mago-Y14 core of the exon junction complex. *EMBO Rep.* 5, 304-310.
- Broadus, J., Fuerstenberg, S., and Doe, C. Q. (1998). Staufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature* 391, 792-795.

- Chan, C. C., Dostie, J., Diem, M. D., Feng, W., Mann, M., Rappsilber, J., and Dreyfuss, G. (2004). eIF4A3 is a novel component of the exon junction complex. *RNA* 10, 200-209.
- Chiu, S. Y., Lejeune, F., Ranganathan, A. C., and Maquat, L. E. (2004). The pioneer translation initiation complex is functionally distinct from but structurally overlaps with the steady-state translation initiation complex. *Genes Dev.* 18, 745-754.
- Coller, J. M., Gray, N. K., and Wickens, M. P. (1998). mRNA stabilization by poly(A) binding protein is independent of poly(A) and requires translation. *Genes Dev.* 12, 3226-3235.
- Donaldson, J. G., and Jackson, C. L. (2000). Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 475-482.
- Ephrussi, A., Dickinson, L. K., and Lehmann, R. (1991). Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell* 66, 37-50.
- Ferraiuolo, M. A., Lee, C. S., Ler, L. W., Hsu, J. L., Costa-Mattioli, M., Luo, M. J., Reed, R., and Sonenberg, N. (2004). A nuclear translation-like factor eIF4AIII is recruited to the mRNA during splicing and functions in nonsense-mediated decay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 4118-4123.
- Frischmeyer, P. A., and Dietz, H. C. (1999). Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1893-1900.

- Gehring, N. H., Neu-Yilik, G., Schell, T., Hentze, M. W., and Kulozik, A. E. (2003). Y14 and hUpf3b form an NMD-activating complex. *Mol. Cell* 11, 939-949.
- Goodrich, J. S., Clouse, K. N., and Schupbach, T. (2004). Hrb27C, Sqd and Otu cooperatively regulate gurken RNA localization and mediate nurse cell chromosome dispersion in *Drosophila* oogenesis. *Development* 131, 1949-1958.
- Grentzmann, G., Ingram, J. A., Kelly, P. J., Gesteland, R. F., and Atkins, J. F. (1998). A dual-luciferase reporter system for studying recoding signals. *RNA* 4, 479-486.
- Hachet, O., and Ephrussi, A. (2001). *Drosophila* Y14 shuttles to the posterior of the oocyte and is required for oskar mRNA transport. *Curr. Biol.* 11, 1666-1674.
- Hachet, O., and Ephrussi, A. (2004). Splicing of oskar RNA in the nucleus is coupled to its cytoplasmic localization. *Nature* 428, 959-963.
- Hammond, L. E., Rudner, D. Z., Kanaar, R., and Rio, D. C. (1997). Mutations in the hrp48 gene, which encodes a *Drosophila* heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particle protein, cause lethality and developmental defects and affect P-element third-intron splicing in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 17, 7260-7267.
- Hentze, M. W., and Kulozik, A. E. (1999). A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* 96, 307-310.
- Hillman, R. T., Green, R. E., and Brenner, S. E. (2004). An unappreciated role for RNA surveillance. *Genome Biol.* 5, R8.

- Inoue, K., Khajavi, M., Ohyama, T., Hirabayashi, S., Wilson, J., Reggin, J. D., Mancias, P., Butler, I. J., Wilkinson, M. F., Wegner, M., and Lupski, J. R. (2004). Molecular mechanism for distinct neurological phenotypes conveyed by allelic truncating mutations. *Nat. Genet.* 36, 361-369.
- Ishigaki, Y., Li, X., Serin, G., and Maquat, L. E. (2001). Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell* 106, 607-617.
- Iwahana, H., Honda, S., Tsujisawa, T., Takahashi, Y., Adzuma, K., Katashima, R., Yamaoka, T., Moritani, M., Yoshimoto, K., and Itakura, M. (1995). Rat genomic structure of amidophosphoribosyltransferase, cDNA sequence of aminoimidazole ribonucleotide carboxylase, and cell cycle-dependent expression of these two physically linked genes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1261, 369-380.
- Izaurralde, E., Lewis, J., McGuigan, C., Jankowska, M., Darzynkiewicz, E., and Mattaj, I. W. (1994). A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing. *Cell* 78, 657-668.
- Kanai, Y., Dohmae, N., and Hirokawa, N. (2004). Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 43, 513-525.
- Kataoka, N., Yong, J., Kim, V. N., Velazquez, F., Perkinson, R. A., Wang, F., and Dreyfuss, G. (2000). Pre-mRNA splicing imprints mRNA in the nucleus with a novel RNA-binding protein that persists in the cytoplasm. *Mol. Cell* 6, 673-682.

- Kiebler, M. A., Hemraj, I., Verkade, P., Kohrmann, M., Fortes, P., Marion, R. M., Ortin, J., and Dotti, C. G. (1999). The mammalian staufen protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J. Neurosci.* 19, 288-297.
- Kim, V. N., Kataoka, N., and Dreyfuss, G. (2001). Role of the nonsense-mediated decay factor hUpf3 in the splicing-dependent exon-exon junction complex. *Science* 293, 1832-1836.
- Kim-Ha, J., Kerr, K., and Macdonald, P. M. (1995). Translational regulation of oskar mRNA by bruno, an ovarian RNA-binding protein, is essential. *Cell* 81, 403-412.
- Kim-Ha, J., Smith, J. L., and Macdonald, P. M. (1991). oskar mRNA is localized to the posterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Cell* 66, 23-35.
- Kohrmann, M., Luo, M., Kaether, C., DesGroseillers, L., Dotti, C. G., and Kiebler, M. A. (1999). Microtubule-dependent recruitment of Staufén-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol. Biol. Cell* 10, 2945-2953.
- Krichevsky, A. M., and Kosik, K. S. (2001). Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron* 32, 683-696.
- Lau, C. K., Diem, M. D., Dreyfuss, G., and Van Duyne, G. D. (2003). Structure of the Y14-Magoh core of the exon junction complex. *Curr. Biol.* 13, 933-941.

- Le Hir, H., Gatfield, D., Izaurralde, E., and Moore, M. J. (2001). The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J.* 20, 4987-4997.
- Le Hir, H., Izaurralde, E., Maquat, L. E., and Moore, M. J. (2000a). The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J.* 19, 6860-6869.
- Le Hir, H., Moore, M. J., and Maquat, L. E. (2000b). Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions. *Genes Dev* 14, 1098-1108.
- Le, S., Sternglanz, R., and Greider, C. W. (2000). Identification of two RNA-binding proteins associated with human telomerase RNA. *Mol. Biol. Cell* 11, 999-1010.
- Lee, C. M., Haun, R. S., Tsai, S. C., Moss, J., and Vaughan, M. (1992). Characterization of the human gene encoding ADP-ribosylation factor 1, a guanine nucleotide-binding activator of cholera toxin. *J. Biol. Chem.* 267, 9028-9034.
- Lejeune, F., Ishigaki, Y., Li, X., and Maquat, L. E. (2002). The exon junction complex is detected on CBP80-bound but not eIF4E-bound mRNA in mammalian cells: dynamics of mRNP remodeling. *EMBO J.* 21, 3536-3545.
- Lejeune, F., Li, X., and Maquat, L. E. (2003). Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities. *Mol. Cell* 12, 675-687.

- Lejeune, F., Ranganathan, A. C., and Maquat, L. E. (2004). eIF4G is required for the pioneer round of translation in mammalian cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 992-1000.
- Li, C., Lin, R. I., Lai, M. C., Ouyang, P., and Tarn, W. Y. (2003). Nuclear Pnn/DRS protein binds to spliced mRNPs and participates in mRNA processing and export via interaction with RNPS1. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7363-7376.
- Li, P., Yang, X., Wasser, M., Cai, Y., and Chia, W. (1997). Inscuteable and Staufén mediate asymmetric localization and segregation of prospero RNA during *Drosophila* neuroblast cell divisions. *Cell* 90, 437-447.
- Li, S., and Wilkinson, M. F. (1998). Nonsense surveillance in lymphocytes? *Immunity* 8, 135-141.
- Luo, M., Duchaine, T. F., and DesGroseillers, L. (2002). Molecular mapping of the determinants involved in human Staufén-ribosome association. *Biochem. J.* 365, 817-824.
- Luo, M. L., Zhou, Z., Magni, K., Christoforides, C., Rappsilber, J., Mann, M., and Reed, R. (2001). Pre-mRNA splicing and mRNA export linked by direct interactions between UAP56 and Aly. *Nature* 413, 644-647.
- Lykke-Andersen, J., Shu, M. D., and Steitz, J. A. (2000). Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon. *Cell* 103, 1121-1131.

- Lykke-Andersen, J., Shu, M. D., and Steitz, J. A. (2001). Communication of the position of exon-exon junctions to the mRNA surveillance machinery by the protein RNPS1. *Science* 293, 1836-1839.
- Macchi, P., Kroening, S., Palacios, I. M., Baldassa, S., Grunewald, B., Ambrosino, C., Goetze, B., Lupas, A., St Johnston, D., and Kiebler, M. (2003). Barentsz, a new component of the Staufen-containing ribonucleoprotein particles in mammalian cells, interacts with Staufen in an RNA-dependent manner. *J. Neurosci.* 23, 5778-5788.
- Mallardo, M., Deitinghoff, A., Muller, J., Goetze, B., Macchi, P., Peters, C., and Kiebler, M. A. (2003). Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 2100-2105.
- Maquat, L. E. (2004a). Nonsense-mediated mRNA decay : A comparative analysis of different species. *Current Genomics* 5, 175-190.
- Maquat, L. E. (2004b). Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5, 89-99.
- Marion, R. M., Fortes, P., Beloso, A., Dotti, C., and Ortin, J. (1999). A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2212-2219.

- Matsuzaki, F., Ohshiro, T., Ikeshima-Kataoka, H., and Izumi, H. (1998). *miranda* localizes *staufen* and *prospero* asymmetrically in mitotic neuroblasts and epithelial cells in early *Drosophila* embryogenesis. *Development* 125, 4089-4098.
- Mendell, J. T., Sharifi, N. A., Meyers, J. L., Martinez-Murillo, F., and Dietz, H. C. (2004). Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. *Nat. Genet.* 36, 1073-1078.
- Micklem, D. R., Adams, J., Grunert, S., and St Johnston, D. (2000). Distinct roles of two conserved *Staufen* domains in *oskar* mRNA localization and translation. *EMBO J.* 19, 1366-1377.
- Mohr, S. E., Dillon, S. T., and Boswell, R. E. (2001). The RNA-binding protein *Tsunagi* interacts with *Mago Nashi* to establish polarity and localize *oskar* mRNA during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev.* 15, 2886-2899.
- Monshausen, M., Putz, U., Rehbein, M., Schweizer, M., DesGroseillers, L., Kuhl, D., Richter, D., and Kindler, S. (2001). Two rat brain *staufen* isoforms differentially bind RNA. *J. Neurochem.* 76, 155-165.
- Monshausen, M., Rehbein, M., Richter, D., and Kindler, S. (2002). The RNA-binding protein *Staufen* from rat brain interacts with protein phosphatase-1. *J. Neurochem.* 81, 557-564.
- Moriarty, P. M., Reddy, C. C., and Maquat, L. E. (1998). Selenium deficiency reduces the abundance of mRNA for Se-dependent glutathione peroxidase 1 by a UGA-

dependent mechanism likely to be nonsense codon-mediated decay of cytoplasmic mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2932-2939.

- Mouland, A. J., Mercier, J., Luo, M., Bernier, L., DesGroseillers, L., and Cohen, E. A. (2000). The double-stranded RNA-binding protein Staufen is incorporated in human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in genomic RNA encapsidation. *J. Virol.* 74, 5441-5451.
- Nagy, E., and Maquat, L. E. (1998). A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem. Sci.* 23, 198-199.
- Ohashi, S., Koike, K., Omori, A., Ichinose, S., Ohara, S., Kobayashi, S., Sato, T. A., and Anzai, K. (2002). Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor. *J. Biol. Chem.* 277, 37804-37810.
- Ohnishi, T., Yamashita, A., Kashima, I., Schell, T., Anders, K. R., Grimson, A., Hachiya, T., Hentze, M. W., Anderson, P., and Ohno, S. (2003). Phosphorylation of hUPF1 induces formation of mRNA surveillance complexes containing hSMG-5 and hSMG-7. *Mol. Cell* 12, 1187-1200.
- Pal, M., Ishigaki, Y., Nagy, E., and Maquat, L. E. (2001). Evidence that phosphorylation of human Upfl protein varies with intracellular location and is mediated by a wortmannin-sensitive and rapamycin-sensitive PI 3-kinase-related kinase signaling pathway. *RNA* 7, 5-15.

- Palacios, I. M., Gatfield, D., St Johnston, D., and Izaurralde, E. (2004). An eIF4AIII-containing complex required for mRNA localization and nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* 427, 753-757.
- Schuldt, A. J., Adams, J. H., Davidson, C. M., Micklem, D. R., Haseloff, J., St Johnston, D., and Brand, A. H. (1998). Miranda mediates asymmetric protein and RNA localization in the developing nervous system. *Genes Dev.* 12, 1847-1857.
- Serin, G., Gersappe, A., Black, J. D., Aronoff, R., and Maquat, L. E. (2001). Identification and characterization of human orthologues to *Saccharomyces cerevisiae* Upf2 protein and Upf3 protein (*Caenorhabditis elegans* SMG-4). *Mol. Cell. Biol.* 21, 209-223.
- Shen, C. P., Knoblich, J. A., Chan, Y. M., Jiang, M. M., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. (1998). Miranda as a multidomain adapter linking apically localized Inscuteable and basally localized Staufien and Prospero during asymmetric cell division in *Drosophila*. *Genes Dev.* 12, 1837-1846.
- Shibuya, T., Tange, T. O., Sonenberg, N., and Moore, M. J. (2004). eIF4AIII binds spliced mRNA in the exon junction complex and is essential for nonsense-mediated decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 346-351.
- Siebel, C. W., Kanaar, R., and Rio, D. C. (1994). Regulation of tissue-specific P-element pre-mRNA splicing requires the RNA-binding protein PSI. *Genes Dev* 8, 1713-1725.

- St Johnston, D. (1995). The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell* 81, 161-170.
- Sun, X., Perlick, H. A., Dietz, H. C., and Maquat, L. E. (1998). A mutated human homologue to yeast Upf1 protein has a dominant-negative effect on the decay of nonsense-containing mRNAs in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10009-10014.
- van Eeden, F. J., Palacios, I. M., Petronczki, M., Weston, M. J., and St Johnston, D. (2001). Barentsz is essential for the posterior localization of oskar mRNA and colocalizes with it to the posterior pole. *J. Cell Biol.* 154, 511-523.
- Wickham, L., Duchaine, T., Luo, M., Nabi, I. R., and DesGroseillers, L. (1999). Mammalian stau1 is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2220-2230.
- Wilusz, C. J., Wang, W., and Peltz, S. W. (2001). Curbing the nonsense: the activation and regulation of mRNA surveillance. *Genes Dev.* 15, 2781-2785.
- Zhang, J., Sun, X., Qian, Y., and Maquat, L. E. (1998). Intron function in the nonsense-mediated decay of beta-globin mRNA: indications that pre-mRNA splicing in the nucleus can influence mRNA translation in the cytoplasm. *RNA* 4, 801-815.

2.3.8 Figure legends

Figure 1. Human Upf1 interacts with human Staufen (Stau)1 in a yeast two-hybrid analyses, *in vitro* binding assays, and immunopurifications (IPs) of Stau1-HA₃ from Cos cells. (A) Yeast two-hybrid screening. Human Upf1 as bait interacts with human Stau1 from the pMyr-cDNA library (upper). Negative and Positive Controls were provided by Stratagene. The region of Stau1 that interacts with Upf1 was mapped to reside within the double-stranded RNA binding domain (dsRBD)⁴ and tubulin binding domain (TBD) (lower). (B) GST pull-down assays. *E. coli* lysates that expressed GST-Upf1 (+) were mixed with *E. coli* lysates that did not (-) or did (+) express 6xHis-Stau1, purified using Glutathione Sepharose beads (After) or not (Before), and subjected to Western blotting (WB) using α -GST antibody (upper) or α -His antibody (middle) either before or after GST pull-down. Additionally, a fraction of each sample before or after GST-pull-down was analyzed by Coomassie Blue staining to verify the presence of GST-Upf1 and 6xHis-Stau1 (lower, indicated by dots). (C) Far-Western analysis. *E. coli* lysates that did not (-) or did (+) produce either 6xHis-Stau1 or GST-Stau1 were subjected to Far-Western blotting (FW) using FLAG-Upf1 that had been immunopurified from HeLa cells (middle) or GST-Upf1 that had been immunopurified from *E. coli* (right). Interacting proteins were identified by Western blotting using α -FLAG or α -GST antibody, respectively. Expression of 6xHis-Stau1 and GST-Stau1 was also verified by staining each lysate with Coomassie Blue (left). (D) IP of Stau1-HA₃. Cos cells were transiently transfected with a plasmid that expressed the 55-kDa isoform of Stau1-HA₃. After cell lysis, RNA and protein were purified from

the lysate before and after IP using α -HA antibody or, to control for the specificity of the IP, rat (r) IgG. RNase A was added to half of each sample prior to IP. SMG7 mRNA was analyzed using RT-PCR to demonstrate that the RNase A digestion was complete (lower). The four left-most lanes represent 2-fold serial dilutions of RNA and demonstrate that the RT-PCR is semi-quantitative. Western blotting was used to detect the specified proteins (upper). The three left-most lanes represent 3-fold serial dilutions of protein before IP and demonstrate that the Western blotting is semi-quantitative. (E) IP of cellular Upf3/3X. Lysate from untransfected Cos cells was immunopurified using α -Upf3/3X antibody or, as a control for nonspecific IP, normal rabbit serum (NRS). Western blotting was used to analyze the specified proteins. Upf3 co-migrated with Ig heavy chains and, thus, could not be analyzed. (F) IP of FLAG-Upf1. Lysates of HeLa cells that did (+ pCI-neo-FLAG-UPF1) or did not (- pCI-neo-FLAG-UPF1) stably express FLAG-Upf1 was analyzed either before or after IP using α -FLAG antibody by Western blotting for the specified proteins.

Figure 2. Down-regulating cellular Stau1 has no detectable effect on the EJC-dependent NMD of Gl 39Ter or GPx1 46Ter mRNA. HeLa cells were transiently transfected with Stau1 siRNA, Upf3X siRNA, or a nonspecific Control siRNA. Two days later, cells were re-transfected with pmCMV-Gl and pmCMV-GPx1 test plasmids, either nonsense-free (Norm) or nonsense-containing (Ter), and the phCMV-MUP reference plasmid. After an additional day, protein and RNA were purified. (A) Western blot

analysis of the siRNA-mediated down-regulation of Stau1 or Upf3X, where the level of eIF3b served to control for variations in protein loading. (B) RT-PCR analysis of the level of Gl mRNA (left) or GPx1 mRNA (right), which was normalized to the level of MUP mRNA. Normalized levels of Norm mRNA in the presence of each siRNA were defined as 100%. Levels in three independently performed experiments did not vary by more than 7%.

Figure 3. Tethering Stau1 to the FLuc mRNA 3'UTR reduces FLuc mRNA abundance. (A) Schematic representations of firefly (F) and renilla (R) luciferase (Luc) expression plasmids pcFLuc-MS2bs, pcFLuc, and pRLuc, where X8 specifies eight tandem repeats of the MS2 coat protein binding site. (B) HeLa cells were co-transfected with the specified pcFLuc-MS2bs reporter plasmid, the pRLuc reference plasmid, as well the specified effector plasmid. Two days after transfection, protein and RNA were purified. Western blotting using α -HA antibody demonstrates effector expression (left). RT-PCR demonstrates that tethered Stau1 reduces FLuc-MS2bs mRNA abundance (right). Numbers below the figure represent the levels of FLuc or FLuc-MS2bs mRNA, which were normalized to the level of RLuc mRNA. Each normalized level of FLuc or FLuc-MS2bs mRNA was then calculated as a percentage of the normalized level of FLuc or FLuc-MS2bs mRNA that was obtained in the presence of pMS2-HA or pcNMS2, which was

defined as 100%. RT-PCR results in at least three independently performed experiments did not vary by more than 9%.

Figure 4. siRNA-mediated down-regulation of cellular Upf1 but not Upf2 or Upf3X inhibits the reduction in FLuc-MS2bs mRNA abundance that is mediated by tethered Stau1. (A-C) HeLa cells were transiently transfected with the specified siRNA. Two days later, cells were transfected with the pcFLuc-MS2bs reporter plasmid, the pRLuc reference plasmid, and the specified effector plasmid. Alternatively, cells were transfected with a pmCMV-GI test plasmid (either Norm or Ter) and the phCMV-MUP reference plasmid. After an additional two days, protein and RNA were purified. Western blotting was used to quantitate the extent of down-regulation (left). RT-PCR was used to quantitate the effects of siRNA on GI mRNA abundance, as in Figure 2B (middle). RT-PCR was used to quantitate the effects of siRNA on mRNA abundance that were mediated by tethering the specified protein as in Figure 3B (right). For all RT-PCR results, mRNA levels in at least two independently performed experiments did not differ by more than 10%.

Figure 5. Stau1 binds the 3'UTR of Arf1 mRNA and reduces its abundance in a mechanism that involves Upf1. (A) Schematic representations of the Arf1 gene and the pSport-Arf1 and pSport-Arf1 Δ (3'UTR) cDNA expression plasmids. (B) As in Figure 4A, except that HeLa cells were transiently transfected with the specified siRNA. Two days

later, cells were re-transfected with a pSport-Arf1 test plasmid and the reference phCMV-MUP plasmid. After an additional day, protein and RNA were isolated for Western analysis and RT-PCR, respectively. The efficiency of siRNA-mediated down-regulation of gene expression as assessed using Western blotting (upper). The levels of endogenous Arf1 and SMG7 mRNAs (middle) or of Arf1 mRNA that derived from pSport-Arf1 and MUP mRNA (lower) as assessed using RT-PCR. Numbers below the panel represent the level of Arf1 mRNA after normalization to the level of either SMG7 or MUP mRNA, where the normalized level of Arf1 mRNA in the presence of Control siRNA was defined as 100%. (C) As in (B) except that pSport Arf1 or pSport-Arf1 Δ (3'UTR) was used as test plasmid. The level of Arf1 mRNA or Arf1 Δ (3'UTR) mRNA that derives from pSport-Arf1 and the level of MUP mRNA were assessed using RT-PCR. (D) IP of Stau1-HA₃. Cos cells were transiently transfected with the Stau1-HA₃ expression vector, pSport-Arf1 or pSport-Arf1 Δ (3'UTR), and phCMV-MUP. Notably, cells were transfected with only half as much pSport-Arf1 Δ (3'UTR) relative to pSport-Arf1 in order to compensate for the difference in the level of product mRNA. Two days later, cells were lysed, and a fraction of lysates was immunopurified using α -HA antibody or, as a control, rIgG. Protein or RNA before and after IP was analyzed, respectively, using Western blotting and α -HA antibody (upper), or RT-PCR (lower). For all RT-PCR results, mRNA levels in two independently performed experiments did not differ by more than 20%.

Figure 6. Stau1 binds within an ~230-nt region of the Arf1 mRNA 3'UTR, and this region reduces the half-life of Arf1 mRNA in mechanism that depends on Stau1 and Upf1. (A) Schematic representations of the various Arf1 mRNAs harboring deletions within the 3'UTR. Numbering is relative to the first nucleotide of endogenous Arf1 mRNA, which is defined as 1. The upper-most construct represents full-length mRNA. (B) 293 cells were transfected with the Stau1-HA₃ expression vector and the specified pSport-Arf1 test plasmid. One-tenth of each IP was used to determine IP efficiencies using Western blotting (upper). RNA was isolated from the rest of the IP, and the level of Arf1 mRNA from each Sport test plasmid was quantitated by RT-PCR and ethidium bromide staining (lower). The level of Arf1 mRNA from each pSport test plasmid was similarly assessed before IP to control for variations in transfection efficiencies and RNA recovery. (C) L cells were transfected with mouse (m)Stau1, mUpf1, mUpf2 or Control siRNA. Two days later, cells were re-transfected with the pfos-Arf1-SBS test plasmid (upper left) and the pHCMV-MUP reference plasmid in the absence of serum. Serum was added to 15% after an additional 24 hr, and protein was purified from the cytoplasmic fraction for Western blotting (second-from-top, left and right). RNA was purified from the nuclear fraction for RT-PCR analysis at the specified times (second-from-bottom, left and right). For each time point, the level of pfos-Arf1-SBS mRNA was normalized to the level of MUP mRNA. Normalized levels were calculated as a percentage of the normalized level of fos-Arf1-SBS mRNA at 30 min in the presence of each siRNA, which was defined as 100. Normalized levels represent the

average of two independently performed experiments that did not vary by more than 20%. They are plotted as a function of time after serum addition (bottom, left and right).

Figure 7. Models for EJC-dependent NMD and SMD of Arf1 mRNA in mammalian cells. (A) Recruitment of Upf1 to one of the four EJCs of Arf1 mRNA via Upf2 and Upf3/3X. Within the nucleus, pre-mRNA splicing deposits an exon junction complex (EJC) of proteins that consists of RNPS1, Y14, SRm160, REF/Aly, Magoh, UAP56, Pnn/DRS and eIF4AIII (Chan et al., 2004; Ferraiuolo et al., 2004; Kataoka et al., 2000; Kim et al., 2001; Le Hir et al., 2000b, 2001; Lejeune et al., 2002; Li et al., 2003; Luo et al., 2001; Palacios et al., 2004; Shibuya et al., 2004) and is located ~20-25 nucleotides upstream of each exon-exon junction (Le Hir et al., 2000a). It is unknown if every protein is present within every EJC. The EJC consists of the NMD factor Upf3 or Upf3X, each of which binds Upf2, and Upf2 is thought to subsequently bind Upf1. EJC-dependent NMD occurs if translation terminates prematurely more than ~50-55 nucleotides upstream of any exon-exon junction, which would be ~20-25 nucleotide upstream of the corresponding EJC (only the 3'-most of which is shown). (B) Recruitment of Upf1 to the 3'UTR of Arf1 mRNA via Stau1. Stau1, which binds the 3'UTR of Arf1 mRNA, recruits Upf1 independently of an EJC. Data suggest that SMD occurs when translation terminates properly. By analogy to EJC-dependent NMD, the Stau1 binding site would reside more than ~20-25 nts downstream of the normal termination codon in order to elicit SMD. This is consistent with our finding that Stau1 binds at least 67-nt downstream of this codon.

2.3.9 Figures

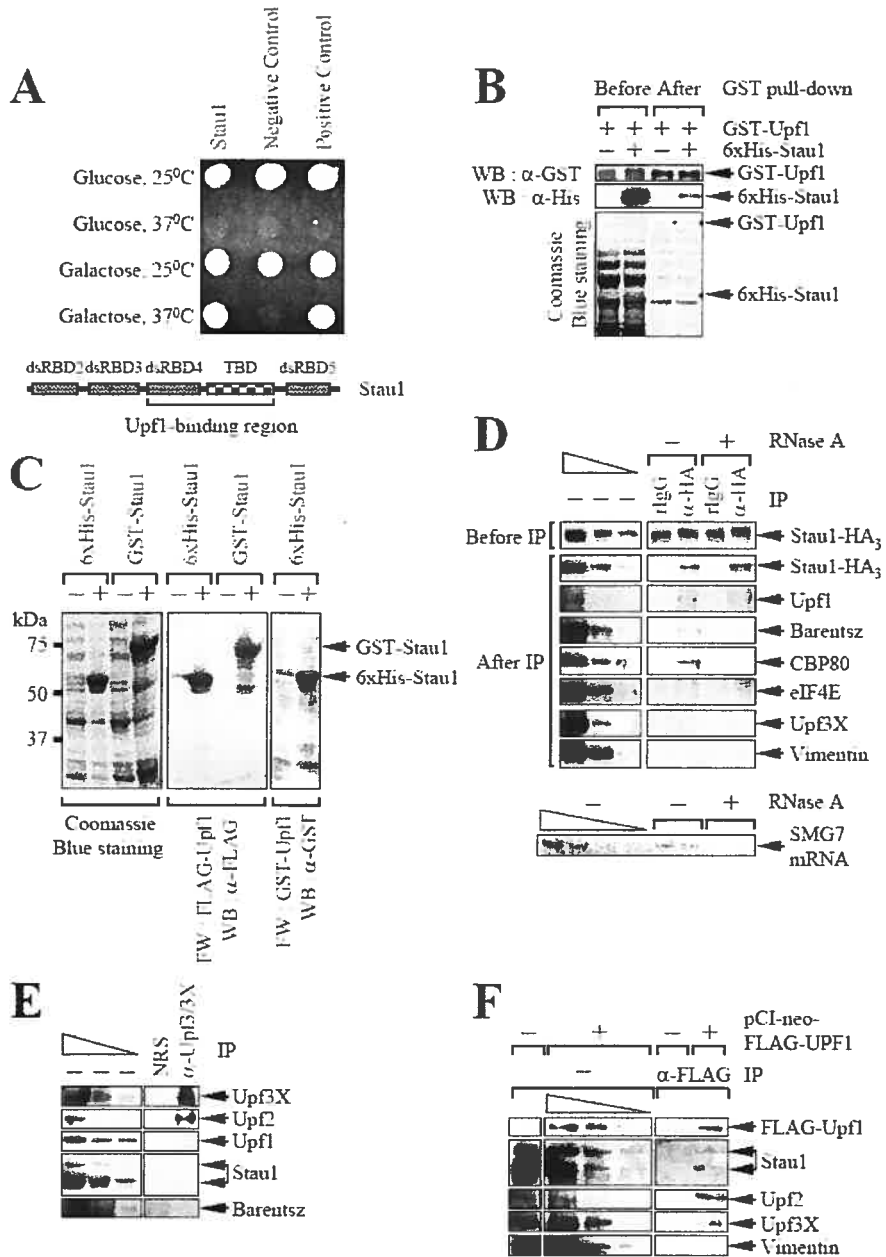


Figure 1. Human Upf1 interacts with human Staufen (Stau)1 in a yeast two-hybrid analyses, *in vitro* binding assays, and immunoprecipitations (IPs) of Stau1-HA₃ from Cos cells.

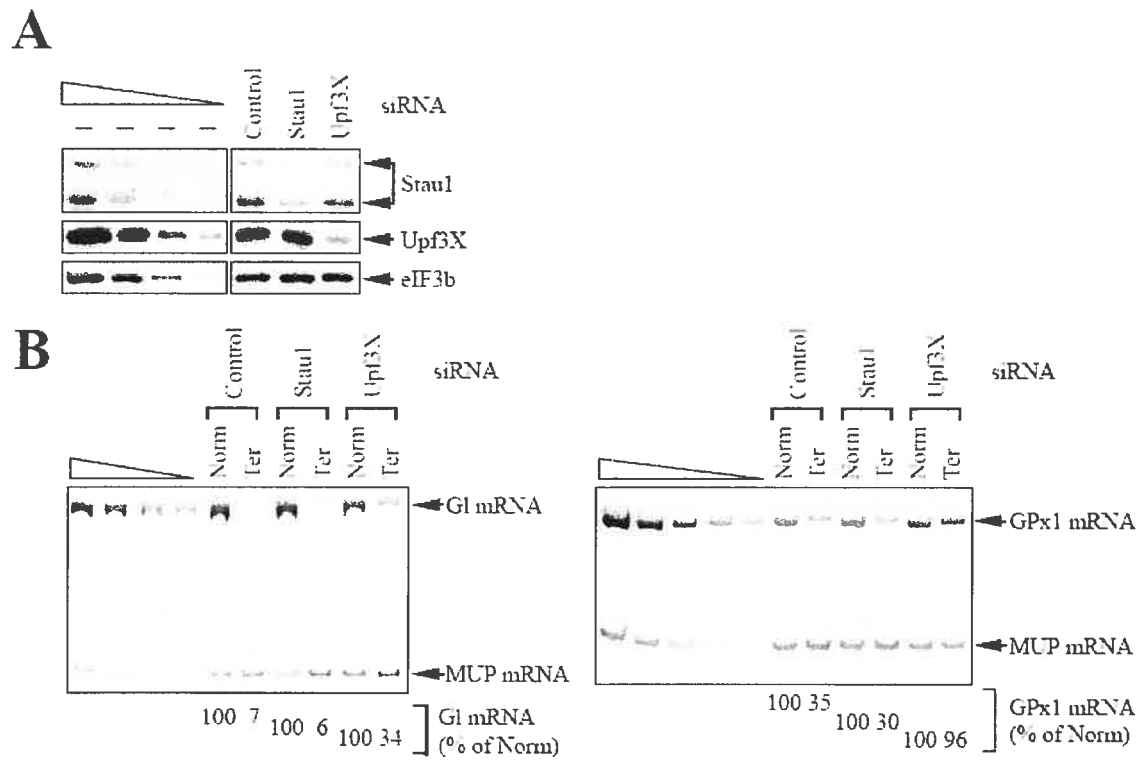


Figure 2. Down-regulating cellular Stau1 has no detectable effect on the EJC-dependent NMD of G1 39Ter or GPx1 46Ter mRNA.

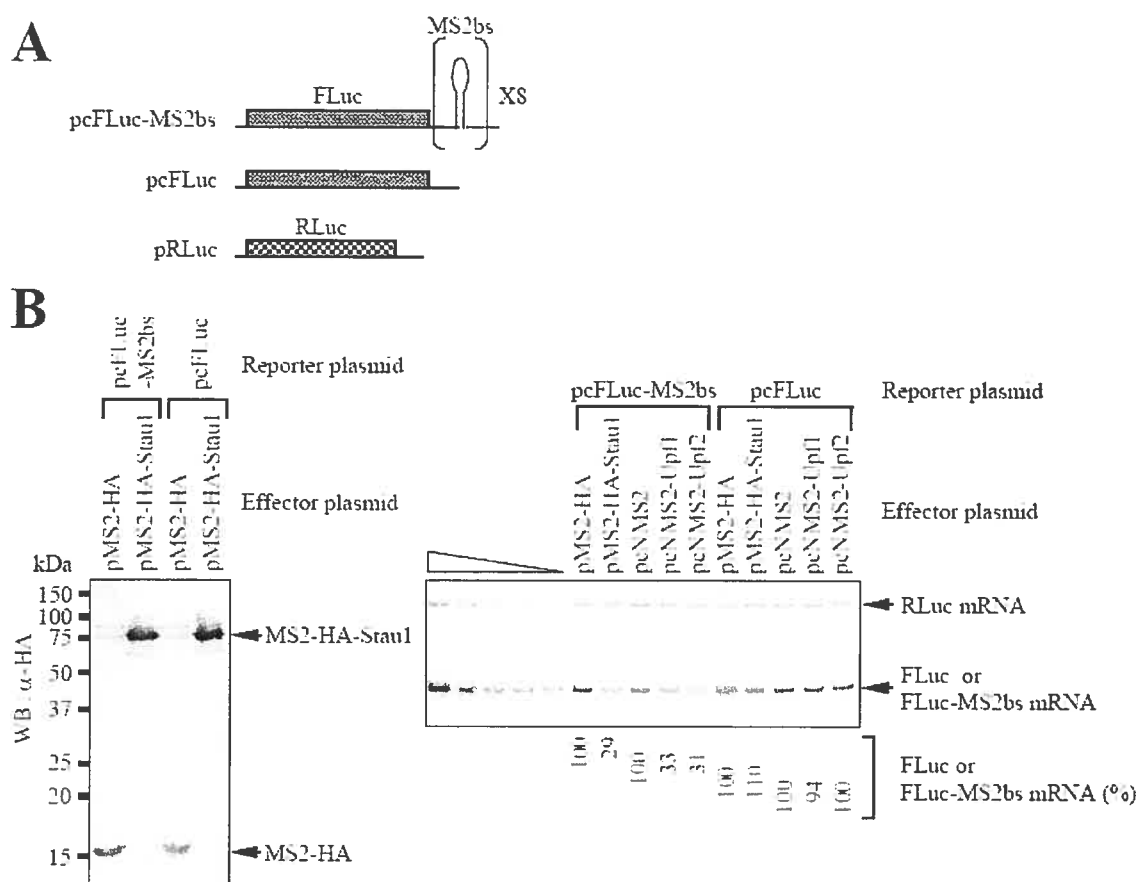


Figure 3. Tethering Stau1 to the FLuc mRNA 3'UTR reduces FLuc mRNA abundance.

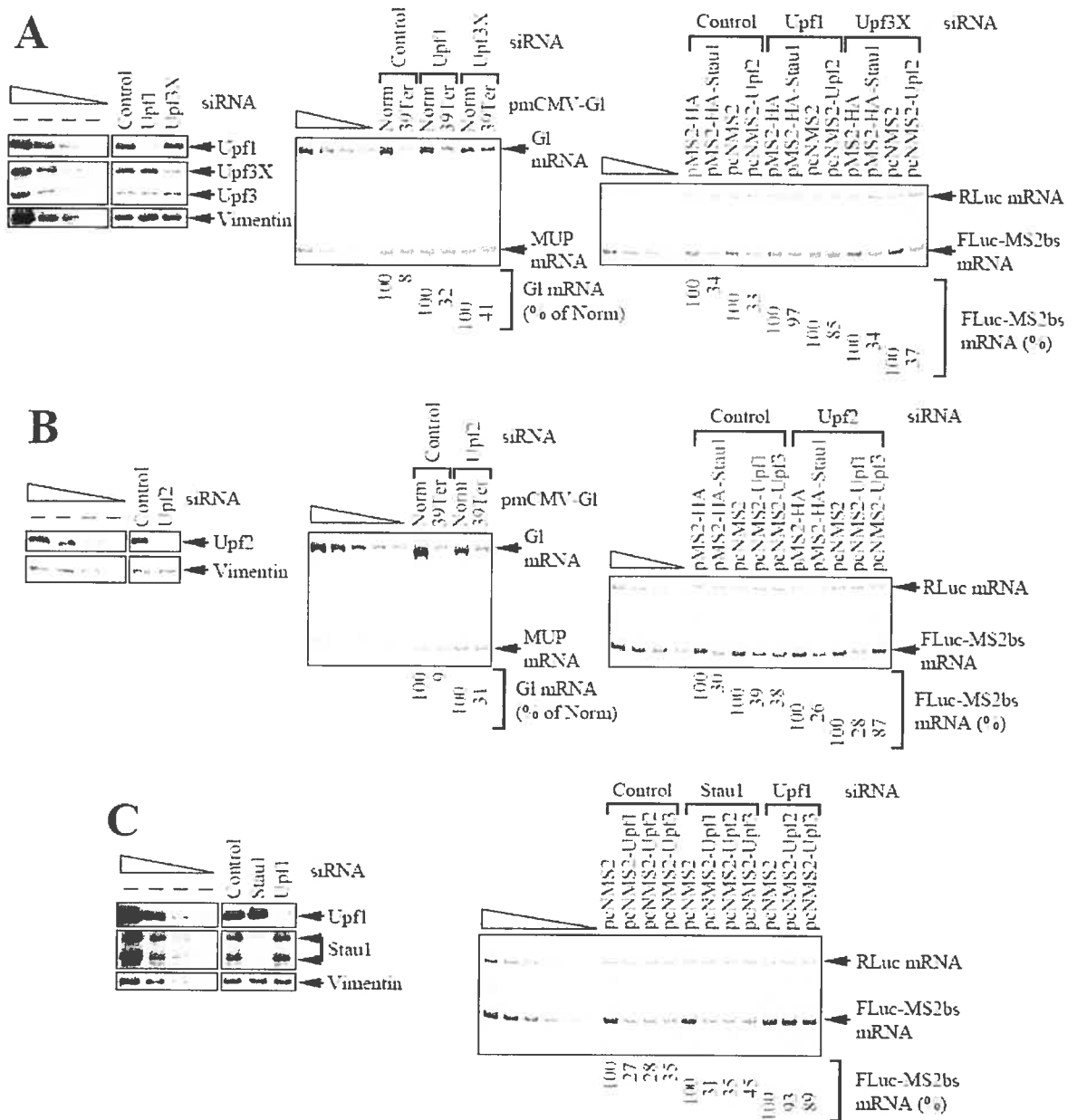


Figure 4. siRNA-mediated down-regulation of cellular Upf1 but not Upf2 or Upf3X inhibits the reduction in FLuc-MS2bs mRNA abundance that is mediated by tethered Stau1.

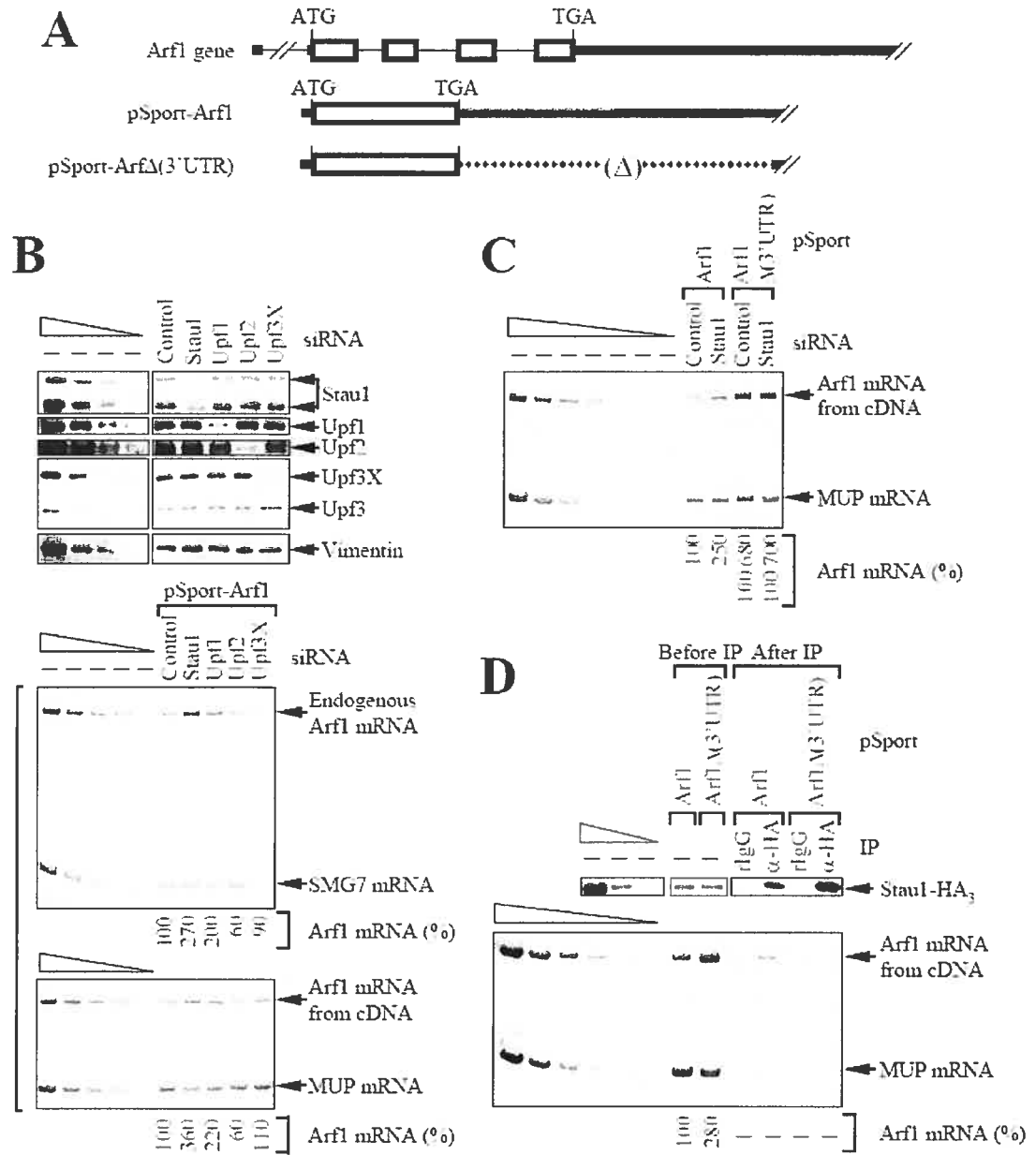


Figure 5. Stau1 binds the 3'UTR of Arf1 mRNA and reduces its abundance in a mechanism that involves Upf1.

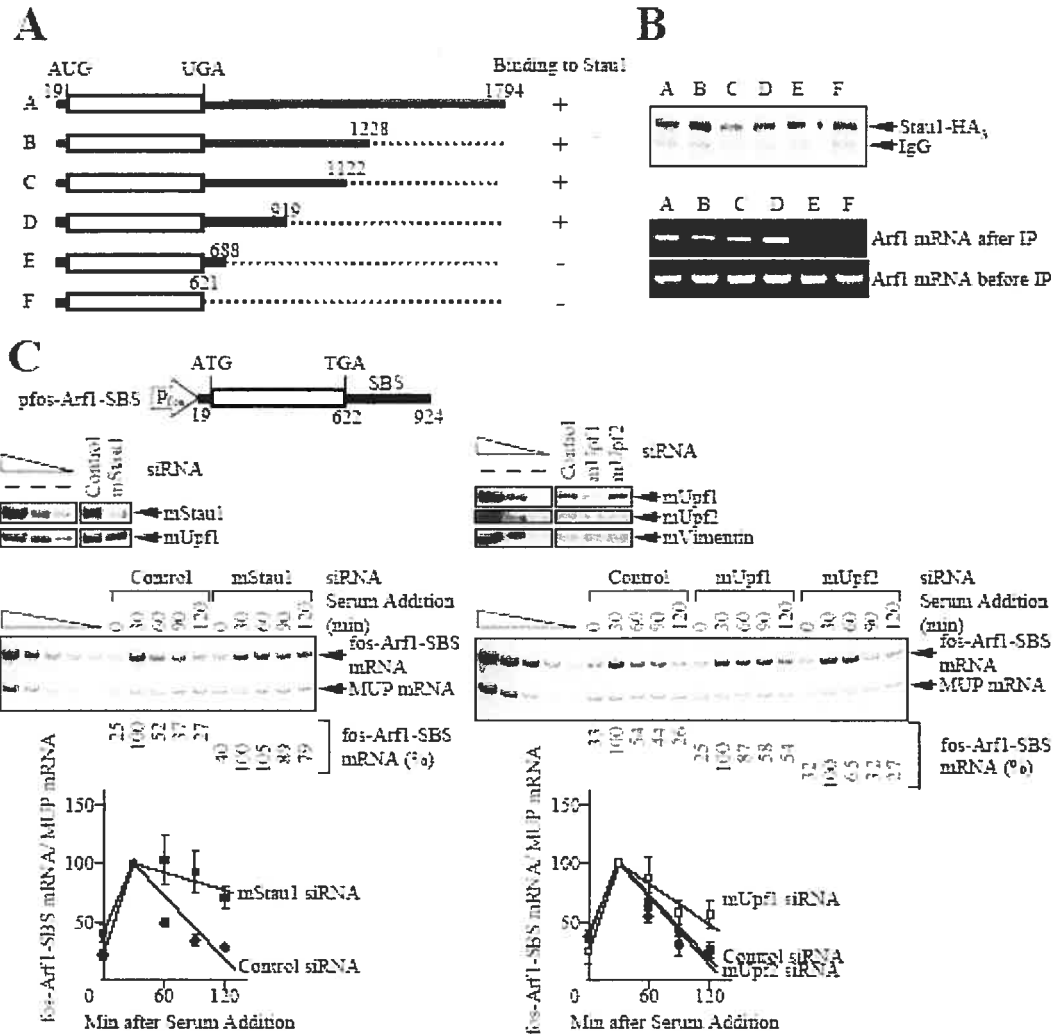
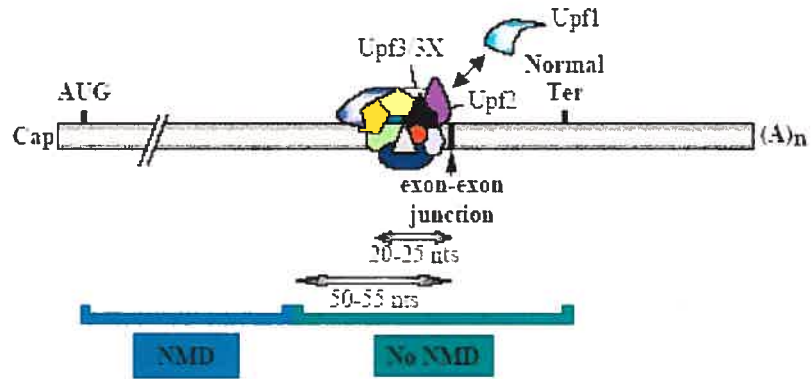


Figure 6. Stau1 binds within an ~230-nt region of the Arf1 mRNA 3'UTR, and this region reduces the half-life of Arf1 mRNA in mechanism that depends on Stau1 and Upf1.

A EJC-dependent Arf1 NMD



B EJC-independent Arf1 SMD

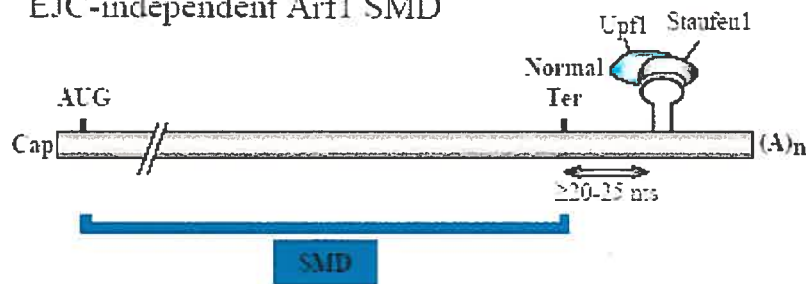


Figure 7. Models for EJC-dependent NMD and SMD of Arf1 mRNA in mammalian cells.

2.3.10 Supplementary Experimental Procedures

2.3.10.1 Plasmid Constructions

To construct pMS2-HA-eIF4AIII, which encodes N-terminal oligomerization-defective MS2 coat protein followed successively by an HA tag and full-length human eIF4AIII cDNA, pCI-neo that had been digested with NheI and NotI was ligated to two fragments: the NheI/BamHI fragment from pMS2-HA-Stau1 that contained the MS2 coat protein-encoding sequence, and a PCR-amplified fragment that contained human eIF4AIII cDNA and had been digested with BamHI and NotI. eIF4AIII cDNA was amplified using pcDNA3-HA-eIF4AIII (Chiu et al., 2004) and two primers: 5'-CGCGGATCCATGGCGACCACGGCCACGATGGCGACC-3' (sense) and 5'-ATAAGAATGCGGCCGCTCAGATAAGATCAGCAACGTTTCATCGG-3' (antisense), where underlined nucleotides specify the BamHI or NotI site, respectively.

To construct pcFLuc(UAA→CAA)-MS2bs, which lacks a termination codon upstream of the MS2 binding sites, pcFLuc-8bs that had been digested with NotI and EcoRV was ligated to a PCR-amplified fragment. This fragment, which contained the C-terminus of FLuc in which the UAA codon had been converted to a CAA codon, was digested with NotI and EcoRV prior to ligation. PCR reactions were performed using pR/HCV/F (Kim et al., 2003) and two primers: 5'-TTGACCGCTTGAAGTCTTTAATTAATAC-3' (sense) and 5'-

CGAAGCGGCCGCAATTACATTTTGCAATTTGGACTTTCCGCCCTTCTTGGC-3'

(antisense). Underlined nucleotides specify a NotI site.

To construct pcFLuc-SBS or pcFLuc-No SBS, pcFLuc-8bs was digested with XbaI and ligated to a XbaI-digested PCR-amplified fragment that had been generated using pSport-Arf1 and two primers: 5'-GCTCTAGAGTGACCGAATTCGTGAACGCGACCCCCCTCCCTCTCACTC-3' (sense) and 5'-GCTCTAGAGGGCCCAGGTGCCCATGGGCCTACATCCCC-3' (antisense) for pcFLuc-SBS, or 5'-GCTCTAGAGTGACCGAATTCGTGAGAGGGGATGTAGGCCCATGGGCAC-3' (sense) and 5'-GCTCTAGAGGGCCCAGGGGGAACAGCTGGGCTGGCGACTGG-3' (antisense) for pcFLuc-No SBS. Underlined nucleotides specify XbaI sites.

pfos-FLuc-SBS was constructed by ligating the Klenow-filled EcoRI/NcoI fragment from pfos-GI to a PCR-amplified fragment that contained FLuc-SBS cDNA and had been incubated with T4 DNA polymerase, T4 polynucleotide kinase and NcoI. To amplify FLuc-SBS cDNA, PCR was carried out using pcFLuc-SBS and two primers: 5'-CATGCCATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGC-3' (sense) and 5'-CGGAATTCCAGGTGCTTATGGGCCTACATCCCCTCTCAGCAC-3' (antisense), where underlined nucleotides specify the NcoI or EcoRI site.

pSport-PAICS was purchased from ATCC (catalog # MGC-5024, NCBI Accession # BC010273). pSport-PAICSΔ(3'UTR) was generated using pSport-PAICS and

two primers: 5'-CCAAGCTTACGCGTACCCAGCTTTC-3' (sense) and 5'-CCCCTAAAAAATTCAATGGCATTCTTTC-3' (antisense). PCR amplification was carried out using Pfu Ultra (Stratagene). The PCR product was incubated with DpnI to digest the methylated template DNA, phosphorylated at the 5' ends using T4 polynucleotide kinase (Fermentas), and circularized by ligation.

pCDNA3-RSV-CK2A2 was constructed by inserting a BamHI/XhoI fragment from pOTB7-CK2A2 (ATCC catalog # MGC-10397, NCBI Accession # BC008812) into pCDNA3-RSV that had been digested with BamHI and XhoI.

2.3.10.2 siRNA sequences

Stau1(A) siRNA consisted of 5'-r(GUUUGAGAUUGCACUAAAA)d(TT)-3'. Upf1(A) siRNA consisted of 5'-r(AACGUUUGCCGUGGAUGAG)d(TT)-3'.

2.3.10.3 RT-PCR

FLuc-MS2bs mRNA or FLuc(UAA→CAA)-MS2bs mRNA was amplified using the primers 5'-CAACACCCCAACATCTTCG-3' (sense) and 5'-CTTTCCGCCCTTCTTGGCC-3' (antisense). GI-MS2bs or GI(UAA→UAC)-MS2bs was amplified using the primers 5'-AATACGACTCACTATAGGGA-3' (sense), which annealed to the T7 promoter, and 5'-GATACTTGTGGGCCAGGGCA-3' (antisense). FLuc-SBS mRNA was amplified using the same T7 promoter primer (sense) and 5'-TCTAGAGGATAGAATGGCG-3' (antisense). fos-FLuc-SBS mRNA was amplified

using the primers 5'-GCAGCGAGCAACTGAGAAGC-3' (sense) and 5'-TCTAGAGGATAGAATGGCG-3' (antisense). PAICS mRNA was amplified using the primers 5'-AGCAGGCTGGTACCGGTCCG-3' (sense) and 5'-ACCAATGTTCAGTACCTCAG-3' (antisense).

2.3.10.4 Microarray Analysis

The IP of Stau1-containing RNP was performed as previously described (Duchaine et al., 2000). Constituent RNAs were purified and deemed to be intact using an RNA 6000 Nano LabChip (Agilent) together with a Bioanalyser 2100 and Biosizing software (Agilent). Biotin-labeled cRNAs were generated and hybridized to U133A 22000 human genes chips. Hybridized chips were scanned using an Agilent GeneArray scanner 2500 (Affymetrix), and scanned images were analyzed using Microarray Analysis Suite version 5.0 (Affymetrix). Notably, the Affymetrix Gene Expression Assay identifies changes that are greater than 2-fold with 98% accuracy (Wodicka et al., 1997). Changes of at least 2.5-fold were scored as Stau1-interacting transcripts.

2.3.11 Supplementary References

Duchaine, T., Wang, H. J., Luo, M., Steinberg, S. V., Nabi, I. R., and DesGroseillers, L. (2000). A novel murine Stau1 isoform modulates the RNA content of Stau1 complexes. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5592-5601.

Kim, Y. K., Lee, S. H., Kim, C. S., Seol, S. K., and Jang, S. K. (2003). Long-range RNA-RNA interaction between the 5' nontranslated region and the core-coding sequences of hepatitis C virus modulates the IRES-dependent translation. *RNA* 9, 599-606.

Wodicka, L., Dong, H., Mittmann, M., Ho, M. H., and Lockhart, D. J. (1997). Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Biotechnol.* 15, 1359-1367.

2.3.12 Supplementary Figure legends

Figure S1. The abundance of FLuc-MS2bs mRNA is reduced by MS2-HA-Stau1 or MS2-Upf1 but not by MS2-HA-eIF4AIII, myc-Upf1 or Stau1-HA₃. As in Figure 3, except that the specified effector plasmids were used. (A) Western blot analysis of MS2-HA, MS2-HA-Stau1 and MS2-HA-eIF4AIII expression using α -HA antibody (left), MS2-Upf1, myc-Upf1 and endogenous Upf1 expression using α -Upf1 antibody (upper right), and MS2-HA, MS2-HA-Stau1 and Stau-HA₃ expression using α -Stau1 antibody (lower right). Endogenous Stau1 was detectable with enhanced chemiluminescence (data not shown). (B) RT-PCR analysis of the levels of FLuc-MS2bs and RLuc mRNAs. Numbers below the figure represent the levels of FLuc-MS2bs mRNA, each of which was normalized to the corresponding level of RLuc mRNA. Normalized levels were then calculated as a percentage of the normalized level of FLuc-MS2bs mRNA that was obtained in the presence of pMS2-HA, pcNMS2, pCMV-myc, or pCDNA3 RSV (i.e., the vector for hStau1-HA₃ expression), each of which was defined as 100%. Results represent two

independently performed experiments, and RT-PCR quantitations did not vary by more than 11%.

Figure S2. Evidence that Stau1 reduces mRNA abundance in a way that depends on a termination codon that is located upstream of the Stau1 binding site. HeLa cells were transfected as described in the legend to Figure 3 using the specified test, reference and effector plasmids. (A) Schematic representations of the pcFLuc-MS2bs, pcFLuc(UAA→CAA)-MS2bs, pcGI-MS2bs and pcGI(UAA→UAC)-MS2bs test plasmids (the latter two were called pcβ-6bs and pcβUAC-6bs, respectively, in Lykke-Andersen et al., 2000). (B) Quantitation of MS2-HA and MS2-HA-Stau1 expression. As in Figure 3, except that pcFLuc(UAA→CAA)-MS2bs was a reporter plasmid. (C) As in Figure 3, except that pcGI-MS2bs and pcGI(UAA→UAC)-MS2bs were reporter plasmids, and pHCMV-MUP was the reference plasmid. Results represent two independently performed experiments, and RT-PCR quantitations did not vary by more than 11%.

Figure S3. Stau1 binds Arf1 mRNA. (A) IP of Stau1-HA₃. 293 cells were transiently transfected with a plasmid that expressed Stau1-HA₃ or, to control for nonspecific IP, Stau1-6xHis. Two days later, cells were lysed, a fraction of cell lysates was immunopurified using α-HA antibody, and Stau1 was identified before and after IP using

Western blotting and α -Stau1 antibody. Asterisks denote the 63-kDa and 55-kDa isoforms of endogenous Stau1. (B) Identification of Arf1 mRNA in Stau1-containing RNP. Biotin-labeled cRNA was synthesized using RNA that had been immunopurified using α -HA antibody from Stau1-HA₃- or Stau1-6xHis-expressing cells. Alternatively, biotin-labeled cRNA was synthesized using poly(A)⁺ RNA from untransfected cells. The histogram represents the amount of hybridized Arf1 mRNA that was either immunopurified using α -HA antibody from Stau1-HA₃-expressing cells (left) or present in untransfected 293-cell poly(A)⁺ RNA (right), both of which are presented relative to the amount of hybridized Arf1 mRNA that was immunopurified using α -HA antibody from Stau1-6xHis-expressing cells. A ratio of more than 2.5 is statistically significant. (C) RT-PCR of Arf1 mRNA in Stau1-containing RNPs. 293 cells were transiently transfected with plasmid that expressed either Stau1-HA₃ or, as a control, Stau1-6xHis. As in (A), except that immunopurified RNA was purified, and Arf1 mRNA was amplified using RT-PCR (two left-most lanes). Alternatively, lysates from untransfected 293 cells were immunopurified using α -Stau1 antibody (right) or an unrelated ascites fluid for the analysis of Arf1 mRNA. Similar results were obtained in three independently performed experiments.

Figure S4. A comparable increase in the abundance of Arf1 mRNA that derives from pSport-Arf1 is obtained using two different Stau1 siRNAs or two different Upf1 siRNAs. As in Figure 5B. However, Stau1(A) or Upf1(A) siRNA was analyzed in parallel

to, respectively, the Stau1 or Upf1 siRNA that was analyzed in Figure 5B. (A) Western blotting demonstrates down-regulation of Stau1 (left), and RT-PCR demonstrates that down-regulating Stau1 increased the level of Arf1 mRNA abundance (right). (B) As in (A), except that Upf1 was down-regulated. Results represent two independently performed experiments, and RT-PCR quantitations did not vary by more than 12%.

Figure S5. Inserting the Stau1 binding site (SBS; nts 622-924) of the Arf1 mRNA 3'UTR within FLuc mRNA results in a Stau1-dependent reduction in FLuc mRNA half-life, whereas inserting a different region (No SBS; nts 899-1144) of the Arf1 mRNA 3'UTR does not. (A, left) Schematic representations of pcFLuc-SBS and pcFLuc-No SBS test plasmids. Notably, the Arf1 SBS maintains the distance and sequence of the minimized Stau1 binding site (nts 688-919) relative to the normal termination codon. (A, middle and right) As in Figures 5B and C, except that only Stau1 was down-regulated and pcFLuc-SBS or pcFLuc-No SBS were the test plasmids. Western blotting revealed that Stau1 siRNA reduced the level of Stau1 to 11% of normal. (B) As in Figure 6C, except that only mStau1 was down-regulated and pfos-FLuc-SBS was the test plasmid. Western blotting revealed that mStau1 siRNA reduced the level of mStau1 to 29%. Results represent two independently performed experiments, and RT-PCR quantitations did not vary by more than 9% (A) or 29% (B).

Figure S6. Down-regulating Stau1 has no effect on the half-life of fos-Arf1 Δ (3'UTR) mRNA. As in Figure S5B, except that the test plasmid was pfos-Arf1 Δ (3'UTR). Results represent two independently performed experiments, and RT-PCR quantitations did not vary by more than 19%.

Figure S7. The 3'UTR of PAICS mRNA, which encodes phosphoribosylaminoimidazole carboxylase and phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase activities, also binds Stau1, and down-regulating Stau1 increases PAICS mRNA abundance. (A) As in Figure 6B, except that 293 cells were transfected with test plasmid pSport-PAICS or, as a negative control, pCDNA3-RSV-CK2A2, which encodes casein kinase 2 alpha prime polypeptide. (B) As in Figure 5D, except that pSport-PAICS or pSport-PAICS Δ (3'UTR) was the test plasmid. The small amount of MUP mRNA that was detected in the IP represents background since (i) MUP mRNA was never detected in other IPs and (ii) a comparison of the levels of PAICS and MUP mRNAs before and after IP shows a 110-fold enrichment of PAICS mRNA relative to MUP mRNA after IP. (C) As in Figure 5B, except that only Stau1 was down-regulated and pSport-PAICS was the test plasmid. Results represent two independently performed experiments, and RT-PCR quantitations did not vary by more than 7%.

2.3.13 Supplementary Figures

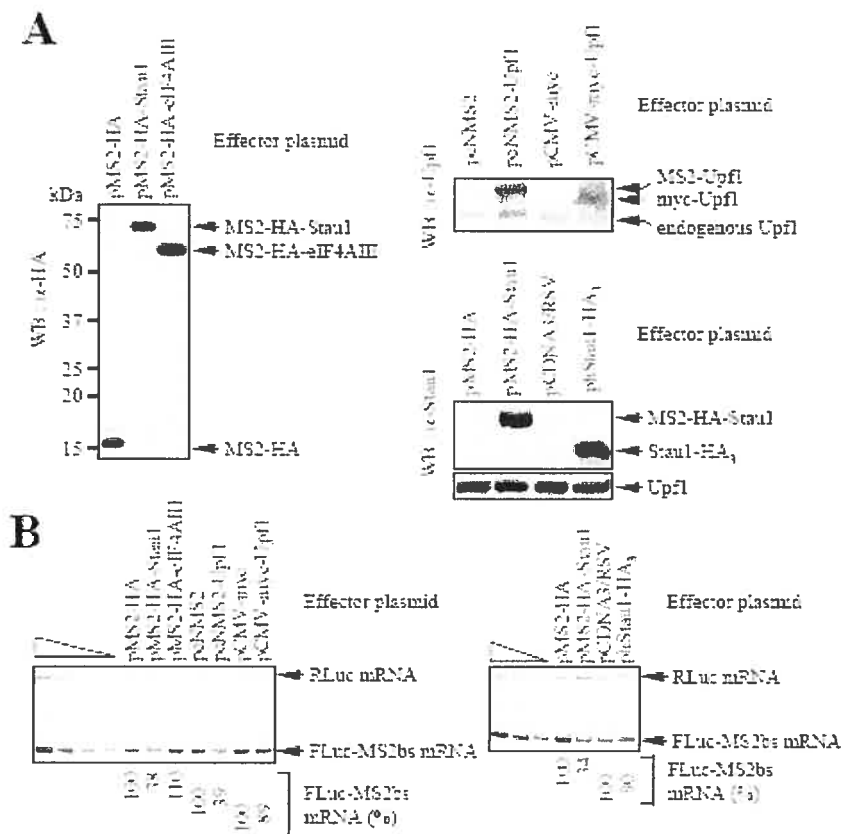


Figure S1. The abundance of FLuc-MS2bs mRNA is reduced by MS2-HA-Stau1 or MS2-Upf1 but not by MS2-HA-eIF4AIII, myc-Upf1 or Stau1-HA₃.

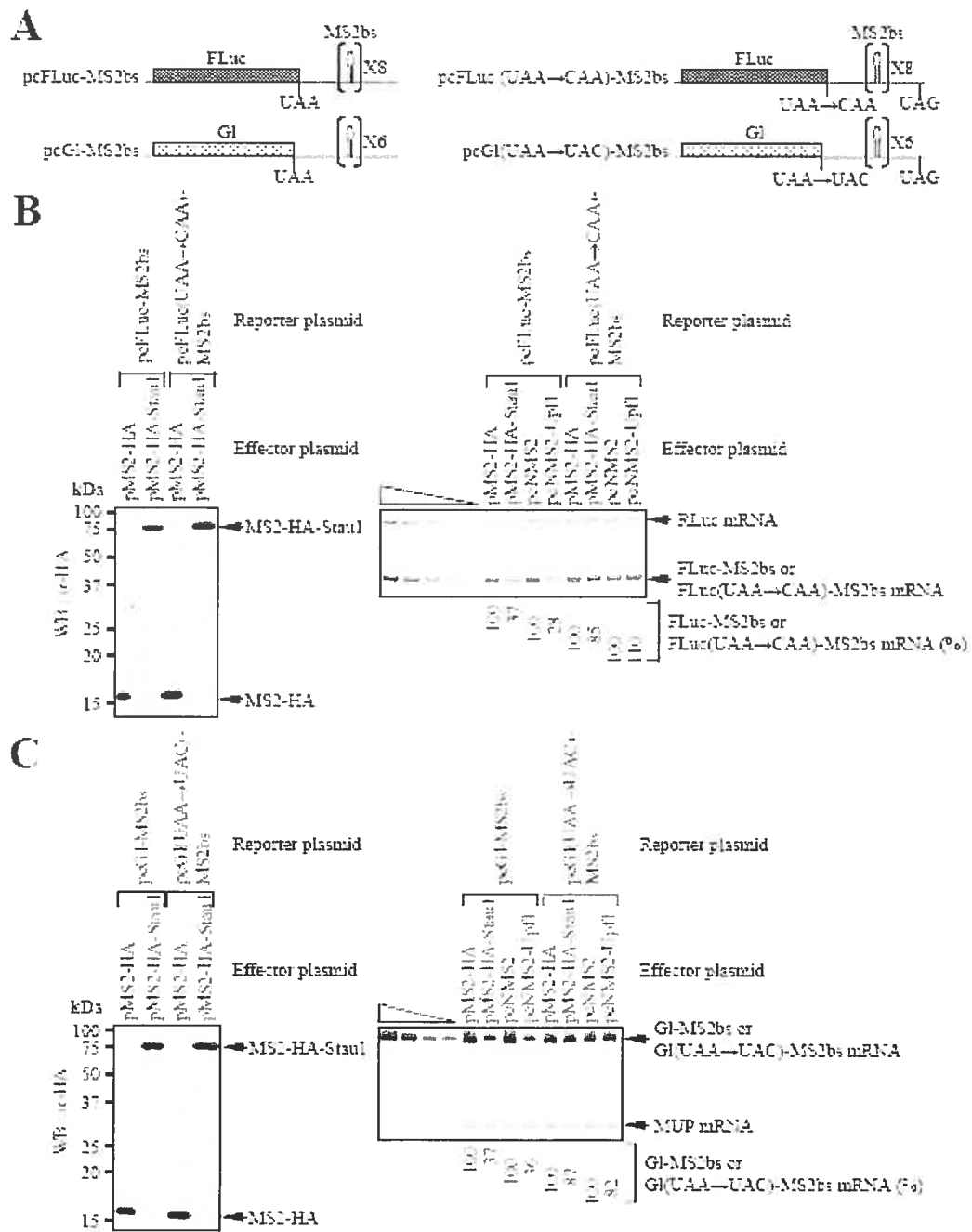


Figure S2. Evidence that Stau1 reduces mRNA abundance in a way that depends on a termination codon that is located upstream of the Stau1 binding site.

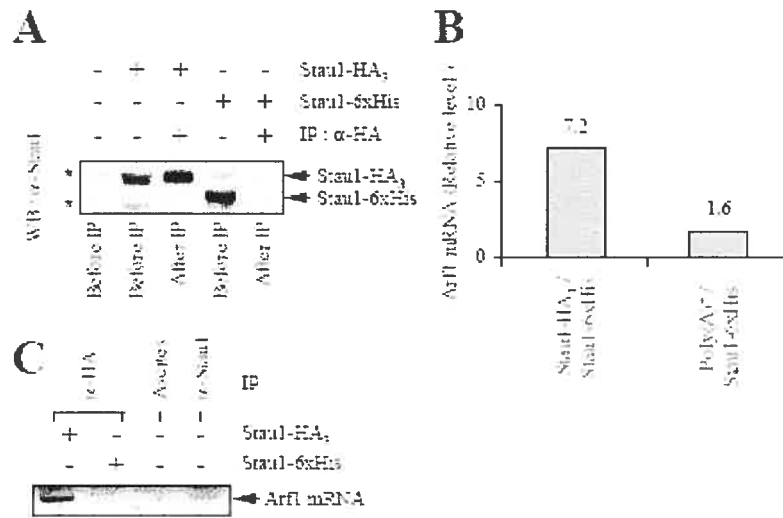


Figure S3. Stau1 binds Arf1 mRNA.

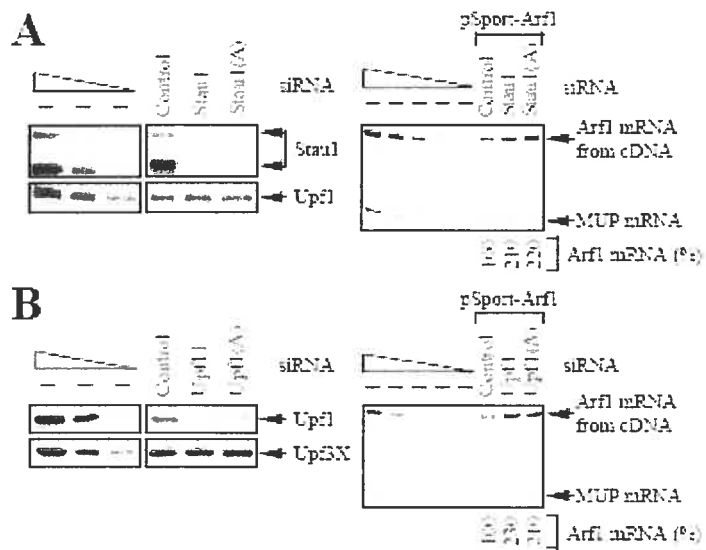


Figure S4. A comparable increase in the abundance of Arf1 mRNA that derives from pSport-Arf1 is obtained using two different Stau1 siRNAs or two different Upf1 siRNAs.

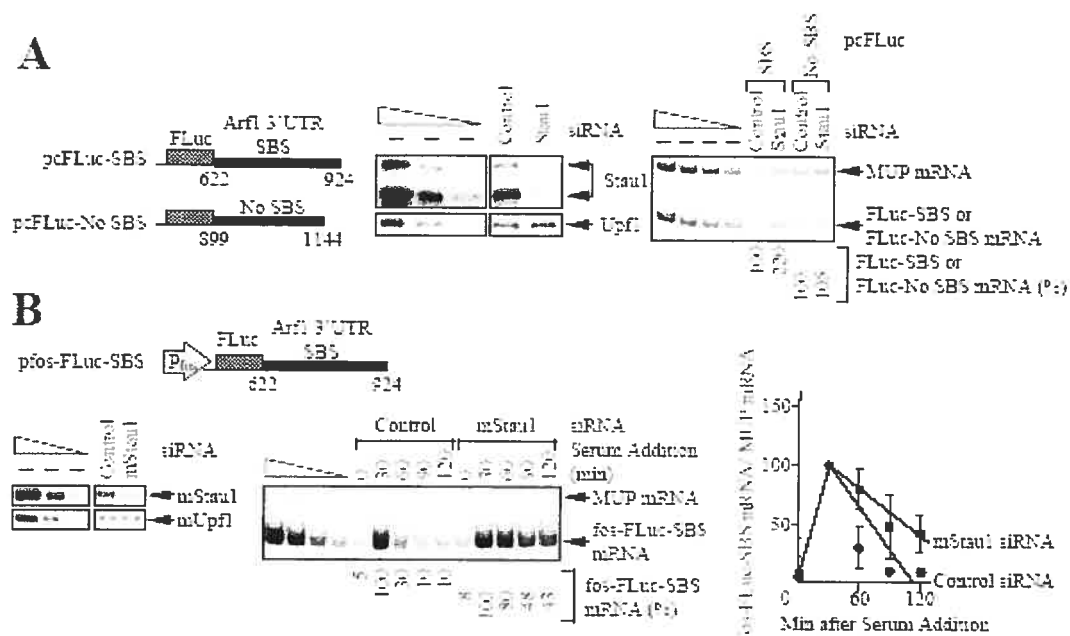


Figure S5. Inserting the Stau1 binding site (SBS; nts 622-924) of the Arf1 mRNA 3'UTR within FLuc mRNA results in a Stau1-dependent reduction in FLuc mRNA half-life, whereas inserting a different region (No SBS; nts 899-1144) of the Arf1 mRNA 3'UTR does not.

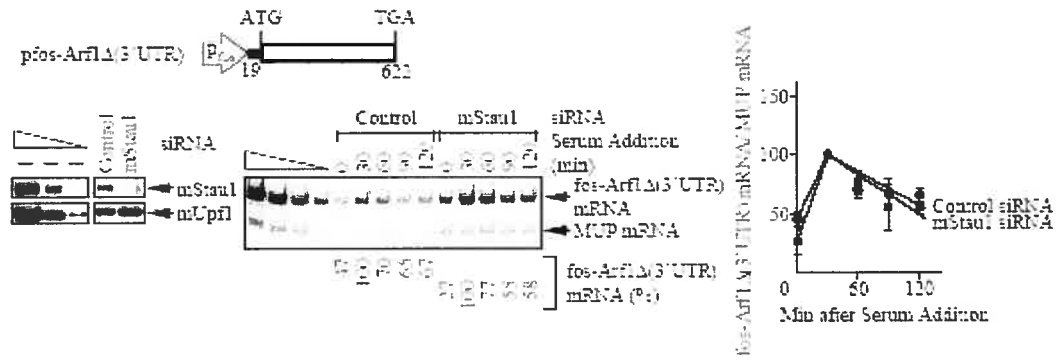


Figure S6. Down-regulating Stau1 has no effect on the half-life of fos-Arf1Δ(3'UTR) mRNA.

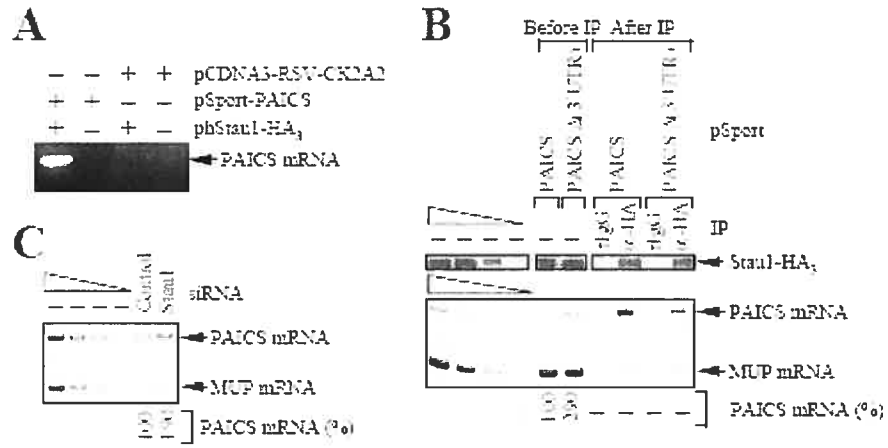


Figure S7. The 3'UTR of PAICS mRNA also binds Stau1 and down-regulating Stau1 increases PAICS mRNA abundance.

Table S1 Genes that Encode Putative Stau1-binding mRNAs as Determined by Microarray Analysis

Gene Symbol	Accession Number	Gene Name
ARF1	AA530004	ADP-ribosylation factor 1
MGC14799	BC005995	hypothetical protein MGC14799
GNA5	AF064091	GNA5 complex locus
DFFA	NM_004401	DNA fragmentation factor 45kDa alpha polypeptide
CSDA	NM_005651	cold shock domain protein A
SEC61A1	NM_013536	Sec61 alpha 1 subunit (<i>S. cerevisiae</i>)
P5MD12	NM_002816	proteasome (prosome macropain) 26S subunit non-ATPase 12
EIF5A	NM_001970	eukaryotic translation initiation factor 5A
C4orf9	R36783	chromosome 4 open reading frame 9
FLJ10613	NM_019067	hypothetical protein FLJ10613
GNE	NM_005476	glucosamine (UDP-N-acetyl)-2-epimerase N-acetylmannosamine kinase
FLJ30555	AW873564	<i>E. sapientis</i> transcribed sequences
LOC149603	AA035748	hypothetical protein LOC149603
TEGT	NM_003217	testis enhanced gene transcript (BAX inhibitor 1)
MCM4	A1859855	MCM4 minichromosome maintenance deficient 4 (<i>S. cerevisiae</i>)
LOC63929	NM_022098	hypothetical protein LOC63929
KIAA0186	NM_021067	KIAA0186 gene product
PRKAR2A	BF246917	protein kinase cAMP-dependent regulatory type II alpha
NUTF2	NM_005796	nuclear transport factor 2
GDF1	NM_001492	growth differentiation factor 1
PAICS	AA002652	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase
TMPO	AF113662	thymopoietin
AAMP	NM_001037	angio-associated migratory cell protein

293 cells were transiently transfected with a plasmid that expressed Stau1-HA, or, to control for nonspecific IP, Stau1-6xHis. Biotin-labeled cRNA was synthesized from RNA that had been immunoprecipitated using anti-HA antibody and hybridized to Affymetrix U133A microarrays. Changes of at least 2.5-fold were scored as Stau1-interacting transcripts.

Supplementary Table S1. Genes that Encode Putative Stau1-binding mRNAs as Determined by Microarray Analysis.

3 Article 2

Kim YK.*, Furic L.*, Parisien M., Major F., DesGroseillers L. and Lynne E. Maquat.
Staufen1-Mediated mRNA Decay Contributes Widely to the Network of
Posttranscriptional Regulatory Mechanisms in Mammalian Cells. Soumis à EMBO le 28
décembre 2006. *Co-premier auteur.

3.1 Mise en contexte

Les travaux présentés dans cet article ont été entrepris à la suite de la découverte du mécanisme de dégradation de l'ARNm dépendant de Stau1 : le SMD. Nous avons voulu identifier globalement les cibles cellulaires du SMD. Pour ce faire, des expériences de sous-expression de Stau1 ont été effectuées et les variations dans les niveaux stationnaires d'expression des ARNm cellulaires ont été observées par hybridation de micro-puces d'ADN. Nous avons également caractérisé les sites de liaisons à Stau1 de certains de ces transcrits.

3.2 Contributions des auteurs

Yoon Ki Kim : Transfection de siRNA. Analyse par RT-PCR du niveau stationnaire de divers transcrits. Co-immunoprécipitations. « GST-pulldown ». Études de demi-vies d'ARNm. Construction de plasmides. Rédaction.

Luc Furic: Co-immunoprécipitations. Analyse de micro-puces d'ADN. Construction de plasmides. Analyse par RT-PCR de l'association de transcrits rapporteurs à Stau1. Rédaction.

Marc Parisien : Modélisation de structure secondaire d'ARN.

François Major : Rédaction.

Luc DesGroseillers : Supervision générale. Rédaction.

Lynne E. Maquat : Supervision générale. Rédaction.

3.3 Staufen1-Mediated mRNA Decay Contributes Widely to the Network of Posttranscriptional Regulatory Mechanisms in Mammalian Cells

Yoon Ki Kim,^{1,2,3} Luc Furic,^{3,4} Marc Parisien,⁵ François Major,⁵ Luc DesGroseillers,⁴ and Lynne E. Maquat^{1*}

¹Department of Biochemistry and Biophysics, School of Medicine and Dentistry, University of Rochester, 601 Elmwood Avenue, Box 712, Rochester, New York 14642

⁴Département de Biochimie, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre Ville, Montréal, (Qué) Canada H3C 3J7

⁵Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre Ville, Montréal, (Qué) Canada H3C 3J7

*Correspondence: [REDACTED]

²Present address: School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

³These authors contributed equally to the work.

3.3.1 Summary

It is currently unknown how extensively Staufen (Stau)1-mediated mRNA decay (SMD) is utilized by mammalian cells to downregulate gene expression. To date, SMD has been shown to target a single mRNA for degradation via a translation dependent mechanism in which the double-stranded RNA binding protein Stau1 recruits the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) factor Upf1 to the mRNA 3' untranslated region. Here, we use microarray analyses to examine changes in the abundance of cellular mRNAs that occur when Stau1 is depleted. We find that 1.1% of the 11,569 HeLa-cell transcripts that were analyzed are upregulated in three independently performed experiments. We also characterize the Stau1 binding site within a number of natural SMD targets and demonstrate the importance of RNA base-pairing for binding. These and substantiating results suggest that SMD is a post-transcriptional regulatory pathway that influences the expression of a wide variety of physiologic transcripts and metabolic pathways.

3.3.2 Introduction

Staufen (Stau)1-mediated mRNA decay (SMD) is a translation-dependent mechanism that occurs when Stau1, together with the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) factor Upf1, is bound sufficiently downstream of a termination codon (Kim et al., 2005). The one proven physiologic target of SMD encodes ADP ribosylation factor (Arf)1, which is a G protein involved in membrane trafficking and organelle structure (Kim et al., 2005). Stau1 binds to the 3' untranslated region (UTR) of Arf1 mRNA and triggers SMD through Upf1 when translation terminates at the normal termination codon (Kim et al., 2005).

Upf1 acts after Stau1 during SMD (Kim et al., 2005). Upf1 also acts after the NMD factors Upf2 and Upf3 or Upf3X (also called Upf3a or Upf3b, respectively) during NMD (Kim et al., 2005; Lykke-Andersen et al., 2000). While both NMD and SMD involve the recruitment of Upf1 downstream of a termination codon, the recruitment of Upf1 in NMD is normally mediated by the exon junction complex (EJC) of proteins that includes Upf2 and Upf3 or Upf3X (Maquat, 2004; Tange et al., 2004) whereas the recruitment of Upf1 in SMD is directly via Stau1 and does not require an EJC (Kim et al., 2005).

It follows that mRNAs targeted for SMD are generally distinct from mRNAs targeted for NMD. NMD downregulates transcripts that terminate translation more than ~ 25 nucleotides upstream of an EJC, i.e., more than ~ 50 nucleotides upstream of a spliceable intron (Nagy and Maquat, 1998). In contrast, SMD appears to downregulate

transcripts that terminate translation more than ~ 25 nucleotides upstream of a Stau1 binding site (Kim et al., 2005). Therefore, as a rule, NMD targets will have undergone splicing, whereas SMD targets are not required to undergo splicing (although many do). NMD targets can harbor either a frameshift or a nonsense mutation. They also include naturally occurring transcripts with (i) one or more UGA selenocysteine codons, (ii) an upstream translational reading frame within the 5'UTR, (iii) an intron within the 3'UTR, or (iv) a nonsense codon with or without a shift in the translational reading frame as a consequence of alternative splicing (Hillman et al., 2004; Mendell et al., 2004). In contrast, SMD targets bind Stau1 within the 3'UTR, as exemplified by Arf1 mRNA. In theory, they would also include other naturally occurring or abnormal transcripts that terminate translation sufficiently upstream of a Stau1 binding site. Another difference between SMD and NMD targets is their associated proteins. While NMD degrades newly synthesized mRNA that is bound by the cap binding protein (CBP) heterodimer CBP80-CBP20 (Chiu et al., 2004; Hosoda et al., 2005; Ishigaki et al., 2001; Lejeune et al., 2002), which is also bound by EJC-associated Upf proteins, SMD degrades mRNA that is either newly synthesized and bound by CBP80-CBP20 or more mature and bound by eukaryotic translation initiation factor (eIF)4E (Hosoda et al., 2005). In fact, CBP80 promotes the interaction of EJC-associated Upf2 with Upf1 during NMD but has no effect on the interaction of Stau1 with Upf1 during SMD (Hosoda et al., 2005).

At the start of this work, microarray studies had demonstrated that at least 22 human transcripts, in addition to the one bone fide SMD target, bind Stau1 (Kim et al., 2005). In

reality, there may be many more efficiently degraded SMD targets than those detectable by Stau1 binding considering that efficient degradation may preclude detectable binding. Furthermore, Stau1 binding is relevant to SMD only if binding is downstream of a termination codon. For example, Stau1 binding to the 5' end of an mRNA harboring a translationally repressive structure enhances translation rather than triggers SMD (Dugre-Brisson et al., 2005). Therefore, rather than analyzing Stau1 binding, a more inclusive approach to identifying SMD targets would examine changes in cellular mRNA abundance after small interfering RNA (siRNA) was used to reduce cellular Stau1 abundance.

Here, we report the results of three independently performed microarray analyses that examined changes in the abundance of transcripts from 11,569 HeLa-cell genes upon Stau1 depletion. We find that 124 transcripts, or 1.1% of the HeLa-cell transcriptome that was analyzed, are upregulated at least 2-fold in all three transfections. Analyses of steady-state RNA using RT-PCR and primers that are specific for individual upregulated transcripts validated that depleting Stau1 increases mRNA abundance. As proof of principle, transcripts encoding (i) serine (or cysteine) proteinase inhibitor clade E (nexin plasminogen activator inhibitor type 1) member 1 (*Serpine1*), (ii) interleukin 7 receptor (*IL7R*), (iii) v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian) (*c-jun*) or (iv) growth associated protein (*GAP*)43 were examined in detail. A region from the 3'UTR of each transcript was found to bind Stau1. Additionally, each region was sufficient to direct an increase in the half-life of a heterologous mRNA upon Stau1 or Upf1 depletion. Mutational and computational analyses illustrate the importance of base-pairing to Stau1 binding.

From these and other results, we conclude that SMD is a posttranscriptional regulatory mechanism that influences a wide range of physiologic transcripts and metabolic pathways.

3.3.3 Results

3.3.3.1 Identification of HeLa-cell transcripts that are regulated upon Stau1 depletion

To identify physiologic SMD targets, HeLa cells were transiently transfected with either a nonspecific Control small interfering (si)RNA (Kim et al., 2005) or Stau1 siRNA (Kim et al., 2005). Stau1 siRNA reduced the level of cellular Stau1 to as little as 4% of normal, where normal is defined as the level in the presence of Control siRNA (data not shown). RNA from three independently performed transfections was separately hybridized to microarrays. We analyzed transcripts from 11,569 HeLa-cell genes, representing 37% of the array probe sets in all three hybridization experiments. Results indicated that 124 transcripts, which correspond to 1.1% of the HeLa-cell transcriptome that was analyzed, were upregulated at least 2-fold in all three transfections (Supplemental Table 1). Furthermore, 115 transcripts, which correspond to 1.0% of the HeLa-cell transcriptome that was analyzed, were downregulated at least 2-fold in all three transfections (Supplemental Table 2).

The validity of the microarray results was tested for 12 of the upregulated transcripts and 6 of the downregulated transcripts using RT-PCR and a primer pair that is specific for each transcript (Supplemental Table 3). Results demonstrated that, upon Stau1

depletion, 11 of the 12 were increased in abundance by 1.5-fold to 8.5-fold (Supplemental Figure 1) and 6 of the 6 were decreased in abundance by 2-fold to 10-fold (Supplemental Figure 2). Therefore, the microarray results can generally be viewed as a reliable assessment of changes in transcript abundance upon Stau1 depletion.

We focused on transcripts that were upregulated upon Stau1 depletion and, thus, could be SMD targets. Some of these transcripts produce proteins that are involved in signal transduction, cell proliferation or both (Supplemental Table 4). Other transcripts encode proteins that function in the immune response. Still others generate proteins that participate in cell adhesion, motility, the extracellular matrix, or other aspects of cell structure. A number encode factors that regulate transcription. Others produce proteins involved in RNA metabolism, including the TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein, which regulates the alternative splicing of pre-mRNA that encodes the human apoptotic factor Fas (Forch et al., 2002) and translationally silences mRNAs that encode inhibitors of apoptosis such as tumor necrosis factor α (Li et al., 2004; Piecyk et al., 2000). Another affected transcript that regulates RNA metabolism encodes Dcp2, which mediates transcript decapping (Wang et al., 2002).

3.3.3.2 Stau1 or Upf1 depletion increases the abundance of c-JUN, SERPINE1 and IL7R 3' mRNAs

Since Stau1 depletion could upregulate mRNA abundance by a mechanism that involves an alteration in mRNA half-life, as typifies SMD, or a mechanism that involves

the product of another mRNA that itself is directly regulated by Stau1, it was important to identify SMD targets. Four of the transcripts that were upregulated when Stau1 was depleted were also found in microarray analyses to be upregulated when Upf1 was depleted (Mendell et al., 2004; Supplemental Table 5). Interestingly, upregulation of three of these transcripts could not be explained by the EJC-dependent rule that applies to NMD. The three transcripts encode serine (or cysteine) proteinase inhibitor clade E (nexin plasminogen activator inhibitor type 1) member 1 (Serpine1), interleukin 7 receptor (IL7R), and v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian) (c-jun). To assess the possibility that each transcript is an SMD target, HeLa cells were transiently transfected with one of six siRNAs (Kim et al., 2005): Stau1 or Stau1(A) siRNA, each of which targets a different Stau1 mRNA sequence; Upf1 or Upf1(A) siRNA, each of which targets a different UPF1 mRNA sequence; Upf2 siRNA, which has no effect on SMD (Kim et al., 2005); or the nonspecific Control siRNA. Two days later, protein and RNA were isolated and analyzed using Western blotting and RT-PCR, respectively.

Western blotting revealed that Stau1 or Stau1(A) siRNA depleted the cellular level of Stau1 to 21% or 3% of normal, respectively, Upf1 or Upf1(A) siRNA depleted the cellular the level of Upf1 to 1% or 2% of normal, respectively, and Upf2 siRNA depleted the cellular level of Upf2 to 1% of normal (Figure 1A, where normal in each case is defined as the level in the presence of Control siRNA after normalization to the level of Vimentin). We found that c-JUN, SERPINE1 and IL7R transcripts were upregulated 2.1-fold to 9.4-fold when Stau1 or Upf1 was depleted but unaffected when Upf2 was depleted (Figure 1B,

where each transcript is normalized to the level of SMG7 mRNA). These results are consistent with the possibility that each transcript is targeted for SMD.

3.3.3.3 Stau1 binds the 3'UTR of c-JUN, SERPINE1 and IL7R mRNAs

To further investigate whether the three transcripts are SMD targets, 3'UTR sequences from each were inserted immediately downstream of the Firefly (F) Luciferase (Luc) translation termination codon within pcFLuc (Kim et al., 2005; see Experimental Procedures). These sequences consists of: (i) nucleotides 482-693 of the c-JUN 3'UTR, which contains the 151-nucleotide class III (i.e., non-AUUUA-containing) AU-rich element (ARE; Peng et al., 1996) plus 41 flanking nucleotides, (ii) nucleotides 1-1592 of the SERPINE1 3'UTR or (iii) nucleotides 1-340 of the IL7R 3'UTR. For each 3'UTR, nucleotide 1 is defined as the nucleotide immediately 3' to the normal termination codon. The encoded hybrid transcripts were tested for Stau1-HA₃ binding.

Cos cells were transfected with the four test plasmids: pcFLuc-c-JUN 3'UTR, pcFLuc-SERPINE1 3'UTR, pcFLuc-IL7R 3'UTR and pcFLuc-Arf1 SBS (Figure 2A), the latter of which serves as a positive control for Stau1-HA₃ binding since it contains the minimized Stau1 binding site (SBS) from the Arf1 3'UTR (Kim et al., 2005). Cells were simultaneously transfected with two additional plasmids: phStau1-HA₃, which produces Stau1-HA₃, and pmCMV-MUP, which serves as a negative control for Stau1-HA₃ binding. In cells producing Stau1-HA₃ (Figure 2B), anti-HA immunopurified FLuc-Arf1 SBS mRNA as well as FLuc-c-JUN 3'UTR, FLuc-SERPINE1 3'UTR and FLuc-IL7R 3'UTR

mRNAs but not MUP mRNA (Figure 2C). In contrast, rat (r) IgG, which controls for nonspecific immunopurification, failed to immunopurify any of the transcripts (Figure 2C). Furthermore, anti-HA failed to immunopurify FLuc mRNA that harbors the FLuc 3'UTR (data not shown). Therefore, the 3'UTRs of c-JUN, SERPINE1 and IL7R mRNAs bind Stau1-HA₃ as does the 3'UTR of the known physiologic target of SMD, Arf1 mRNA (Kim et al., 2005). Notably, a larger fraction of FLuc-Arf1 SBS mRNA was bound by Stau1-HA₃ relative to FLuc-c-JUN 3'UTR, FLuc-SERPINE1 3'UTR or FLuc-IL7R 3'UTR mRNA (Figure 2C), which is consistent with detection of Arf1 mRNA but not c-JUN, SERPINE1 or IL7R mRNA in our earlier microarray analyses of transcripts that bind Stau1-HA₃ (Kim et al., 2005).

3.3.3.4 c-JUN, SERPINE1 and IL7R 3'UTRs trigger SMD

To determine if each 3'UTR sequence is sufficient to elicit SMD, the effect of depleting Stau1 or Upf1 on the half-life of fos-FLuc-c-JUN 3'UTR, fos-FLuc-SERPINE1 3'UTR, or fos-FLuc-IL7R 3'UTR mRNA or, as a positive control, fos-FLuc-Arf1 SBS mRNA was tested. Production of each mRNA was driven by the fos promoter (Figure 3A). This promoter is transiently inducible upon the addition of serum to serum-deprived mouse L cells and therefore provides a way to analyze mRNA half-life (Kim et al., 2005; Lejeune et al., 2003). L cells were transfected with a mixture of two mouse (m)Stau1 siRNAs, mUpf1 siRNA or a nonspecific Control siRNA (Kim et al., 2005) and, two days later, with the four pfos-FLuc test plasmids and the pCMV-MUP reference plasmid. The reference plasmid produces MUP mRNA, which controls for variations in transfection efficiency and

RNA recovery. One day later, serum was added, and protein and RNA were purified from, respectively, cytoplasmic and nuclear fractions after 0, 30, 45 and 60 minutes. Under conditions where either mStau1 or mUpf1 was depleted (Figure 3B), the half-life of each fos-FLuc mRNA was increased in each of two or three independently performed experiments (Figure 3C). Therefore, Stau1 and Upf1 together with the 3'UTR of c-JUN, SERPINE1 or IL7R mRNA mediate mRNA decay, indicating that c-JUN, SERPINE1 and IL7R mRNAs are bone fide SMD targets. Notably, c-JUN mRNA derives from an intronless gene, consistent with SMD occurring independently of splicing (Kim et al., 2005).

3.3.3.5 GAP43 mRNA is an SMD target

Our finding that SMD is conferred by 192 nucleotides of the c-JUN 3'UTR, 151 nucleotides of which constitute the c-JUN class III ARE, together with microarray data indicating the class III ARE-containing mRNA for GAP43 is also upregulated when Stau1 is depleted (Supplemental Table 4; Supplemental Figure 1), led us to test if GAP43 mRNA is another SMD target.

Using RNA from samples analyzed in Figure 1, depleting Stau1 or Upf1 was found to increase the cellular abundance of GAP43 mRNA 7.4-fold to 4.1-fold whereas depleting Upf2 was of no appreciable consequence to GAP43 mRNA abundance (Figure 4A).

In cells producing Stau1-HA₃, anti-HA immunopurified FLuc-GAP43 3'UTR mRNA (Figure 4B, right), in which nucleotides 1-423 of the 3'UTR of GAP43 mRNA

were inserted immediately downstream of the FLuc translation termination codon within pcFLuc (Figure 4B, left). Anti-HA also immunopurified FLuc-Arf1 SBS mRNA (Figure 4B, left). In contrast, rIgG immunopurified neither mRNA. As a control for nonspecific immunopurification, anti-HA did not immunopurify MUP mRNA (Figure 4B, left). Finally, in experiments that utilized pfos-FLuc-GAP43 3'UTR (Figure 4C, upper left), depleting L cells of mStau1 or mUpf1 (Figure 4C, upper right) increased the half-life of fos-FLuc-GAP43 3'UTR mRNA (Figure 4C, lower left and right). We conclude that GAP43 mRNA is another SMD target.

Other human mRNAs that contain a class III ARE within their 3'UTRs encode β -adrenergic receptor, N-Myc and neurofibromin (Brennan and Steitz, 2001). Using mRNA-specific primers and RT-PCR, it was not possible to detect HeLa-cell mRNA for N-Myc, and neither β -adrenergic receptor nor neurofibromin mRNA appeared to be upregulated upon Stau1 depletion (Y.K. K. and L.E.M., unpub. data). Thus, there is no indication that SMD is generally directed by class III AREs, which have been defined simply as elements that signal mRNA decay via U-rich sequences rather than the AUUUA pentamer typical of class I and class II AREs (Brennan and Steitz, 2001).

3.3.3.6 Stau1 binds the stem of a stem-loop structure within the Arf1 SBS

To date, the best characterized Staufen binding site exists within *Drosophila bicoid* mRNA (Ferrandon et al., 1994). Linker scanning mutations that disrupt the interaction of Staufen with this mRNA mapped to three noncontiguous regions: 148 nucleotides of stem

III, 89 nucleotides of the distal region of stem IV, and 88 nucleotides of the distal region of stem V (Ferrandon et al., 1994). Given the structural complexity of this Staufen binding site(s), it may be difficult to identify human Stau1 binding sites exclusively from our existing mRNA immunopurification and half-life data. Additionally, while the double-stranded RNA binding domain 3 of *Drosophila* Staufen has been proposed to mediate direct binding of the protein to *bicoid* and *oskar* mRNAs (Micklem et al., 2000; Ramos et al., 2000), binding may be influenced by other proteins (Huynh et al., 2004). To complicate matters further, sequence disparities between *Drosophila* Staufen and human Stau1 likely confer differences in RNA binding specificity so that data pertaining to *Drosophila* Staufen may not be applicable to human Stau1. Therefore, we aimed to more thoroughly characterize some of the 3'UTR sequences that bind Stau1 (Figures 2 and 4) and target an mRNA for SMD (Figures 3 and 4) to better define RNA sequences that bind human Stau1.

Sets of deletions were generated within the SBS of a derivative of pSport-Arf1-SBS (Kim et al., 2005) that lacks SBS nucleotides 250-300 but encodes mRNA that binds Stau1 (see below). Initially, the set consisted of 50-bp deletions from the 3' end of the SBS (Figure 5A, left). Human 293 cells were transiently co-transfected with each pSport-Arf1-SBS deletion derivative and a Stau1-HA₃ expression vector. Cell extract was prepared two days later, and a fraction was immunopurified using anti-HA. Western blotting of immunopurified protein revealed uniform Stau1-HA₃ immunopurification efficiencies (Figure 4A, upper right). RT-PCR of immunopurified RNA demonstrated that sequences located between nucleotides 200 through 249 are needed for Stau1 binding because mRNA

lacking this region failed to immunopurify with anti-HA (Figure 5A, lower right, compare lanes 1 and 2). Consistent with this finding, all other deletion variants that lacked this region also failed to immunopurify with anti-HA (Figure 5A, lower right, compare lane 1 with lanes 3, 4 and 5).

To define the 5' limit of the sequence required for Stau1 binding, additional deletions were generated within pSport-Arf1-SBS so as to create pSport-Arf1-SBS Δ (30-79) and pSport-Arf1-SBS Δ (30-179) (Figure 5B, left). 293 cells were co-transfected with each new deletion derivative or pSport-Arf1-SBS Δ (250-300), as a positive control for Stau1 binding, and the Stau1-HA₃ expression vector. RNP was immunopurified using anti-HA. Western blotting of immunopurified protein revealed Stau1-HA₃ immunopurification efficiencies were comparable (Figure 5A, lower right), and RT-PCR of immunopurified RNA demonstrated that sequences spanning nucleotides 30 and 79 are required for Stau1 binding (Figure 5B, lower right, compare lanes 1, 3 and 4 with lane 2).

The finding that SBS nucleotides 30-79 and 200-249 are required for Stau1 binding strongly suggests that Stau1 associates with a folded secondary structure instead of a contiguous sequence. To assess this possibility, the lowest energy structure of the SBS was calculated using RNAfold (Hofacker et al., 1994; Figure 6A, left). Strikingly, a 19-bp stem was deduced that consists of nucleotides 75-93 and 194-212 (Figure 6A, right). This stem is included within the two SBS regions demonstrated by deletion mapping to be required for Stau1 binding (Figure 5). To assess the importance of the stem to Stau1 binding,

nucleotides 201-204, which consist of UUUC, were mutated to GAAG so as to destabilize the stem (Figure 6A, right, Single Strand; Figure 6B, left, Single Strand). Furthermore, nucleotides 83-86, which consist of GAAG, were mutated to CUUU so as to restore the stem but not to the normal sequence (Figure 6A, right, Double Strand; Figure 6B, left, Double Strand). Finally, nucleotides 94-193 were replaced with UCGA to test whether they are important for Stau1 binding (Figure 6B, left, $\Delta(\text{Loop})$). Results after immunopurification using anti-HA revealed that mRNA harboring the Single Strand mutations failed to bind Stau1-HA₃, whereas mRNA harboring the Double Strand mutations did bind Stau1-HA₃ (Figure 6B, right). Therefore, the integrity but not the sequence of these four base pairs of the stem is important for Stau1 binding. Additionally, the substitution that characterizes $\Delta(\text{Loop})$ mRNA did not preclude Stau1 binding (Figure 6B, right). We conclude that some or all the 19-bp stem is sufficient for Stau1 binding. Moreover, neither the 8 nor the 7 base pairs that remain to either side of the mutated nucleotides in Single Strand is adequate for Stau1 binding.

3.3.3.7 Deletion and computational analysis of the SERPINE1 SBS

To define an additional Stau1 binding site, deletions were generated within pcFLuc-SERPINE1 3'UTR (1-1592) to construct derivatives that consist of SERPINE1 3'UTR nucleotides 1-597, 595-1041, 1042-1296 or 1297-1592 (Figure 7A). In cells producing Stau1-HA₃ and the resulting FLuc-SERPINE1 3'UTR-deleted mRNAs, anti-HA immunopurified Stau1-HA₃ with comparable efficiencies (Figure 7B). Furthermore, anti-HA immunopurified FLuc-SERPINE1 3'UTR (1297-1592) mRNA as efficiently as FLuc-

SERPINE1 3'UTR (1-1592) mRNA but failed to immunopurify FLuc-SERPINE1 3'UTR (1-597) mRNA, FLuc-SERPINE1 3'UTR (595-1042) mRNA or FLuc-SERPINE1 3'UTR (1042-1296) mRNA (Figure 7C, where the immunopurification efficiency of each SERPINE1 3'UTR transcript was assessed relative to the level of immunopurified fos-FLuc-Arf1 SBS mRNA). In contrast to anti-HA, rIgG immunopurified none of the FLuc-SERPINE1 3'UTR transcripts (Figure 7C).

The lowest energy structure of SERPINE1 3'UTR nucleotides 1299-1575 was calculated using RNAfold (Hofacker et al., 1994; Supplemental Figure 3). While a 24-bp structure was identified, it is interrupted by two single-nucleotide bulges so that the largest continuous stem consists of 10 base pairs. In contrast to the 19-bp stem within the ARF1 SBS, which is rich in G-C pairs (10 G-C, 7 A-U and 2 G-U pairs), the SERPINE1 stem is rich in A-U pairs (23 A-U pairs, one G-C pair and no G-U pair). However, a long stem that is rich in G-C base pairs (15 G-C, 5 A-U and one G-U) and interrupted by three short interior loops is predicted (Supplemental Figure 3). By using statistical sampling of sub-optimal secondary structures (Ding et al., 2004), there are no detectable structures that compete with the long stems.

3.3.4 Discussion

Here, we report that 1.1% of HeLa-cell transcripts that were analyzed were upregulated in three independently performed experiments when the cellular abundance of Stau1 was depleted (Supplemental Table 1). We also demonstrate that human c-JUN,

SERPINE1, IL7R and GAP43 mRNAs, in addition to Arf1 mRNA (Kim et al., 2005), are targeted for SMD by a mechanism that depends on Stau1 binding to 3'UTR sequences (Figures 1-4). dsRNA binding proteins have been reported to interact with a stem as small as 11 base pairs independently of nucleotide composition (Saunders and Barber, 2003). We show that all or part of a 19-bp stem within the 3'UTR of human Arf1 mRNA is sufficient to bind human Stau1 (Figures 5-6). In support of its importance to Stau1 binding, this stem is conserved within the 3'UTR of rat and mouse Arf1 mRNAs: the one nucleotide difference that typifies rat and mouse sequences as compared to the human sequence still allows for base pairing (Figure 6). Furthermore, of those stem nucleotides that were tested, their ability to base pair rather than their precise identity dictates Stau1 binding (Figure 6). Additionally, the loop that normally allows stem formation can be substituted without consequence to Stau1 binding (Figure 6).

Nevertheless, the fully functional structure that binds Stau1 may be much more complex than a single long stem. Indeed, the 14-bp stem that remains in Arf1 SBS $\Delta(30-79)$ mRNA does not support Stau1 binding. This result suggests that other features in addition to the stem may be required for binding efficacy. In support of this suggestion, computational modeling indicates that there is no stem that is at least 14 base pairs within the four other tested 3'UTRs that bind Stau1. If parallels can be drawn using another member of the family of dsRNA-binding proteins, ADAR1, Stau1-specific binding may depend on the positions and lengths of bulges and interior loops relative to a stem structure (Lehmann and Bass, 1999). Irregularities in RNA helices due to bulged nucleotides or

distortions of grooves are generally required to provide specific determinants for protein binding (Draper, 1999). Thus, there are undoubtedly other features of RNA beside the stem that are recognized by Stau1 and, possibly, one or more other proteins that comprise the Stau1 binding complex (Saunders and Barber, 2003). Consistent with this conclusion, the longest stem within the 296-nucleotide sequence of the SERPINE1 3'UTR that binds Stau1 consists of 10 base pairs (Figure 7; see below).

The best characterized binding site for *Drosophila* Staufen resides within the 3'UTR of *bicoid* mRNA. Deletion and linker scanning analyses suggest that binding requires three noncontiguous regions of *bicoid* mRNA that correspond to stem III and distal portions of stems IV and V (Ferrandon et al., 1994). These regions were identified using assays in which *in vitro*-transcribed RNAs were injected into the cytoplasm of embryos and assayed for the ability to recruit Staufen (and other proteins) and properly localize. Each *bicoid* mRNA region forms stems that are interrupted by bulges and interior loops of different sizes (Ferrandon et al., 1994). Therefore, it is likely that an RNA stem is insufficient to bind not only human Stau1 but also *Drosophila* Staufen. To complicate matters in the case of *Drosophila*, recent data suggest that the importance of each stem varies according to the stage of development, the function to be fulfilled, or both. For example, whereas the three stems are necessary for apical localization of *bicoid* mRNA within embryos, stem-loop III is dispensable for *bicoid* mRNA localization within oocytes (Snee et al., 2005). As another example, stem III promotes the intermolecular dimerization of *bicoid* mRNA, and mutations that prevent dimerization also eliminate *bicoid* mRNA

transport along astral microtubules (Ferrandon et al., 1994) and apical localization (Snee et al., 2005) but do not affect formation of Staufen-containing particles (Ferrandon et al., 1997). While dimerization per se promotes astral transport, the integrity of stem-loop III rather than dimerization is necessary for apical localization. Recent probing of the full-length *bicoid* 3'UTR with a variety of chemicals and enzymes has provided new insights into its higher-order structure (Brunel and Ehresmann, 2004). However, biochemical confirmation of the nucleotides and structures involved in *Drosophila* Staufen binding and *bicoid* mRNA transport are still lacking.

Secondary structure predictions of c-JUN, IL7R and GAP43 3'UTRs using statistical sampling (Ding et al., 2004) reveal the presence of putative stems in each sequence (not shown). The c-JUN 3'UTR is predicted to harbor a stem of 12 base pairs that contains mostly A-U pairs. In contrast, the IL7R 3'UTR contains a 13-bp stem that is interrupted by a 7-nucleotide bulge so that the longest stem is 9 base pairs. The GAP43 3'UTR appears to contain a 15-bp stem that is interrupted by a short interior loop and a single bulge. As a result, the longest stem is 8 base pairs. Our finding that SBSs consist of structural elements that break long stems is consistent with the view that more than a single long stem is required for Stau1 binding. It is also worth noting that the possibility of protein-induced stem formation cannot be excluded considering that RNA binding proteins are known to induce higher-order RNA structures (Wozniak et al., 2005). Future work that aims to define the exact SBS nucleotides required for Stau1 binding will be quite challenging.

It is very likely that Arf1, c-JUN, SERPINE1, IL7R and GAP43 mRNAs are not the only transcripts among those that are upregulated upon Stau1 depletion and targeted for SMD. For example, CYR61 mRNA, which encodes the cysteine-rich angiogenic inducer 61, was upregulated upon Stau1 depletion in only two of our three microarray analyses and, thus, fell below our stringent criteria as a candidate target for SMD. However, this mRNA may very well be targeted for SMD since it was also among the transcripts upregulated upon Upf1 depletion (Mendell et al., 2004). Furthermore, of 21 transcripts that were upregulated upon Stau1 depletion in all three of our microarray analyses but not studied further, 10 are present in two and 11 are present in all three new microarray analyses that assayed for Stau1-HA₃ binding (Supplemental Table 6). Nevertheless, until an mRNA is shown to (i) bind Stau1 downstream of the termination codon, (ii) manifest a longer half-life upon depletion of Stau1 and (iii) manifest a longer half-life upon depletion of Upf1, it cannot be considered to be a bone fide SMD target.

In summary, our results suggest that SMD is a posttranscriptional regulatory pathway that influences the expression of a wide range of physiologic transcripts. While an understanding of the extent of its influence will require further studies, SMD can be added to the growing list of homeostatic gene control mechanisms.

3.3.5 Experimental Procedures

3.3.5.1 Plasmid constructions

All pcFLuc derivatives harbor 54-nucleotides of FLuc cDNA that begin with the translation initiation codon. These nucleotides were followed by the FLuc translation termination codon. To construct pcFLuc harboring different 3'UTRs, pcFLuc-8bs (Kim et al., 2005) was digested with XbaI and ligated to one of four PCR-amplified fragments that contained the (i) c-JUN ARE III plus 41 nucleotides and had been digested with XbaI, (ii) SERPINE1 3'UTR (without the normal termination codon) that had been digested with XbaI, (iii) IL7R (without the normal termination codon) that had been digested with NheI or (iv) GAP43 3'UTR (without the normal termination codon) that had been digested with XbaI. The c-JUN ARE fragment was amplified using the Human HeLa BD™ Marathon-Ready cDNA (BD Biosciences) and two primers: 5'-CGCTCTAGAGTGAGAACTCTTTCTGGCCTGCCTTCGTAAAC-3' (sense) and 5'-CGCTCTAGATTACAAATGGTAAACTCAGAGTGCTCC-3' (antisense), where underlined nucleotides specify the XbaI site. The SERPINE1 3'UTR fragment was amplified using pCMV6-XL5-SERPINE1 (Origene Technologies) and two primers: 5'-CGCTCTAGAGTGACCCTGGGGAAAGACGCCTTCATCTG-3' (sense) and 5'-CGCTCTAGAGCTTCTATTAGATTACATTCATTTAC-3' (antisense), where underlined nucleotides specify the XbaI site. The IL7R 3'UTR fragment was amplified using Human HeLa BD™ Marathon-Ready cDNA and two primers: 5'-

CGCGCTAGCGTGAAGTGTAAGAAACCCAGACTGAAC-3' (sense) and 5'-CGCGCTAGCTTTTTTTCCTCTCATGCTCTCTTCCTGC-3' (antisense), where underlined nucleotides specify the NheI site. The GAP43 3'UTR fragment was amplified using HeLa-cell total cDNA prepared from Stau1 siRNA-treated cells and two primers: 5'-CGCTCTAGAGTGAAGTCTAAGAAATGGCTTTCACATC-3' (sense) and 5'-CGCTCTAGAGTGAGAATTCAGTATTTTGGACTCCTCAG-3' (antisense), where underlined nucleotides specify the XbaI site.

To construct pfos-FLuc harboring different 3'UTRs, pfos-GI (Kim et al., 2005) was digested with EcoRI and NcoI and ligated to one of four PCR-amplified fragments that had been digested with EcoRI and NcoI. Each PCR fragment was amplified using the pcFLuc-c-JUN 3'UTR, pcFLuc-SERPINE1 3'UTR, pcFLuc-IL7R 3'UTR or pcFLuc-GAP43 3'UTR and two primers: 5'-CATGCCATGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGC-3' (sense) and 5'-CGGAATTCAGGCTGATCAGCGAGCTCTAGCATTAGG-3' (antisense), where underlined nucleotides specify the NcoI and EcoRI site, respectively. To construct pSport-Arf1-SBS derivatives harboring $\Delta(250-300)$, $\Delta(200-300)$, $\Delta(150-300)$, $\Delta(100-300)$ or $\Delta(50-300)$, pSport was digested with XbaI and HpaI and ligated to one of five PCR-amplified fragments that had been digested with XbaI. Each PCR fragment was amplified using pSport-Arf1-SBS, the common sense primer 5'-GCTATTTAGGTGACACTATAGAAGGTAC-3' and the specific antisense primer: 5'-CTTTTACAATAAAAAAAGCTGAGTAATAT-3', 5'-

TGCCTCATTGGAAACAAAACTATTTACAT-3', 5'-
 AGGCTGCGTCTGCCACATTTAC-3', 5'-ACCACGGAGGCAGCTTCTGG-3', or 5'-
 ATGAGAGTAAAGCAGAGGGCAAG-3'. pSport-Arf1-SBS derivatives harboring $\Delta(3-300)$, $\Delta(30-79)$, and $\Delta(30-179)$, were generated with the following primer pairs, respectively: 5'- CATTTCGACAAACAAGCACTGTAATTATAGCTATTAG-3' (sense) and 5'- GTTCACTTCTGGTTCCGGAGCTG-3' (antisense), 5'- CCAGAAGCTGCCTCCGTGG- 3' (sense) and 5'-AAGAGGAGTGAGAGGGAGGG-3' (antisense), 5'- TTTTGTTCCTCAATGAGGCAGTTTCTGGTA-3' (sense) and 5'- AAGAGGAGTGAGAGGGAGGG-3' (antisense). PCR amplifications were carried out using Pfu Ultra (Stratagene). PCR products were incubated with DpnI to digest the methylated template DNA, phosphorylated at the 5' ends using T4 polynucleotide kinase (Fermentas), and circularized by ligation.

To construct Single Strand and Double Strand, overlap-extension PCR was used. A 5' fragment was amplified using the common sense primer 5'- GCTATTTAGGTGACACTATAGAAGGTAC-3' and 5'- CATAGGAGTACCACTTCCTGCCTCATTGG-3' (antisense, Single Strand and Double Strand, where underlined nucleotides specify mutated nucleotides) or 5'- CCACGGAGGCAGAAAGTGGCACTCACACC-3' (antisense, Double Strand), and a 3' fragment was amplified using 5'-CCAATGAGGCAGGAAGTGGTACTCCTATG-3' (sense, Single Strand and Double Strand, where underlined nucleotides specify mutated nucleotides) or 5'-GGTGTGAGTGCCACTTTCTGCCTCCGTGG-3' (sense, Double

Strand) and the common antisense primer 5'-GTGCCCATGGGCCTACATCC-3'. The resulting fragments were mixed with the same sense and antisense primers that amplified, respectively, the 5' and 3' fragments to generate a joined product. PCR products were digested with XbaI, and inserted into the XbaI and HpaI sites of pSport. To construct Δ (Loop), a 5' fragment was amplified using the primer pair 5'-GCTATTTAGGTGACACTATAGAAGGTAC-3' (sense) and 5'-AATTCTCGAGAGGCAGCTTCTGGCACTC-3' (antisense, where underlined nucleotides specify the XhoI site) and inserted into the XbaI and XhoI sites of pSport. The 3' fragment was amplified using the primer pair 5'-AATTCTCGAGAGGCAGTTTCTGGTACTCCTATG-3' (sense, where underlined nucleotides specify the XhoI site) and 5'-GTGCCCATGGGCCTACATCC-3' (antisense), and inserted into the XhoI and HpaI sites of the 5' fragment-containing construct.

To construct deletion derivatives of pcFLuc-SERPINE1 3'UTR, pcFLuc-8bs was digested with XbaI and ligated to one of four XbaI-digested PCR-amplified fragments that had been generated using pcFLuc-SERPINE1 3'UTR and two primers: 5'-CGCTCTAGAGTGACCCTGGGGAAAGACGCC-3' (sense) and 5'-CGCTCTAGAGTTGGGCCACATGATGGGGG-3' (antisense) for pcFLuc-SERPINE1 3'UTR (1-597), 5'-CGCTCTAGAGTGATCTCCTGGCCTGGCCATCTC-3' (sense) and 5'-CGCTCTAGAGGTCAATTTCCATCAAGGGG-3' (antisense) for pcFLuc-SERPINE1 3'UTR (595-1041), 5'-CGCTCTAGAGTGAATACAATTTTCATCCTCCTTC-3' (sense) and 5'-CGCTCTAGATGTCTCTCTCACCCACCCCC-3' (antisense) for pcFLuc-

SERPINE1 3'UTR (1042-1296), or 5'-CGCTCTAGAGCTTCTATTAGATTACATTCATTTTCAC-3' (sense) and 5'-CGCTCTAGAGTGAGGCAGCTCCGGATTCAACTACCTTAG-3' (antisense) for pcFLuc-SERPINE1 3'UTR (1297-1592), where underlined nucleotides specify the XbaI site.

3.3.5.2 Cell culture and transfections, and protein and RNA purification

Human HeLa or 293 cells were propagated in DMEM medium (GIBCO-BRL) containing 10% fetal bovine serum (GIBCO-BRL) in 60-mm dishes and, where specified, 2×10^6 were transiently transfected with plasmid DNA, *in vitro*-synthesized siRNA, or both as described (Kim et al., 2005). Monkey Cos cells, which were used in experiments involving immunopurification, were treated similarly, as were mouse L cells, which effectively support fos promoter induction upon the addition of serum to serum-deprived cells. Human and mouse siRNAs, the serum-induced transcription of fos-FLuc gene expression, and the isolation of total-cell or nuclear protein and RNA have been reported previously (Kim et al., 2005).

3.3.5.3 Western blotting and RT-PCR

Blotting (Kim et al., 2005) and the RT-PCR of SMG7 and MUP mRNAs were as described previously (Chiu et al., 2004; Lejeune et al., 2003). FLuc-c-JUN 3'UTR, FLuc-SERPINE1 3'UTR, FLuc-IL7R 3'UTR, FLuc-GAP43 3'UTR or FLuc-Arf1 SBS mRNA was amplified using 5'-AATACGACTCACTATAGGGA-3' (sense, which annealed to the T7 promoter that resides downstream of the CMV promoter) and, respectively, 5'-

AGGCAGGCCAGAAAGAGTTC-3' (antisense), 5'- TGAAGGCGTCTTTCCCCAGG-3' (antisense), 5'-TCAGTCTGGGTTTCTTACAC-3' (antisense), 5'-TGGAAAGCCATTTCTTAGAG-3' or 5'- GCCTGGCCGCAGGCTGCGTC-3' (antisense).

fos-FLuc-c-JUN 3'UTR, fos-FLuc-SERPINE1 3'UTR, fos-FLuc-IL7R 3'UTR, fos-FLuc-GAP43 3'UTR or fos-FLuc-Arfl SBS mRNA that derived from pfos-FLuc constructs was amplified using the common sense primer 5'-AGACTGAGCCGATCCCGCGC-3' and the corresponding antisense primer described above.

Primer pairs for the 21 transcripts in addition to c-JUN, SERPINE1, IL7R and GAP43 mRNAs that were amplified to test the validity of microarray results are provided (Supplemental Table 3).

3.3.5.4 Microarray analyses

HeLa-cell RNA was purified using TriZol reagent (Invitrogen) and deemed to be intact using an RNA 6000 Nano LabChip (Agilent) together with a Bioanalyser 2100 and Biosizing software (Agilent). Biotin-labeled cRNAs were generated and hybridized to U133 Plus 2.0 Array human gene chips (comprising 52,245 probe sets that correspond to 29,555 unique genes). Hybridized chips were scanned using an Affymetrix GeneChip 3000 Scanner. Results were recorded using the GeneChip Operating Software (GCOS) platform, which includes the GeneChip Scanner 3000 high-resolution scanning patch that enables

feature extraction (Affymetrix). Notably, the Affymetrix Gene Expression Assay identifies changes that are greater than 2-fold with 98% accuracy (Wodicka et al., 1997). Arrays were undertaken using three independently generated RNA samples. Transcripts that showed at least a 2-fold increase in abundance with a p value of less than 0.05 in each of the three analyses were scored as potential SMD targets.

3.3.5.5 Bioinformatics prediction of RNA secondary structures

The optimal secondary structure predictions were obtained by using the RNAfold computer program (Hofacker et al., 1994) of the Vienna RNA package (Hofacker, 2003). Statistical samples of optimal and sub-optimal secondary structures were evaluated using the Sfold algorithm (Ding et al., 2004).

3.3.6 Acknowledgements

We thank the Genome Quebec Innovation Centre, in particular André Ponton, for microarray screening and analysis, Maquat lab members Liz Wolcott and Alma Muharemagic for technical assistance, Juan Ortín for anti-human Stau1, and Tom Gelehrter and Ann-Bin Shyu for helpful conversations. This work was supported by National Institutes of Health grant DK33938/GM074593 to L.E.M. and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to L.D.G. L.F. was supported by scholarships from Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) and NSERC. FM is a Canadian Institutes of Health Research Investigator.

3.3.7 References

- Brennan, C. M., and Steitz, J. A. (2001). HuR and mRNA stability. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 266-277.
- Brunel, C., and Ehresmann, C. (2004). Secondary structure of the 3'UTR of bicoid mRNA. *Biochimie* 86, 91-104.
- Chiu, S. Y., Lejeune, F., Ranganathan, A. C., and Maquat, L. E. (2004). The pioneer translation initiation complex is functionally distinct from but structurally overlaps with the steady-state translation initiation complex. *Genes Dev.* 18, 745-754.
- Ding, Y., Chan, C. Y., and Lawrence, C. E. (2004). Sfold web server for statistical folding and rational design of nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 32, W135-141.
- Draper, D. E. (1999). Themes in RNA-protein recognition. *J. Mol. Biol.* 293, 255-270.
- Dugre-Brisson, S., Elvira, G., Boulay, K., Chatel-Chaix, L., Mouland, A. J., and DesGroseillers, L. (2005). Interaction of Stauf1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res.* 33, 4797-4812.
- Ferrandon, D., Elphick, L., Nusslein-Volhard, C., and St Johnston, D. (1994). Stauf1 protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* 79, 1221-1232.

- Ferrandon, D., Koch, I., Westhof, E., and Nusslein-Volhard, C. (1997). RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3'UTR-STAUFIN ribonucleoprotein particles. *EMBO J.* 16, 1751-1758.
- Forch, P., Puig, O., Martinez, C., Seraphin, B., and Valcarcel, J. (2002). The splicing regulator TIA-1 interacts with U1-C to promote U1 snRNP recruitment to 5' splice sites. *EMBO J.* 21, 6882-6892.
- Hillman, R. T., Green, R. E., and Brenner, S. E. (2004). An unappreciated role for RNA surveillance. *Genome Biol.* 5, R8.
- Hofacker, I. L. (2003). Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Res.* 31, 3429-3431.
- Hofacker, I. L., Fontana, W., Stadler, P. F., Bonhoeffer, S., Tacker, M., and Schuster, P. (1994). Fast Folding and Comparison of RNA Secondary Structures. *Monatshefte f. Chemie.* 125, 167-188.
- Hosoda, N., Kim, Y. K., Lejeune, F., and Maquat, L. E. (2005). CBP80 promotes interaction of Upf1 with Upf2 during nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 893-901.
- Huynh, J. R., Munro, T. P., Smith-Litiere, K., Lepesant, J. A., and St Johnston, D. (2004). The *Drosophila* hnRNPA.B homolog, Hrp48, is specifically required for a distinct step in *osk* mRNA localization. *Dev. Cell* 6, 625-635.

- Ishigaki, Y., Li, X., Serin, G., and Maquat, L. E. (2001). Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell* 106, 607-617.
- Kim, Y. K., Furic, L., Desgroseillers, L., and Maquat, L. E. (2005). Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* 120, 195-208.
- Lehmann, K. A., and Bass, B. L. (1999). The importance of internal loops within RNA substrates of ADAR1. *J. Mol. Biol.* 291, 1-13.
- Lejeune, F., Ishigaki, Y., Li, X., and Maquat, L. E. (2002). The exon junction complex is detected on CBP80-bound but not eIF4E-bound mRNA in mammalian cells: dynamics of mRNP remodeling. *EMBO J.* 21, 3536-3545.
- Lejeune, F., Li, X., and Maquat, L. E. (2003). Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities. *Mol. Cell* 12, 675-687.
- Li, W., Simarro, M., Kedersha, N., and Anderson, P. (2004). FAST is a survival protein that senses mitochondrial stress and modulates TIA-1-regulated changes in protein expression. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10718-10732.
- Lykke-Andersen, J., Shu, M. D., and Steitz, J. A. (2000). Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon. *Cell* 103, 1121-1131.

- Maquat, L. E. (2004). Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 89-99.
- Matzura, O., and Wennborg, A. (1996). RNAdraw: an integrated program for RNA secondary structure calculation and analysis under 32-bit Microsoft Windows. *Comput. Appl. Biosci.* 12, 247-249.
- Mendell, J. T., Sharifi, N. A., Meyers, J. L., Martinez-Murillo, F., and Dietz, H. C. (2004). Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. *Nat. Genet.* 36, 1073-1078.
- Micklem, D. R., Adams, J., Grunert, S., and St Johnston, D. (2000). Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. *EMBO J.* 19, 1366-1377.
- Nagy, E., and Maquat, L. E. (1998). A rule for termination-codon position within introncontaining genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem. Sci.* 23, 198-199.
- Peng, S. S., Chen, C. Y., and Shyu, A. B. (1996). Functional characterization of a non-AUUUA AU-rich element from the c-jun proto-oncogene mRNA: evidence for a novel class of AU-rich elements. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1490-1499.
- Piecyk, M., Wax, S., Beck, A. R., Kedersha, N., Gupta, M., Maritim, B., Chen, S., Gueydan, C., Krusys, V., Streuli, M., and Anderson, P. (2000). TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF-alpha. *EMBO J.* 19, 4154-4163.

- Ramos, A., Grunert, S., Adams, J., Micklem, D. R., Proctor, M. R., Freund, S., Bycroft, M., St Johnston, D., and Varani, G. (2000). RNA recognition by a Staufen doublestranded RNA-binding domain. *EMBO J.* 19, 997-1009.
- Saunders, L. R., and Barber, G. N. (2003). The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions. *FASEB J.* 17, 961-983.
- Snee, M. J., Arn, E. A., Bullock, S. L., and Macdonald, P. M. (2005). Recognition of the *bcd* mRNA localization signal in *Drosophila* embryos and ovaries. *Mol. Cell. Biol.* 25, 1501-1510.
- Tange, T. O., Nott, A., and Moore, M. J. (2004). The ever-increasing complexities of the exon junction complex. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 279-284.
- Wang, Z., Jiao, X., Carr-Schmid, A., and Kiledjian, M. (2002). The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 12663-12668.
- Wodicka, L., Dong, H., Mittmann, M., Ho, M. H., and Lockhart, D. J. (1997). Genomewide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Biotechnol.* 15, 1359-1367.
- Wozniak, A. K., Nottrott, S., Kuhn-Holsken, E., Schroder, G. F., Grubmuller, H., Luhrmann, R., Seidel, C. A., and Oesterhelt, F. (2005). Detecting protein-induced folding of the U4 snRNA kink-turn by single-molecule multiparameter FRET measurements. *RNA* 11, 1545-1554.

3.3.8 Figure Legends

Figure 1. c-JUN, SERPINE1 and IL7R mRNAs are increased in abundance in human cells depleted of either Stau1 or Upf1 but not Upf2. HeLa cells were transiently transfected with Stau1, Stau1(A), Upf1, Upf1(A) or Upf2 siRNA or, to control for nonspecific depletion, Control siRNA. Three days later, protein and RNA were purified. (A) Western blot analysis using anti(α) of total-cell protein, where the level of Vimentin serves to control for variations in protein loading. The normal level of Stau1, Upf1 or Upf2 is defined as the level in the presence of Control siRNA after normalization to the level of Vimentin. (B) RT-PCR analysis of the level of endogenous c-JUN mRNA (upper), SERPINE1 mRNA or IL7R mRNA (lower), each of which is normalized to the level of endogenous SMG7 mRNA. The normalized level of each mRNA in the presence of Control siRNA is defined as 1. RT-PCR results are representative of three independently performed experiments that did not differ by the amount specified.

Figure 2. Stau1 binds within the 3'UTR of c-JUN, SERPINE1 and IL7R mRNAs. Cos cells were transiently transfected with three plasmids: (i) pcFLuc-c-JUN 3'UTR, pcFLuc-SERPINE1 3'UTR and pcFLuc-IL7R 3'UTR test plasmids; (ii) the Stau1-HA₃ expression vector; (iii) the pcFLuc-Arf1 SBS test plasmid that serves as a positive control for Stau1-HA₃ binding; and (iv) phCMV-MUP, which encodes MUP mRNA that serves as a negative control for Stau1-HA₃ binding. Two days later, cells were lysed, and a fraction of each lysate was immunopurified using anti-HA or, as a control for nonspecific

immunopurification (IP), rat (r)IgG. (A) Schematic representations of the pcFLuc-Arf1 SBS, pcFLuc-c-JUN 3'UTR, pcFLuc-SERPINE1 3'UTR and pcFLuc-IL7R 3'UTR test plasmids. (B) Western blot analysis anti(α)-HA or anti-Calnexin demonstrates that Stau1-HA₃ but, as expected, not Calnexin was immunopurified. (C) RT-PCR analysis demonstrates that c-JUN, SERPINE1 and IL7R 3'UTRs, like Arf1 SBS, bind Stau1-HA₃, whereas MUP mRNA does not. Results are representative of three independently performed experiments.

Figure 3. Depleting cells of Stau1 or Upf1 increases the half-life of FLuc mRNA when the 3'UTR consists of c-JUN, SERPINE1 or IL7R 3'UTR sequences that bind Stau1. L cells were transfected with mouse (m)Stau1, mUpf1 or Control siRNA. Two days later, cells were re-transfected with the pfos-FLuc-Arf1 SBS, pfos-FLuc-c-JUN 3'UTR, pfos-FLuc-SERPINE1 3'UTR and pfos-FLuc-IL7R 3'UTR test plasmids and the pHCMVMUP reference plasmid in the absence of serum. Serum was added to 15% after an additional 24 hours. Protein was immediately purified from the cytoplasmic fraction (at 0 minutes) for Western blot analysis. RNA was purified from the nuclear fraction for RTPCR analysis at the specified times. (A) Schematic representations of each test plasmid. (B) Western blotting of mStau1 or mUpf1, where the level of m β -Actin serves to control for variations in protein loading. mStau1 was depleted to 35% of its normal level, and mUpf1 was depleted to 30% of its normal level. (C) RT-PCR analysis of the SMD candidate mRNAs. For each time point, the level of each mRNA transcribed from the fos promoter is normalized to the level of MUP mRNA. Normalized levels are calculated as a percentage

of the normalized level of each mRNA transcribed at 30 minutes in the presence of each siRNA, which is defined as 100 (left). These levels are plotted as a function of time after serum addition (right). Error bars specify the extent of variation among two or three independently performed experiments.

Figure 4. GAP43 mRNA is an SMD target. (A) RT-PCR demonstrating that depleting cells of Stau1 or Upf1 increases the cellular abundance of GAP43 mRNA. RNA derived from samples used in Figure 1. (B) IP showing that Stau1 binds to the 3'UTR of GAP43 mRNA and, as a positive control, the Arf1 SBS. Cos cells were transfected with four plasmids: (i) pcFLuc-GAP43 3'UTR (left), (ii) the Stau1-HA₃ expression vector; (iii) pcFLuc-Arf1 SBS (left), and (iv) phCMV-MUP and analyzed as described in the legend to Figure 2 except that FLuc- GAP43 3'UTR and FLuc-Arf1 SBS mRNAs were analyzed instead of the other FLuc mRNA derivatives. (C) Western blot (upper right) and RT-PCR analyses (lower left) demonstrate that depleting cells of Stau1 or Upf1 increases the half-life of FLuc mRNA when the 3'UTR consists of GAP43 3'UTR sequences that bind Stau1. L cells were transfected with mStau1, mUpf1 or Control siRNA. Two days later, cells were retransfected with the pfos-FLuc-GAP43 3'UTR test plasmid and the phCMV-MUP reference plasmid in the absence of serum. Subsequent treatment and analyses were as described in the legend to Figure 3 except that FLuc-GAP43 3'UTR mRNA was analyzed instead of the other FLuc mRNA derivatives. Results are representative of two independently performed experiments.

Figure 5. Deletions within the Arf1 SBS indicate that a central core region is required for Stau1 binding. (A) (Left) Schematic representations of the various 3'-end deleted mRNAs that derive from pSport-Arf1-SBS derivatives. Numbering is relative to the first nucleotide following the termination codon, which is defined as 1. Plus (+) and minus (-) signs at the left of each representation indicate the ability or failure to bind Stau1, respectively. (Right) Human 293 cells were transfected with a derivative of the pSport-Arf1-SBS test plasmid and the Stau1-HA₃ expression. After immunopurification (IP) using anti-HA, protein was analyzed using Western blotting and anti-HA (upper), and RNA was analyzed using RT-PCR and ethidium bromide staining (lower). (B) (Left) as in (A, Left) except for pSport-Arf1-SBS derivatives. (Right) as in (A, Right). Results are representative of two independently performed experiments.

Figure 6. Stau1 interacts with a predicted 19-bp stem within the Arf1 SBS. (A) Model for the secondary structure of the Arf1 SBS showing nucleotides 50 through 300. A larger view of the 19-bp stem is shown in the inset to the right. The plot was generated using RNAdraw v1.1 software (Matzura and Wennborg, 1996). (B) (Left) Schematic representations of the various mRNAs that are synthesized from pSport-Arf1-SBS derivatives. Asterisks denote the 4-nucleotide mutations that individually disrupt the 19-nt stem and together restore this stem. Single Strand mRNA harbors UUUC→GAAG mutations at nucleotides 201-204, Double Strand mRNA harbors Single Strand together with GAAG→CUUU mutations at nucleotides 83-86, and Δ(Loop) mRNA contains a replacement of nucleotides 94 through 193 that normally constitute a loop with a 4-

nucleotide loop (see (A), right for details). Results are representative of two independently performed experiments (right). (C) The predicted 19-bp stem within the human Arf1 SBS is conserved in rat and mouse Arf1 mRNAs. Nucleotides that are not conserved with respect to the human sequence are underlined.

Figure 7. Stau1 binds to a 296-nucleotide region of the SERPINE1 3'UTR. Cos cells were transiently transfected with three plasmids: the specified derivatives of pFLuc-SERPINE1 3'UTR, (ii) the Stau1-HA₃ expression vector, and (iii) pfos-FLuc- Arf1 SBS as a positive control for Stau1-HA₃ binding. Immunopurifications (IPs) and analyses were performed as described in the legend to Figure 2. (A) Schematic representations of derivatives of the pcFLuc-SERPINE1 3'UTR test plasmid, where nucleotide 1 is defined as the nucleotide immediately downstream of the normal termination codon within SERPINE1 mRNA. Plus (+) and minus (-) signs at the left of each representation indicate the ability or failure to bind Stau1, respectively. (B) Western blot analysis using anti(α)-HA or anti- β -Actin demonstrated that Stau1-HA₃ but, as expected, not β -Actin was immunopurified using anti-HA, and neither β -Actin nor Stau1- HA₃ was immunopurified using rIgG. (C) RT-PCR analysis demonstrated that SERPINE1 3'UTR nucleotides 1297-1592, like SERPINE1 3'UTR nucleotides 1-1592 and the Arf1 SBS, bind Stau1-HA₃, whereas other nucleotides of the SERPINE1 3'UTR do not. The level of each FLuc-SERPINE1 3'UTR mRNA after immunopurification was normalized to the level of fos-FLuc-Arf1 SBS mRNA after immunopurification and divided by the ratio of the level of FLuc-SERPINE1 3'UTR mRNA to fos-FLuc-Arf1 SBS mRNA before

immunopurification. This value for FLuc-SERPINE1 3'UTR (1-1592) mRNA is defined as 100, and values for the other FLuc-SERPINE 3'UTR mRNAs were calculated a percentage of 100. Results are representative of two independently performed experiments.

3.3.9 Figures

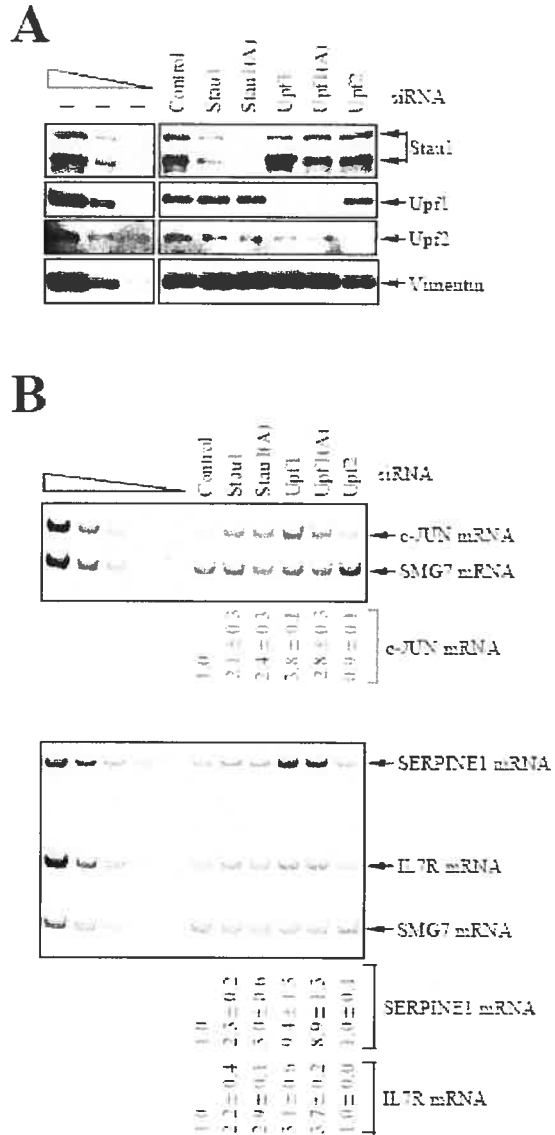


Figure 1 : c-JUN, SERPINE1 and IL7R mRNAs are increased in abundance in human cells depleted of either Stau1 or Upf1 but not Upf2.

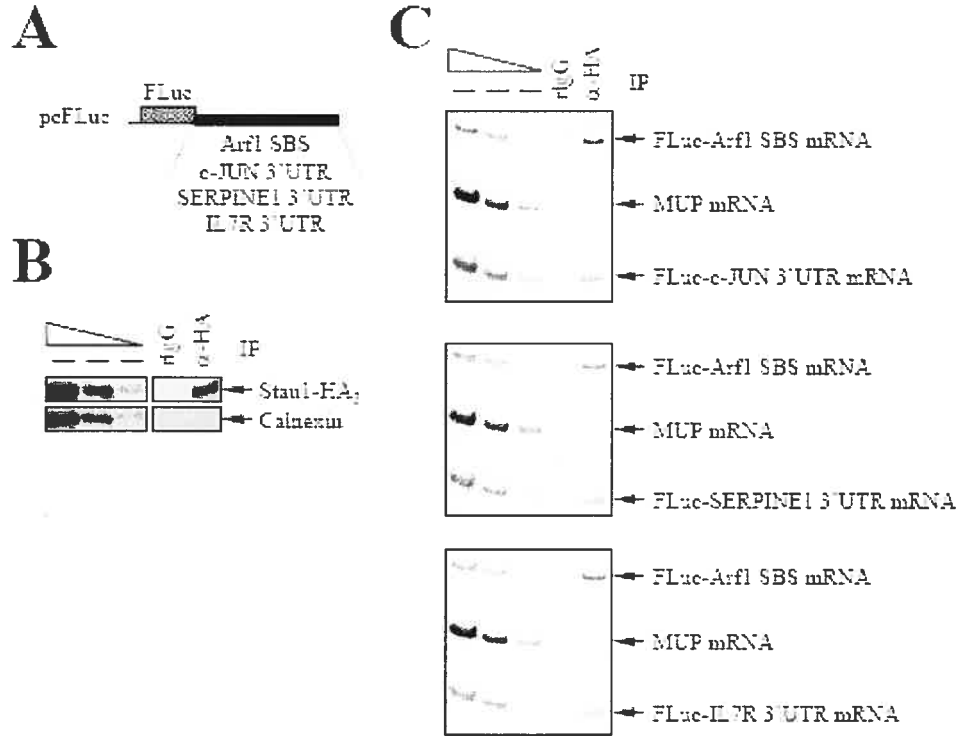


Figure 2: Stau1 binds within the 3'UTR of c-JUN, SERPINE1 and IL7R mRNAs.

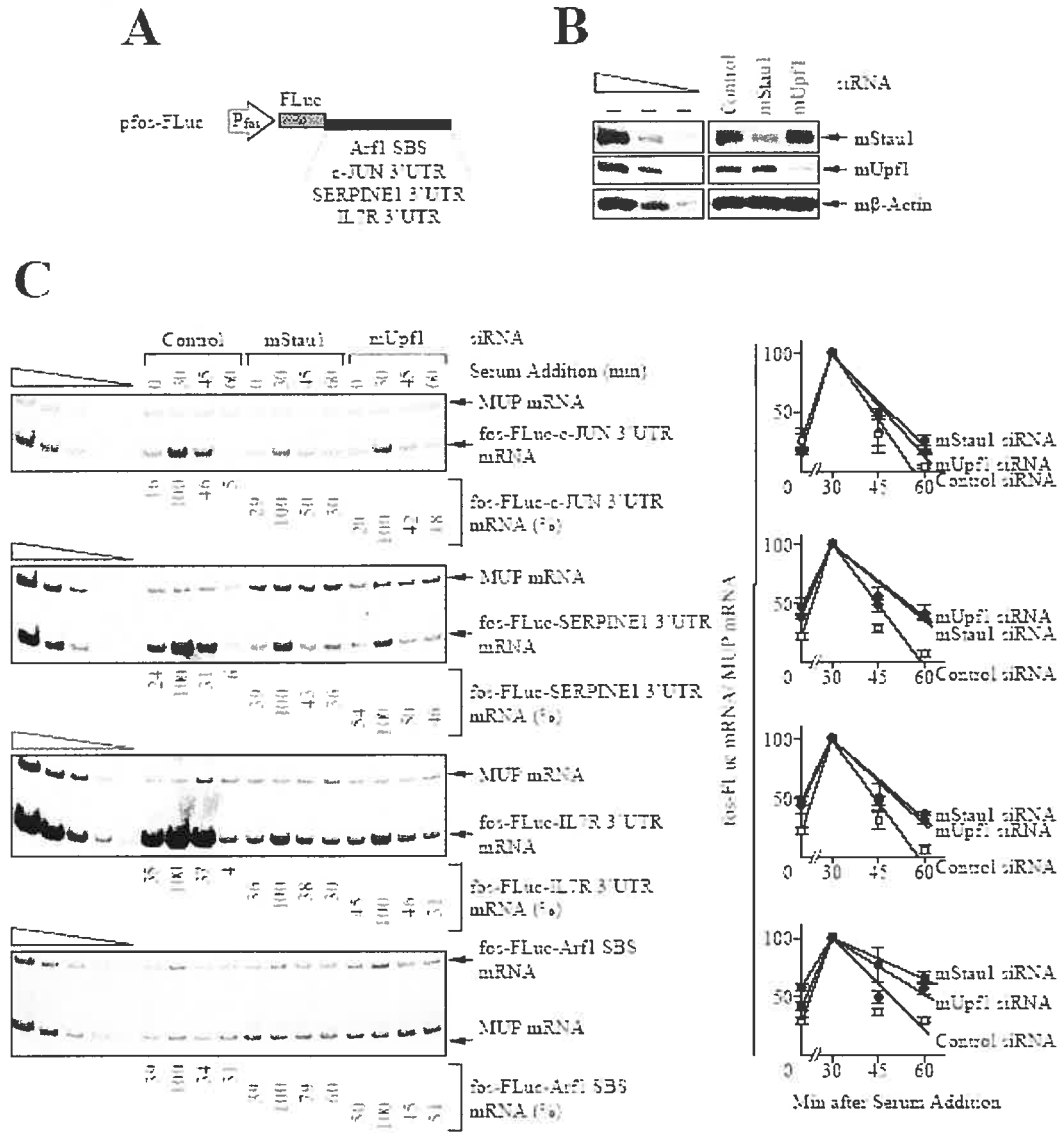


Figure 3: Depleting cells of Stau1 or Upf1 increases the half-life of FLuc mRNA when the 3'UTR consists of c-JUN, SERPINE1 or IL7R 3'UTR sequences that bind Stau1.

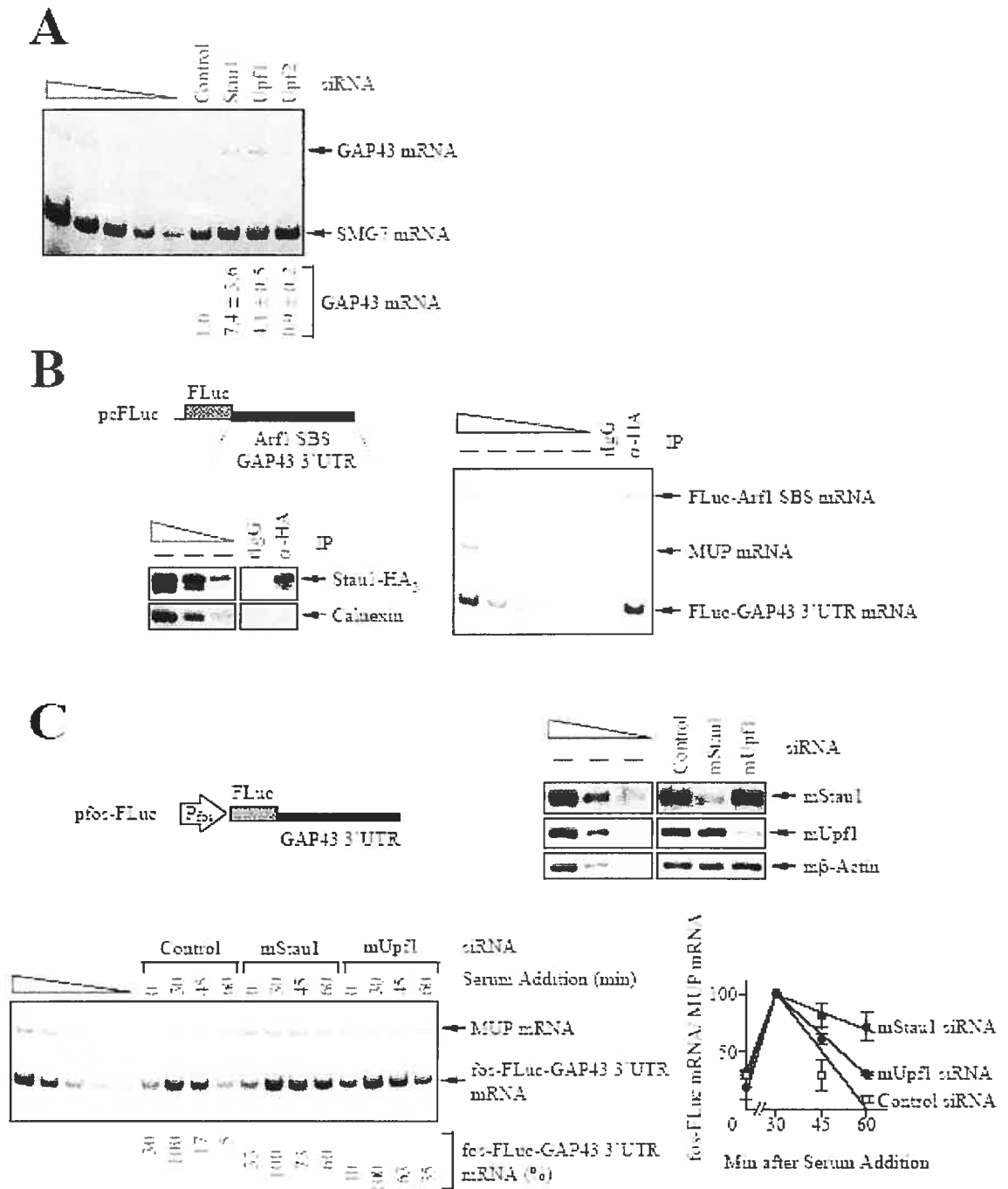


Figure 4: GAP43 mRNA is an SMD target.

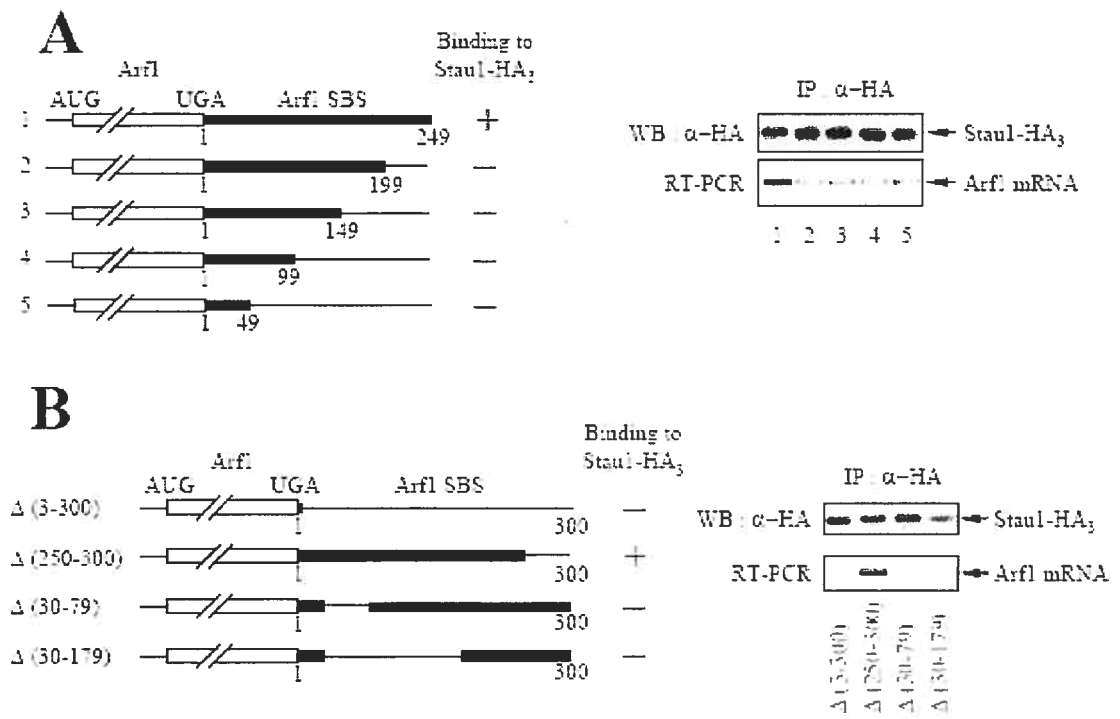


Figure 5: Deletions within the Arf1 SBS indicate that a central core region is required for Stau1 binding.

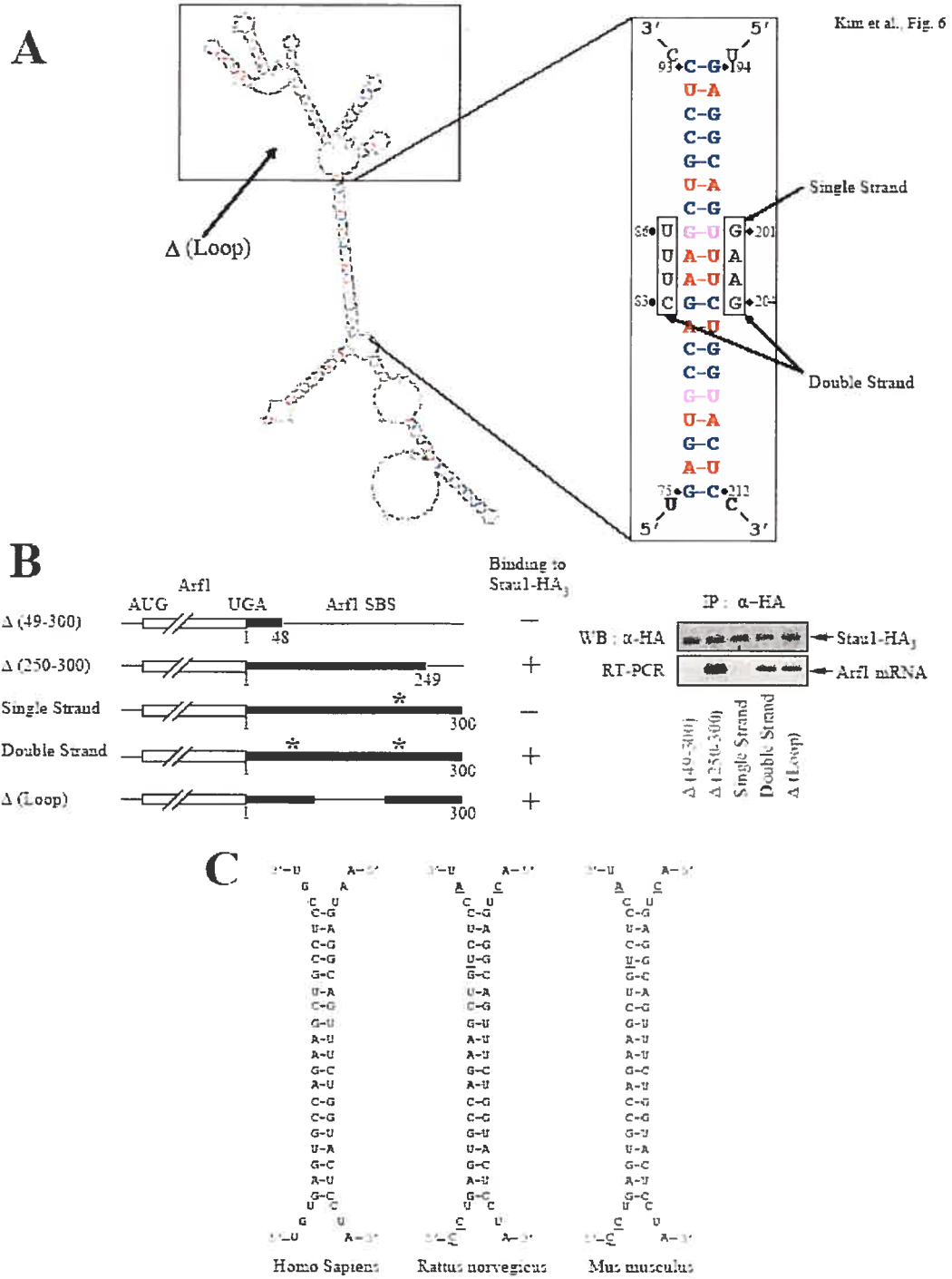


Figure 6: Stau1 interacts with a predicted 19-bp stem within the Arf1 SBS.

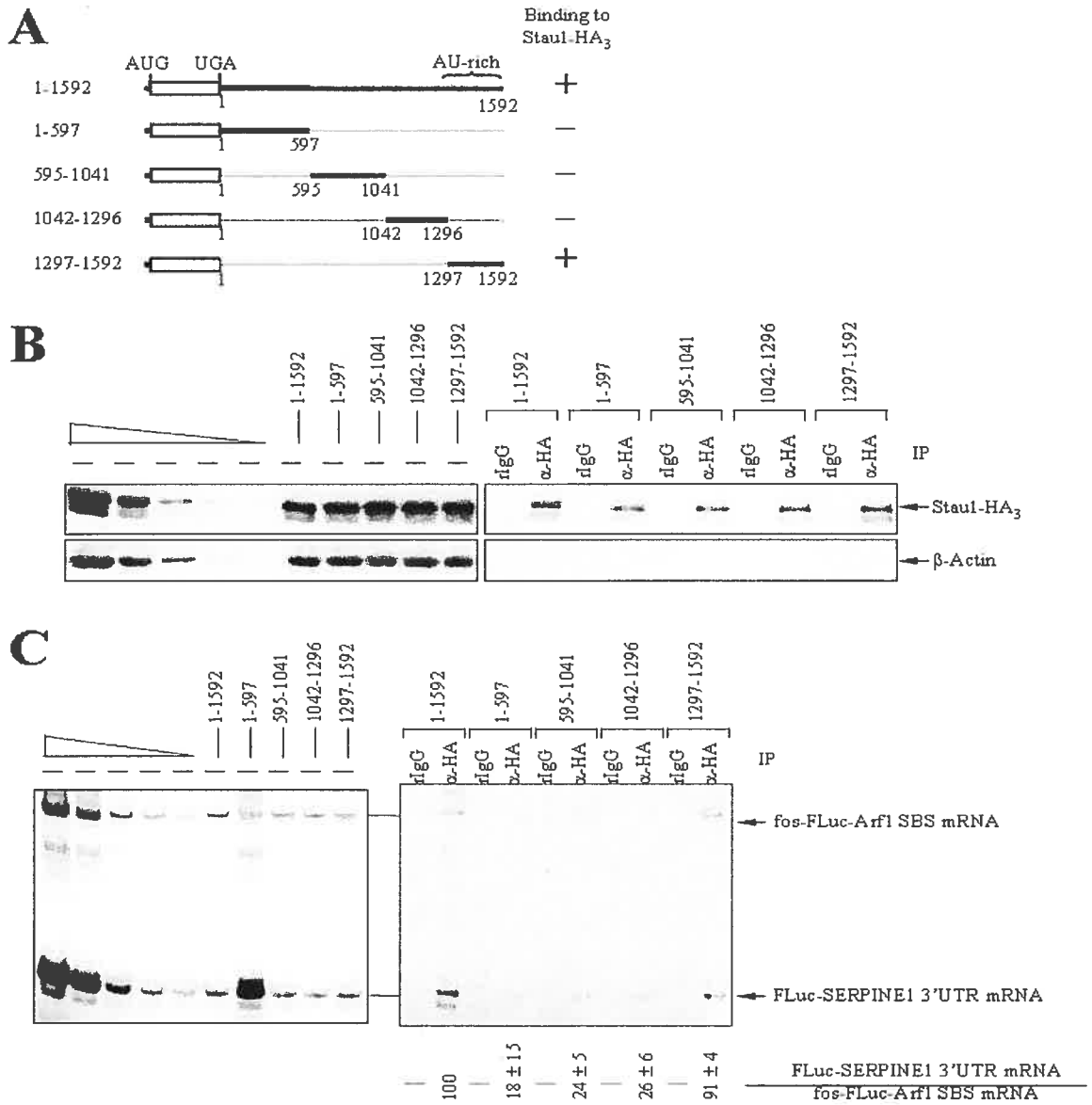


Figure 7: Stau1 binds to a 296-nucleotide region of the SERPINE1 3'UTR.

3.3.10 Supplementary Tables

Supplemental Table S1. Transcripts upregulated in human cells depleted of Stau1 in three independently performed microarray analyses.

Supplemental Table 1. Transcripts upregulated in human cells depleted of Stau1 in three independently performed microarray analyses			
Transcript	Fold change	Abbreviation	Probe set
<i>Homo sapiens</i> hypothetical protein LOC338466 mRNA (cDNA clone IMAGE 5166507) partial	9.79		1562908_at
I factor (complement)	6.78	IF	1555664_a_at
fibronectin 1	7.98	FN1	216442_x_at
interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	7.51	IFIT2	226757_at
	5.91		211506_s_at
interferon-induced protein 44	5.88	IFI44	214059_at
secretogranin II (chromogranin C)	5.62	SCG2	204035_at
stathmin-like 3	5.53	STMN3	222557_at
growth associated protein 43	5.46	GAP43	204471_at
creatine kinase mitochondrial 1 (ubiquitous)	5.35	CKMT1	202712_s_at
osteoblast specific factor 2 (fasciclin I-like)	5.30	OSF-2	210609_s_at
hypothetical protein FLJ25348	4.77	FLJ25348	1562415_a_at
guanine nucleotide binding protein (G protein) gamma 4	4.75	GN4	205164_at
hypothetical protein FLJ33505	4.73	FLJ33505	1561114_a_at
filamin-binding LIM protein-1	4.71	FBLP-1	1555460_a_at
claudin 11 (oligodendrocyte transmembrane protein)	4.50	CLDN11	226335_at
<i>Homo sapiens</i> transcribed sequence with weak similarity to protein ref:NP_060265.1 (<i>H. sapie.</i>	4.46		235629_at
insulin-like growth factor binding protein 5	4.30	IGFBP5	211959_at
integrin beta 3 (platelet glycoprotein IIIa antigen CD61)	4.16	ITGB3	204627_e_at
interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 4	4.13	IFIT4	229450_at
alpha-actinin-2-associated LIM protein	3.97	ALP	210170_at
transgelin	3.94	TAGLN	205547_s_at
2'-5'-oligoadenylate synthetase-like /// 2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	3.86	OASL	210797_s_at
tissue factor pathway inhibitor 2	3.82	TFPI2	209277_at
catenin (cadherin-associated protein) alpha-like 1	3.60	CTNNA1	213712_at
<i>Homo sapiens</i> cDNA: FLJ20914 fis clone ADSE00646	3.76		234597_at
thrombospondin 1	3.73	THBS1	201106_s_at
protein tyrosine phosphatase receptor type O	3.62	PTPRO	1554199_at
cyclin-E binding protein 1	3.60	CEB1	219663_at
NADPH oxidase 4	3.59	NOX4	219773_at
hypothetical protein MGC29643	3.58	MGC29643	212909_at
<i>Homo sapiens</i> uncharacterized gastric protein ZA43P mRNA partial: cds	3.43		232696_at
<i>Homo sapiens</i> similar to KIAA0563-related gene (LOC376654) mRNA	3.42		1562921_at
hypothetical protein FLJ20035	3.40	FLJ20035	218966_s_at
<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ41160 fis clone BRACE2043142	3.40		227690_at

tissue factor pathway inhibitor 2	3.35	TFPI2	209276_s_at
absent in melanoma 1	3.34	AIM1	212543_at
chromosome 14 open reading frame 141	3.29	C14orf141	223690_at
dual specificity phosphatase 6	3.29	DUSP6	206691_at
interferon alpha-inducible protein (clone IFI-15K)	3.19	G1P2	205483_s_at
serine (or cysteine) proteinase inhibitor clade E (nexin plasminogen activator inhibitor type 1) m	3.16	SERPINE1	202626_s_at
<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ23692 fis clone HEP10227	3.13		235646_at
hypothetical protein FLJ20637	3.04	FLJ20637	219352_at
signaling lymphocytic activation molecule family member 1	3.00	SLAMF1	206181_at
selenocysteine lyase	2.98	SCLY	59705_at
interleukin 7 receptor	2.97	IL7R	205796_at
Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	2.94	ARHGD3	201266_at
actin alpha 2 smooth muscle aorta	2.94	ACTA2	200974_at
chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity alpha)	2.84	CXCL1	204470_at
DEAD/H (Asp-Glu-Asp/His) box polypeptide	2.83	RIG-I	216943_s_at
insulin-like growth factor binding protein 5	2.78	IGFBP5	211956_at
interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	2.78	IFIT1	203153_at
<i>Homo sapiens</i> hypothetical protein LOC265103 mRNA (cDNA clone IMAGE:5273139) partial c	2.76		227966_s_at
decapping enzyme hDcp2	2.74	DCP2	212919_at
hypothetical protein FLJ34064	2.73	FLJ34064	1553244_at
eukaryotic translation initiation factor 5A2	2.73	EIF5A2	235289_at
hypothetical protein MGC19764	2.71	MGC19764	1557078_at
<i>Homo sapiens</i> BIC noncoding mRNA complete sequence	2.69		229437_at
transducin-like enhancer of split 4 (E(spl) homolog <i>Drosophila</i>)	2.68	TLE4	235765_at
dapper homolog 1 antagonist of beta-catenin (xenopus)	2.67	DACT1	219179_at
chromosome 9 open reading frame 39	2.64	C9orf39	220095_at
<i>Homo sapiens</i> transcribed sequences	2.61		229242_at
v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	2.58	JUN	201466_s_at
integrin alpha 4 (antigen CD49D alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)	2.56	ITGA4	205665_s_at
<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ40697 fis clone THYMU2025406	2.53		235203_at
<i>Homo sapiens</i> transcribed sequences	2.53		236617_at
tenascin C (hexabrachion)	2.52	TNC	201645_at
hypothetical protein FLJ13621	2.50	FLJ13621	207286_at
flavoprotein oxidoreductase MICAL2	2.47	MICAL2	212473_s_at
<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ46457 fis clone THYMU3020956	2.44		225007_at
thymosin beta identified in neuroblastoma cells	2.44	TMSNB	205347_s_at
prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	2.42	PTGER4	204697_at

chromosome 14 open reading frame 126	2.41	C14orf123	226669_at
ganglioside-induced differentiation-associated protein 1	2.41	GDAP1	226269_at
zinc finger protein 36 C3H type-like 1	2.36	ZFP36L1	211965_at
uracil-DNA glycosylase	2.37	UNG	202330_s_at
hypothetical protein MGC27277	2.37	MGC27277	242263_at
<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ10156 fis clone HEMBA1303463	2.55		232125_at
CDK5 regulatory subunit associated protein 1-like 1	2.34	CDKAL1	214677_at
<i>Homo sapiens</i> transcribed sequence with moderate similarity to protein ref.NP_071431.1 (<i>H. sc</i>	2.32		227547_at
aldehyde dehydrogenase 1 family member A3	2.32	ALDH1A3	203160_at
proteasome (prosome macropain) subunit beta type 9 (large multifunctional protease 2)	2.29	PSMB9	204279_at
PHD finger protein 11	2.27	PHF11	221816_s_at
B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1	2.27	BANK1	219667_s_at
KIAA0143 protein	2.26	KIAA0143	212150_at
guanylate binding protein 1 interferon-inducible 67kDa	2.26	GBP1	202270_at
epiplakin 1	2.25	EPPK1	232164_s_at
actinin alpha 1	2.24	ACTN1	211160_x_at
ring finger protein 20	2.22	RNF20	222663_at
leucine rich repeat (in FHL1) interacting protein 1	2.22	LRRFIP1	223492_s_at
<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ39619 fis clone SPLEN2010534	2.21		1556111_s_at
hypothetical protein LOC150753	2.21	LOC150753	213703_at
dihydropyrimidinase-like 3	2.20	DPYSL3	201431_s_at
type 1 transmembrane receptor (seizure-related protein)	2.20	PSK-1	233337_s_at
zinc finger protein 90 homolog (mouse)	2.20	ZFP90	235696_at
tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	2.20	TP53	211300_s_at
<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ11465 fis clone HEMBA1001836	2.19		228632_at
dnaj-like protein	2.17	LOC148413	229402_at
transforming growth factor beta 1 induced transcript 1	2.15	TGFB111	209651_at
ets variant gene 1	2.15	ETV1	221911_at
Rho GTPase activating protein 19	2.14	ARHGAP19	212736_at
<i>Homo sapiens</i> hypothetical LOC264120 (LOC264120) mRNA	2.13		241394_at
suppressor of cytokine signaling 2	2.13	Socs2	203373_at
cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit 1 (p35)	2.11	CDK5R1	204995_at
likely ortholog of mouse Sds3	2.11	SDS3	233641_s_at
<i>Homo sapiens</i> transcribed sequences	2.09		244091_at
spinal cord-derived growth factor-B	2.09	SCDGF-B	219304_s_at
<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ37290 fis clone BRAM12014469	2.09		231026_at
histone deacetylase 9	2.07	HDAC8	223906_at

<i>Homo sapiens</i> transcribed sequence with weak similarity to protein pir.I39566 (<i>H. sapiens</i>) I39	2 06	1567079_at
<i>Homo sapiens</i> full length insert cDNA clone YP61C10	2 06	235302_at
high-mobility group box 3	2 06	1561631_at
KIAA0931 protein	2 05	HMG53 225601_at
<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ33441 fis clone BRACE2021932	2 05	KIAA0931 213407_at
hypothetical protein DKFZp761K1423	2 04	1556061_at
protein tyrosine phosphatase receptor type F	2 04	DKFZp761K1423:216613_at
thioredoxin reductase 3	2 04	PTPRF 200635_s_at
CGI-72 protein	2 03	TXNRD3 59631_at
hypothetical protein MGC15634	2 03	CGI-72 231967_at
enoyl-Coenzyme A hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase	2 03	MGC15634 242923_at
hairy and enhancer of split 1 (<i>Drosophila</i>)	2 02	EHHADH 205222_at
chromosome 11 open reading frame 9	2 02	HES1 203394_s_at
TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein	2 00	C11orf9 204073_s_at
	2 00	TIA1 1554690_a_at

Supplemental Table S2: Transcripts downregulated in human cells depleted of Stau1 in three independently performed microarray analyses

Supplemental Table 2 Transcript: downregulated in human cells depleted of Stau1 in three independently performed microarray analyses

<i>Transcript</i>	<i>Fold change</i>	<i>Abbreviation</i>	<i>Probe set</i>
transmembrane protein 9	0.50	TMEM9	222986_s_at
MAX dimerization protein 1	0.50	MAD	228246_at
ecotropic viral integration site 5	0.50	EVI5	209717_at
NEDD8-conjugating enzyme	0.50	NCE2	225783_at
ATPase H ⁺ transporting lysosomal 9kDa V0 subunit e	0.49	ATP6V0E	236527_at
RAP2A member of RAS oncogene family	0.49	RAP2A	225585_at
T-cell leukemia translocation altered gene	0.49	TCTA	203054_s_at
ubiquitin-conjugating enzyme E2R 2	0.49	UBE2R2	226954_at
hypothetical protein FLJ30794	0.49	FLJ30794	238029_s_at
kelch-like 6 (<i>Drosophila</i>)	0.49	KLHL6	242646_at
junction-mediating and regulatory protein	0.49	JMY	241995_at
incomplete motif-containing 37	0.49	TRIM37	213039_s_at
tubulin-tyrosine ligase	0.48	TTL	224996_s_at
cystathionase (cystathionine gamma-lyase)	0.46	CTH	217127_at
LSM1 homolog U6 small nuclear RNA associated (<i>S. cerevisiae</i>)	0.46	LSM1	203534_at
protein kinase H11	0.46	H11	221667_s_at
H-myc downstream regulated gene 1	0.46	HDRG1	200632_s_at
<i>Homo sapiens</i> mRNA	0.46		230251_at
transmembrane 4 superfamily member 1	0.46	TM4SF1	215034_s_at
guanine nucleotide binding protein (G protein) alpha inhibiting activity polypeptide 1	0.46	GNAI1	227692_at
v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog 1	0.46	ARAF1	230652_at
isocitrate dehydrogenase 1 (NADP ⁺) soluble	0.46	IDH1	201193_at
solute carrier family 39 (zinc transporter) member 9	0.46	SLC39A9	222445_at
tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b (osteoprotegerin)	0.47	TNFRSF11B	204932_at
insulin induced gene 1	0.47	INSIG1	201626_at
ALL1 fused gene from 5q31	0.47	AF5Q31	243487_at
solute carrier organic anion transporter family member 3A1	0.47	SLCO3A1	210542_s_at
hypothetical protein LOC154607	0.47	LOC154607	1553679_s_at
<i>Homo sapiens</i> cDNA clone IMAGE:4304666 partial cds	0.47		1559007_s_at
<i>Homo sapiens</i> transcribed sequence with moderate similarity to protein pdb:1L3G (<i>E</i>)	0.47		230046_at
SAR1a gene homolog 2 (<i>S. cerevisiae</i>)	0.47	SARA2	1554482_a_at
putative nucleic acid binding protein RY-1	0.47	RY1	212440_at
TATA element modulatory factor 1	0.47	TMF1	227605_at
hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12	0.46	HSD17B12	217869_at
disabled homolog 2 mitogen-responsive phosphoprotein (<i>Drosophila</i>)	0.46	DAB2	201280_s_at

ATP citrate lyase	0.46	ACLY	210337_s_at
chondroitin beta14 N-acetyl galactosaminyltransferase	0.46	ChGn	219049_at
chromosome 9 open reading frame 12	0.46	C9orf12	219092_s_at
hypothetical protein DKFZp762K222	0.46	DKFZp762K222	231969_at
inhibitor of DNA binding 2 dominant negative helix-loop-helix protein	0.46	ID2	221565_s_at
dual specificity phosphatase 1	0.46	DUSP1	221041_s_at
<i>Homo sapiens</i> transcribed sequences	0.45		239577_s_at
transforming growth factor beta receptor III (betaglycan 300kDa)	0.45	TGFBR3	226625_at
GABA(A) receptors associated protein like 3	0.45	GABARAPL3	211459_s_at
nuclear receptor subfamily 4 group A member 2	0.45	NR4A2	204622_x_at
<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ36505 fis clone HCHON2000226	0.45		227443_at
synaptosomal-associated protein 23kDa	0.45	SNAP23	209131_s_at
RWD domain containing 3	0.44	RWDD3	205097_at
retinoic acid early transcript 1E	0.44	RAET1E	1552777_a_at
polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide L 7.6kDa	0.44	POLR2L	202586_at
kelch-like 2 Mayven (<i>Drosophila</i>)	0.44	KLHL2	219157_at
solute carrier family 16 (vesicular monoamine) member 2	0.44	SLC16A2	230416_at
sideroflexin 1	0.44	SFXN1	230069_at
KIAA0256 gene product	0.43	KIAA0256	212450_at
	0.43		227276_at
GABA(A) receptor-associated protein like 1	0.43	GABARAPL1	209868_s_at
solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters) member 2	0.43	SLC11A2	203124_s_at
sphingomyelin phosphodiesterase acid-like 3A	0.43	SMPDL3A	213624_at
neuronal pentraxin I	0.43	NPTX1	204694_at
fucosyltransferase 11 (alpha (13) fucosyltransferase)	0.43	FUT11	226348_at
4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	0.43	HPD	206024_at
diphtheria toxin receptor (heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor)	0.43	DTR	293821_at
hypothetical protein DKFZp762C1112	0.43	DKFZp762C1112	225974_at
sorting nexin 13	0.43	SNX13	227031_at
fibronectin leucine rich transmembrane protein 2	0.42	FLRT2	204359_at
START domain containing 7	0.42	START7	200029_s_at
ubiquitin specific protease 31	0.42	USP31	229812_at
<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ37264 fis clone BRAMY2013590	0.42		225728_at
protein tyrosine phosphatase type IVA member 1	0.42	PTP4A1	200732_s_at
glutamate-cysteine ligase modifier subunit	0.42	GCLM	234986_at
guanine nucleotide binding protein (G protein) alpha activating activity polypeptide of	0.42	GNAL	218176_s_at
chromosome 13 open reading frame 1	0.42	C13orf1	230151_at

heat shock 70kDa protein 9B (mortalin-2)	0.42	HSPA9B	200690_at
FK506 binding protein 14.22 kDa	0.42	FKBP14	235311_at
adducin 1 (alpha) // adducin 1 (alpha)	0.42	ADD1	208030_s_at
hypothetical protein FLJ20151	0.41	FLJ20151	214164_x_at
sestn3	0.41	SESN3	225123_at
<i>Homo sapiens</i> transcribed sequence with strong similarity to protein ref NP_073316	0.41		230728_at
Arg/Abl-interacting protein ArgBP2	0.41	ARGBP2	204289_s_at
adaptor-related protein complex 1 gamma 1 subunit	0.41	AP1G1	215867_x_at
cyclin C	0.41	CCNC	201955_at
collagen type XXV alpha 1	0.41	COL25A1	1555253_at
hypothetical protein BC013767	0.40	LOC114990	225967_at
KIAA0377 protein	0.40	KIAA0377	212792_at
HSPC163 protein	0.40	HSPC163	228437_at
hypothetical protein FLJ14213	0.39	FLJ14213	219383_at
<i>Homo sapiens</i> mRNA	0.39		227626_at
family with sequence similarity 20 member B	0.39	FAM20B	202916_s_at
likely ortholog of mouse hypoxia induced gene 1	0.39	HIG1	221996_s_at
nuclear receptor subfamily 4 group A member 3	0.36	NR4A3	207978_s_at
aldo-keto reductase family 1 member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1)	0.36	AKR1C1	1555854_at
hypothetical protein FLJ90492	0.37	FLJ90492	226604_at
low density lipoprotein receptor-related protein 11	0.37	LRP11	225060_at
junctional protein 1	0.37	JPH1	229139_at
calumenin	0.37	CALU	200756_x_at
solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter) member 13	0.37	SLC2A13	1552695_a_at
<i>Homo sapiens</i> Similar to LOC166075 clone IMAGE5173621 mRNA partial cds	0.36		236739_at
delta sleep inducing peptide immunoreactor	0.36	DSIP1	208763_s_at
sperm associated antigen 1	0.36	SPAG1	210117_at
carbonic anhydrase XII	0.35	CA12	210735_s_at
inositol 145-triphosphate receptor type 1	0.34	ITPR1	216944_s_at
uronyl-2-sulfotransferase	0.34	UST	205139_s_at
stanniocalcin 2	0.34	STC2	203436_at
clusterin (complement lysis inhibitor SP-4040 sulfated glycoprotein 2 testosterone-re)	0.34	CLU	222043_at
adaptor-related protein complex 1 sigma 3 subunit	0.31	AP1S3	237159_x_at
<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ20769 fis clone COL06674	0.31		232060_at
ADP-ribosylation-like factor 6-interacting protein 6	0.31	MGC33664	225711_at
abhydrolase domain containing 3	0.31	ABHD3	213017_at
pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4	0.31	PDK4	205660_at

tumor necrosis factor receptor superfamily member 10b	0.30	TNFRSF10B	209295_at
aspartate beta-hydroxylase	0.30	ASPH	242637_at
<i>Homo sapiens</i> mRNA	0.29		228141_at
cell cycle progression 3 protein	0.26	CPR3	201156_x_at
thioredoxin interacting protein	0.26	TXNIP	201008_s_at
staufen RNA binding protein (<i>Drosophila</i>)	0.24	STAU1	211505_s_at

Supplemental Table S3: Primer pairs used to amplify transcripts found in microarray analyses to be upregulated or downregulated in human cells after Stau1 depletion

Supplemental Table 3 Primer pairs used to amplify transcripts found in microarray analyses to be upregulated or downregulated in human cells after Stau1 depletion

Gene	Primer (Sense)	Primer (Antisense)
c-JUN	5'-CTT GAA AGC TCA GAA CTC GG-3'	5'-TCA GCC CCC GAC GGT CTC TC-3'
SERPINE1	5'-ACC GCC AAT CGC AAG GCA CC-3'	5'-GCT GAT CTC ATC CTT GTT CC-3'
IL7R	5'-AAG TGG CTA TGC TCA AAA TG-3'	5'-TTC AGG CAC TTT ACC TCC AC-3'
IF	5'-CCT TGA CCT TGG GTT TCA AC-3'	5'-ATT TGC AAT GGA AGC CTT TG-3'
GAP43	5'-TGT GCT GTA TGA GAA GAA CC-3'	5'-GCT TCA TCC TTC TTA TTA GC-3'
CKMT1	5'-GAC TGG CCA GAT GCT CGT GG-3'	5'-ATC TTT GGG AAG CGG CTA TC-3'
STMN3	5'-CCA TGG CCA GCA CCA TTT CC-3'	5'-ACC TCG GCC GCG TGC AGC TC-3'
TAGLN	5'-TCC TTC CTG CGA GCC CTG AG-3'	5'-GCA CTG CTG CCA TGT CTT TG-3'
OASL	5'-TGC AAT CAT TGA GGA TTG TG-3'	5'-CAC TGT CAA GTG GAT GTC TC-3'
GDI1	5'-GAC AGA GAC GTG AAG CAC TG-3'	5'-CCA TAA ATG TTG CTT TAT CC-3'
CXCL1	5'-CCT GGT AGC CGC TGG CCG GC-3'	5'-CTT CTG GTC AGT TGG ATT TG-3'
DCP2	5'-GAT TTA TGT TGT TGT AGT TG-3'	5'-CCA AGC AGC CAA TTT TAT TG-3'
TMSL8	5'-ACA GCC TTT CAC GAG TCT TC-3'	5'-CTG CTG TTG GGA GGC GAT CC-3'
PSMB9	5'-GCG CGA GAA GTC CAC ACC GG-3'	5'-AGG CTG TCG AGT CAG CAT TC-3'
GDAP1	5'-AGT TAA CTG TGG ACT CCA TG-3'	5'-ACT TTC TCC AAC TCA TCA AG-3'
STC2	5'-CCT GTC CCT GCA GAA TAC AG-3'	5'-GTT CAC GAG GTC CAC GTA GG-3'
DUSP	5'-GCA AGT CTT CTT CCT CAA AG-3'	5'-TTC CTC CAG CAT TCT TGA TG-3'
GABARAPL1	5'-AAA TAT CCG GAC AGG GTC CC-3'	5'-TAG TCI TCC TCA TGA TTG TC-3'
TXNP	5'-TCT GGA AGA CCA GCC AAC AG-3'	5'-TCA GCA TGG ATG GAA ATC TC-3'
TNFRSF10B	5'-TCG CCG CGG TCC TGC TGT TG-3'	5'-TGA CCA TCC CTC TGG GAC AC-3'
CCPG1	5'-GGT CTG GAC TGA TGA AAA TC-3'	5'-CAC TGT GCC ATT TTG GCT GC-3'

Supplemental Table S4: Selected examples of transcripts upregulated in human cells depleted of Stau1 in three independently performed microarray analyses

Supplemental Table 4 Selected examples of transcripts upregulated in human cells depleted of Stau1 in three independently performed microarray analyses

Cell motility, cell adhesion, extracellular matrix

actin alpha 2 smooth muscle aorta
 chromosome 14 open reading frame 141
 fibronectin 1
 filamin-binding LIM protein-1
 insulin-like growth factor binding protein 5
 integrin alpha 4 (antigen CD49D alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)
 integrin beta 3 (platelet glycoprotein IIIa antigen CD61)
 osteoblast specific factor 2 (fasciclin I-like)
 protein tyrosine phosphatase receptor type F
 tenascin C (hexabrachion)
 thrombospondin 1
 transforming growth factor beta 1 induced transcript 1

Structural molecule activity, cytoskeleton, cytoskeleton organization and biogenesis

actin alpha 2 smooth muscle aorta
 actinin alpha 1
 chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity alpha)
 filamin-binding LIM protein-1
 Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta
 thymosin beta identified in neuroblastoma cells
 tissue factor pathway inhibitor 2

Regulation of cell growth, cell cycle

chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity alpha)
 chromosome 14 open reading frame 141
 cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit 1 (p35)
 cyclin-E binding protein 1
 dual specificity phosphatase 6
 ets variant gene 1
 growth associated protein 43
 histone deacetylase 8
 signaling lymphocytic activation molecule family member 1
 spinal cord-derived growth factor-B
 suppressor of cytokine signaling 2
 tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)
 v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)

Apoptosis

catenin (cadherin-associated protein) alpha-like 1
 TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein
 tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)

Immune response

2'-5'-oligoadenylate synthetase-like
 chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity alpha)
 fibronectin 1
 guanylate binding protein 1 interferon-inducible 67kDa
 interferon alpha-inducible protein (clone IFI-15K)
 interferon-induced protein with tetratricopeptide repeat 1
 interferon-induced protein with tetratricopeptide repeat 2
 interferon-induced protein with tetratricopeptide repeat 4
 interleukin 7 receptor
 prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)

proteasome (prosome macropain) subunit beta type 9 (large multifunctional protease 2)
 Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta
 signaling lymphocytic activation molecule family member 1

Response to stress (extracellular stimuli)

chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity alpha)
 fibronectin 1
 growth associated protein 43
 integrin beta 3 (platelet glycoprotein IIIa antigen CD61)
 interferon-induced protein 44
 interleukin 7 receptor
 signaling lymphocytic activation molecule family member 1
 tissue factor pathway inhibitor 2

Regulation of DNA recombination, DNA repair

interleukin 7 receptor
 tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)
 uracil-DNA glycosylase

Regulation of transcription

ets variant gene 1
 hairy and enhancer of split 1 (*Drosophila*)
 high-mobility group box 3
 leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1
 PHD finger protein 11
 transducin-like enhancer of split 4 (E(sp1) homolog *Drosophila*)
 transforming growth factor beta 1 induced transcript 1
 tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)
 v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)
 zinc finger protein 90 homolog (mouse)

Regulation of translation

eukaryotic translation initiation factor 5A2

Protein secretion

secretogranin II (chromogranin C)

Signal cascade

2'-5'-oligoadenylate synthetase-like
 chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity alpha)
 chromosome 14 open reading frame 141
 dihydropyrimidine-like 3
 dual specificity phosphatase 6
 growth associated protein 43
 guanine nucleotide binding protein (G protein) gamma 4
 hypothetical protein FLJ33505
 inulin-like growth factor binding protein 5
 integrin alpha 4 (antigen CD49D alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)
 integrin beta 3 (platelet glycoprotein IIIa antigen CD61)
 interleukin 7 receptor
 prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)
 protein tyrosine phosphatase receptor type F
 protein tyrosine phosphatase receptor type O
 Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta
 signaling lymphocytic activation molecule family member 1
 spinal cord-derived growth factor-B

statin-like 3
 suppressor of cytokine signaling 2
 tenascin C (hexabrachion)
 thrombospondin 1
 transducin-like enhancer of split 4 (E(spl) homolog *Drosophila*)
 transforming growth factor beta 1 induced transcript 1
 type I transmembrane receptor (seizure-related protein)

Complement and coagulation cascade:

I factor (complement)
 serine (or cysteine) proteinase inhibitor clade E
 thrombospondin 1
 tissue factor pathway inhibitor 2

Cellular metabolism

aldehyde dehydrogenase 1 family member A3
 CGI-72 protein
 cyclin-E binding protein 1
 dihydropyrimidinase-like 3
 enoyl-Coenzyme A hydratase 3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase
 hypothetical protein FLJ25348
 protein tyrosine phosphatase receptor type O
 selenocysteine lyase
 uracil-DNA glycosylase

Development, Morphogenesis, Organogenesis:

actin alpha 2 smooth muscle aorta
 chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity alpha)
 cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit 1 (p35)
 dihydropyrimidinase-like 3
 filamin-binding LIM protein-1
 growth associated protein 43
 hairy and enhancer of split 1 (*Drosophila*)
 high-mobility group box 3
 osteoblast specific factor 2 (osteocalcin I-like)
 Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta
 statin-like 3
 suppressor of cytokine signaling 2
 thrombospondin 1
 transducin-like enhancer of split 4 (E(spl) homolog *Drosophila*)
 transgelin
 tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)

Organelle organization and biogenesis:

thymosin beta identified in neuroblastoma cells

Oxidoreductase activity:

fibronectin 1

Proteasome, ubiquitin cycle

cyclin-E binding protein 1
 hypothetical protein FLJ20637
 proteasome (prosome macropain) subunit beta type 9 (large multifunctional protease 2)

Supplemental Table S5: Transcripts upregulated in human cells depleted of either *Stau1* (three independently performed analyses in this study) or *Upf1* (Mendell et al., 2004).

Supplemental Table 5: Transcripts upregulated in human cells depleted of either *Stau1* (three independently performed microarray analyses in this study) or *Upf1* (Mendell et al., 2004)

Transcript	Product function	Relative increase (microarray value)	
		<i>Stau1</i> depletion	<i>Upf1</i> depletion
Serpin (or cysteine) protease inhibitor clade E (nexin/plasminogen activator inhibitor type 1) member 1 (SERPINE1)	Part for tissue plasminogen activator, urokinase, and protein C	3.2	3.8
Interleukin 7 receptor (IL7R)	Receptor for interleukin 7	3.0	2.1
v-jun carcinoma virus 17 oncogene homolog (avian) (c-FUN)	Proto oncogene	2.6	5.3
Protein tyrosine phosphatase receptor type F (PTPRF)	Cell adhesion receptor	2.0	2.8

Supplemental Table S6: Transcripts upregulated in human cells depleted of Stau1 in three independently performed microarray analyses and that bind Stau1-HA₃ in three (white) or two (gray) independently performed microarray analyses

Supplemental Table 6 Transcripts upregulated in human cells depleted of Stau1 in three independently performed microarray analyses and that bind Stau1-HA₃ in three (white) or two (gray) independently performed microarray analyses

Transcript	Relative increase (microarray value)		Accession
	Stau1 depletion	Anti-HA IP	
<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ40697 fis clone THYMU2925406	2.5	16.6	AA398756
<i>Homo sapiens</i> transcribed sequence with moderate similarity to protein refNP_071431.1 (<i>H. sapiens</i>) cytokine receptor-like factor 2	2.3	9.2	AA524221
Interferon-induced protein with tetramcopeptide repeat-4 (IFIT4)	4.1	7.2	AI075407
Stathmin-like 3 (STMN3)	5.5	6.4	AL553715
Interferon alpha-inducible protein (clone IFI-15K) (GIP2)	3.2	4.1	NM_005101
Cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit 1 (p35) (CDK5R1)	2.1	3.8	AL567411
Decapping enzyme hDcp2 (DCP2)	2.7	2.6	AV715575
KIAA0143 protein (KIAA0143)	2.0	2.4	AW470003
Cyclin-E binding protein 1 (CEB1)	3.6	2.3	NM_015323
Rho GTPase activating protein 19 (RHGAP19)	2.1	2.0	U79256
Guanine nucleotide binding protein (G protein) gamma 4 (GNG4)	4.8	4.3	NM_004485
Rho GTPase activating protein 19 (RHGAP19)	2.1	2.1	AV717623
<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ37290 fis clone BRAMY2014469.	2.1	7.4	AW451135
Epiplakin 1 (EPPK1)	2.3	3.9	AL137725
Fibronectin 1 (FN1)	4.7	3.3	X02761
KIAA0931 protein (KIAA0931)	2.1	3.0	AB023148
<i>Homo sapiens</i> similar to KIAA0563-related gene (LOC376854) mRNA	3.4	2.6	BC040700
Likely ortholog of mouse Sds3 (SDS3)	2.1	2.6	AK026749
Thioredoxin reductase 3 (TXNRD3)	2.0	2.4	AI247566
KIAA0143 protein (KIAA0143)	2.3	2.3	AA805651

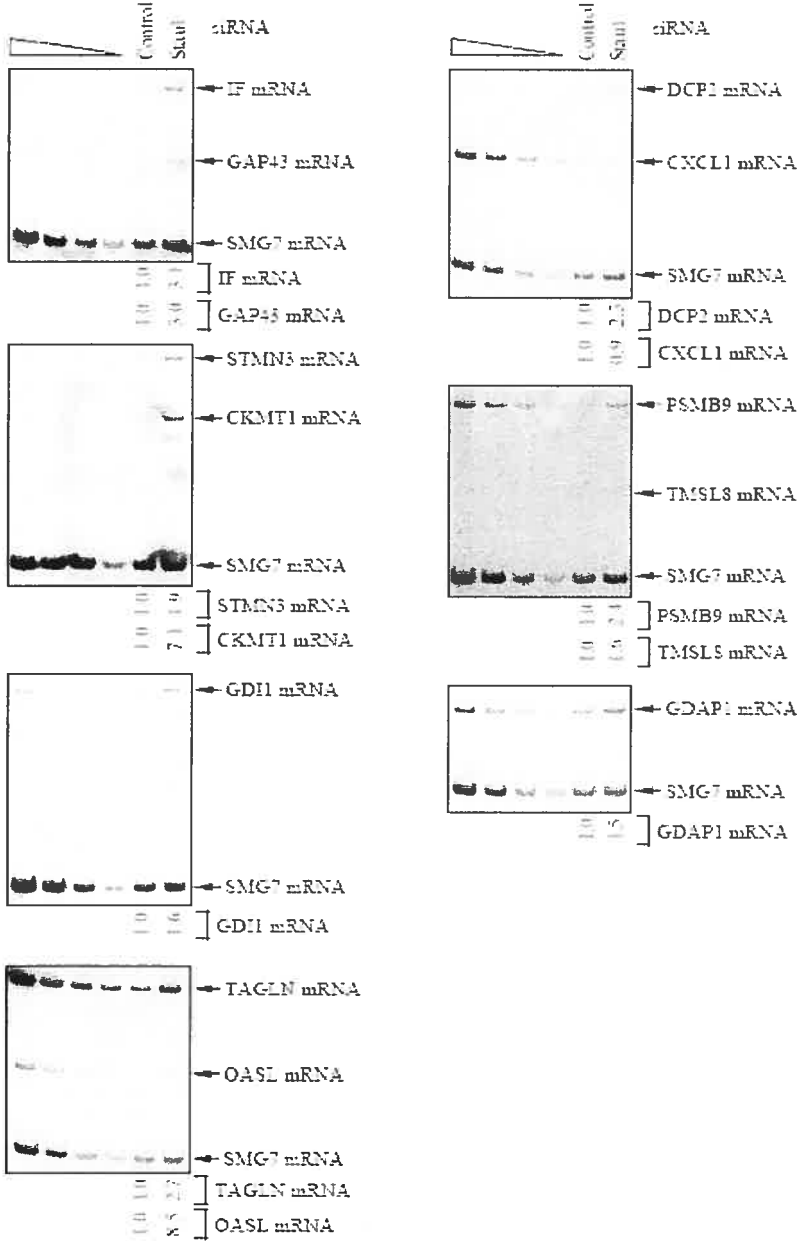
3.3.11 Supplementary Figure Legends

Supplemental Figure S1. Demonstration that 11 of 12 transcripts that were upregulated in human cells depleted of Stau1 using three independently performed microarray analysis are upregulated using RT-PCR and transcript-specific primers. Notably, RNAs analyzed were identical to the RNAs from Control and Stau1 siRNA-treated samples analyzed in Figure 1. The level of each test transcript was normalized to the level of SMG7 mRNA, which is insensitive to Stau1 siRNA (data not shown) and served to control for variations in RNA recovery. Numbers below each lane specify the fold change in the level of each test transcript in cells treated with Stau siRNA relative to Control siRNA, the latter of which was defined as 1.

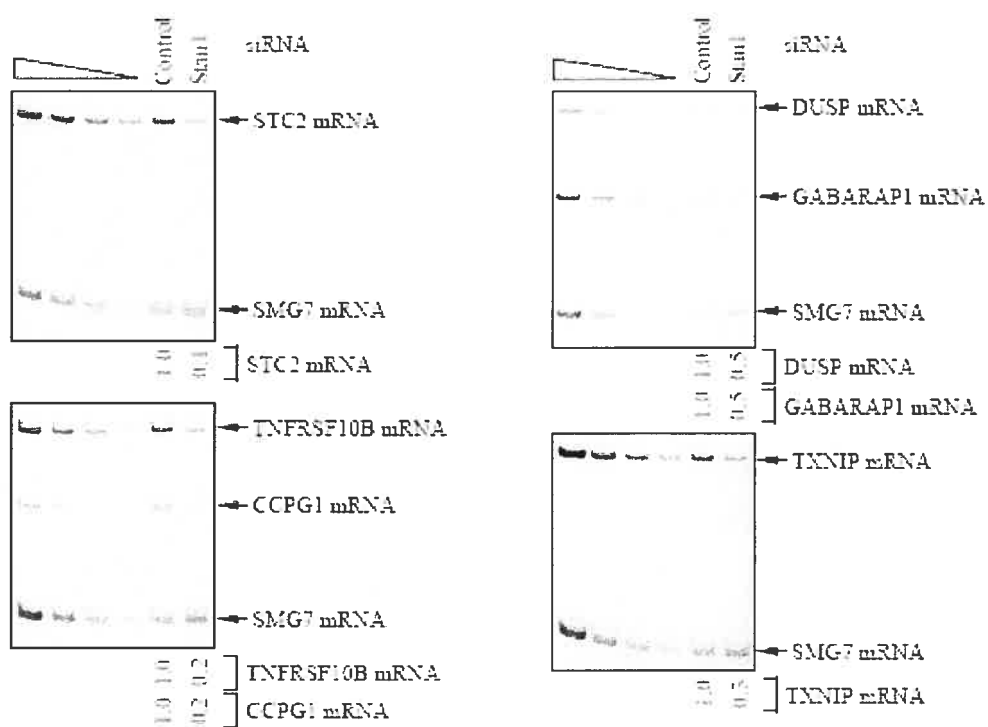
Supplemental Figure S2. Demonstration that 6 of 6 transcripts that were downregulated in human cells depleted of Stau1 using three independently performed microarray analysis are downregulated using RT-PCR and transcript-specific primers. The experimental procedure was as described in Supplemental Figure 1.

Supplemental Figure S3. Model for the secondary structure of the SERPINE1 SBS showing nucleotides 1297 through 1592. The plot was generated using the software RNAdraw v1.1 (Matzura and Wennborg, 1996). The green dots represent the base pairs that are common to the minimum free energy and competing structures. The blue dots are base pairs present in the minimum free energy structure only.

3.3.12 Supplementary Figures

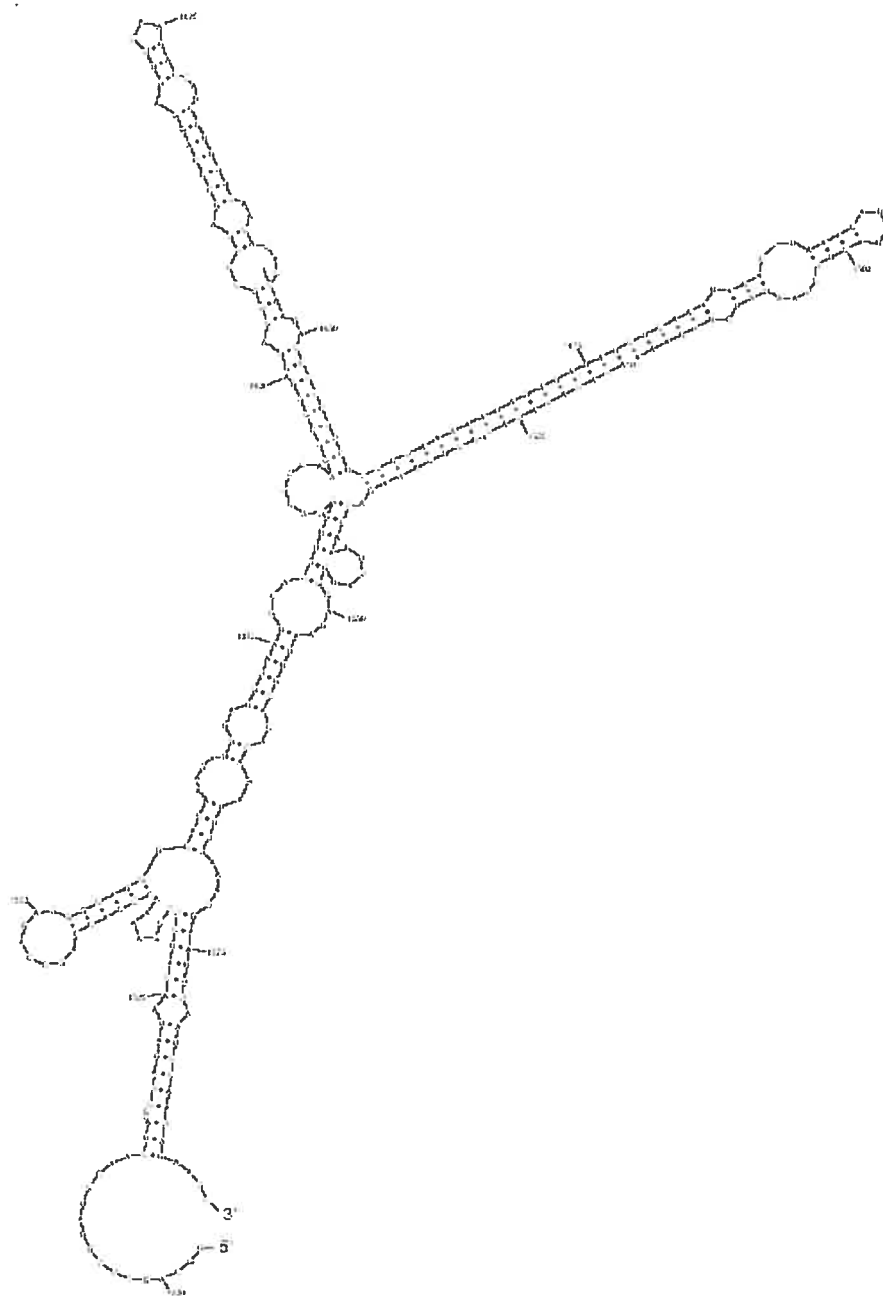


Supplemental Figure S1: Demonstration that 11 of 12 transcripts that were upregulated in human cells depleted of Stau1 are upregulated using RT-PCR.



Supplemental Figure S2: Demonstration that 6 of 6 transcripts that were downregulated in human cells depleted of Stau1 are downregulated using RT-PCR and transcript-specific primers.

SERPINE1 1297-1592



$$\Delta G_{\text{fold}}^{\circ} = -72.4$$

Supplemental Figure S3: Model for the secondary structure of the SERPINE1 SBS.

4 Article 3

Furic, L. and DesGroseillers, L. Mammalian Stau1 and Stau2 proteins associate to different subpopulations of mRNAs in human cells. Manuscrit en préparation pour soumission au journal RNA.

4.1 Mise en contexte

Dans le but d'obtenir un portrait global de tous les ARNm cellulaires qui pourraient potentiellement être régulés par les protéines Staufen de mammifères, nous avons voulu identifier les populations d'ARNm associées aux protéines Stau1 et Stau2 en utilisant des micropuces d'ADN.

4.2 Contributions des auteurs

Luc Furic : L'entièreté du travail expérimental et l'analyse des résultats de micropuces. Rédaction

Luc DesGroseillers : Supervision générale. Analyse des résultats de micropuces. Rédaction

4.3 Mammalian Stau1 and Stau2 proteins associate to different subpopulations of mRNAs in human cells.

Luc Furic¹ and Luc DesGroseillers^{1*}

¹Département de Biochimie, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre Ville, Montréal, (Qué) Canada H3C 3J7

*Corresponding author: 

4.3.1 Summary

Messenger RNAs in the cell are found in complex with multiple RNA-binding proteins. These proteins are important in regulating the fate of their target mRNAs. Staufen proteins are double-stranded RNA-binding proteins implicated in many cellular functions including mRNA localization and mRNA decay. To date, little is known about the RNA targets of mammalian Staufen proteins. Here, we have characterized the mRNA content of Staufen mRNPs from human 293T cells. This was done by combining the immunopurification of several different Staufen-containing complexes to the probing of DNA microarrays to uncover the identity of the associated mRNAs. We have found that Stau1^{55} , Stau2^{59} and Stau2^{62} are all associated with different subsets of mRNAs, but that a certain proportion of these transcripts are common to the three proteins. These populations are distinct from that associated with FMRP, although some mRNAs overlap. This observation is in accordance with a proposed model of post-transcriptional gene regulation in which different RNA-binding proteins define distinct populations of mRNPs that, nevertheless share common mRNAs.

4.3.2 Introduction

The regulation of gene expression at the post-transcriptional level is a mechanism widely used by cells in order to control protein synthesis with acute precision. In the majority of cases a sequence or a structure in the mRNA (*cis* element) is recognized by one or more proteins (*trans* factors) that assemble together in mRNPs and mediate an effect on mRNA metabolism. This interaction scheme has been shown to be involved in the intracellular localization of mRNA (Bashirullah et al., 1998), in translational activation (Vagner et al., 2001) or repression (Chekulaeva et al., 2006) and also in mRNA stabilization and decay (Brennan & Steitz, 2001; Chen et al., 2001). Many RNA binding proteins that are *trans* factors can each associate to more than one mRNA species in the cell and it has been postulated that the networks of mRNAs bound by these proteins can serve as post-transcriptional operons (Keene & Tenenbaum, 2002).

Staufen is an RNA-binding protein first discovered in *Drosophila* where it plays a role in oocyte patterning by localizing oskar and bicoid transcripts to the posterior and anterior poles, respectively (Riechmann & Ephrussi, 2001). Staufen is also implicated in the translational derepression of oskar once localized at the posterior pole (Micklem et al., 2000). There are two mammalian homologs of Staufen termed Stau1 and Stau2 and they both possess four copies of the double stranded RNA-binding domain (dsRBD). Stau1 is found to be mainly associated to tubulo-vesicular structures in the cell by microscopy and also found to co-fractionate with ribosomes and rough endoplasmic reticulum (RER) in

sucrose gradient. (Wickham et al., 1999; Duchaine et al., 2002). Both genes produce multiple isoforms that are generated by alternative splicing. Stau1 and Stau2 are also involved in mRNA transport along the microtubule tracts in neuronal dendrites (Kohrmann et al., 1999; Tang et al., 2001; Duchaine et al., 2002; Kanai et al., 2004). More recently Stau1 was identified as a central component of a new mRNA decay mechanism termed Staufen-mediated decay (SMD) (Kim et al., 2005). In addition to functions in RNA localization and decay, Stau1 can also stimulate translation of repressed messengers containing structured RNA elements in their 5'UTR (Dugre-Brisson et al., 2005).

To date, little is known about the RNA content of Staufen mRNPs and the present work was undertaken in an effort to identify the various mRNAs that are associated with Stau1 and Stau2 in mammalian cells. The use of microarrays to identify mRNA subsets associated to RNA-binding proteins is a proven approach that was successfully applied in many studies. This technique termed RIP-Chip has been helpful to uncover the identity of FMRP (Brown et al., 2001), YB-1 (Evdokimova et al., 2006) and SLBP (Townley-Tilson et al., 2006) co-purifying RNAs.

Here we report the first high throughput identification of Staufen associated mRNAs in human 293 cells. HA-tagged version of Stau1⁵⁵, Stau2⁵⁹ and Stau2⁶² were transfected in 293 cells. After immunopurification, the RNA content of Staufen mRNPs was isolated and used to hybridize Affymetrix human gene chips. Hybridizations identified about 2000 probe sets with each IPed mRNPs. Most of them are unique for a Stau gene or

isoform, although about 20% are common to all mRNPs. The most highly enriched mRNAs were classified according to their cellular functions. The biological relevance of these observations will be further discussed.

4.3.3 Experimental procedures

4.3.3.1 Immunopurifications

293 cells were propagated in DMEM medium supplemented with 10% cosmic calf serum. 3×10^6 cells were plated in 150 mm Petri dishes and transfections were performed 24 hours after plating. Cells were transfected with one of the following plasmids: Stau1-HA₃ (Duchaine et al., 2000), Stau2⁵⁹-HA₃ or Stau2⁶²-HA₃ (Elvira et al., 2006) using calcium-phosphate co-precipitate technique. Mock cells transfected with untagged expressing vectors or the vector alone were used for control. Cells were collected and lysed 48 hours after transfection. Immunopurification, using anti-HA antibody, was performed as previously described (Duchaine et al., 2000) except that *E. coli* tRNA (Sigma-Aldrich) was added to a final concentration of 200 µg/mL during the incubation with Protein-A-Sepharose (GE healthcare). After extensive washing the resin was incubated 5 min at 95°C in 1X Laemmli buffer. 1/10 of the eluate was kept for Western blot analysis; the remaining of the sample was used for RNA extraction.

4.3.3.2 Microarray analysis

RNA was extracted with Trizol reagent (Invitrogen). RNA pellet was solubilized in water and residual contaminants were removed using RNA nanoprep column (Stratagene). Biotinylated-cRNA probes were synthesized by the two-cycle target labeling assay following Affymetrix procedure. Affymetrix Human genome arrays (HG-U133_Plus_2 :comprising 52,245 probe sets that correspond to 29,555 unique genes) were used for hybridization accordingly to Affymetrix guidelines. Hybridized chips were scanned using an Affymetrix GeneChip 3000 Scanner. Results were recorded using the GeneChip Operating Software (GCOS) platform, which includes the GeneChip Scanner 3000 high-resolution scanning patch that enables feature extraction (Affymetrix). Notably, the Affymetrix Gene Expression Assay identifies changes that are greater than 2-fold with 98% accuracy (Wodicka et al., 1997).

To identify mRNAs that specifically co-purify with Stau1⁵⁵-HA, Stau2⁵⁹-HA and Stau2⁶²-HA, signal intensities obtained for specific IPs were compared to the baseline signal intensities of control IPs using statistical analysis on mean-scale normalized MAS5 data with a p value limit of 0.05. The same methodology was used to compare microarrays hybridized with cRNAs synthesized from specific IPs to cRNAs synthesized from total RNA content of 293 cells. Each probe set presenting a fold enrichment over control of more than 2.5 was scored as a potential Stau associated mRNA. Only the probe sets showing a difference of more than 200 arbitrary units of intensity between the IP and

control were kept for further analysis. Complete microarray analysis results can be found in (Supplemental data).

4.3.4 Results

4.3.4.1 Stau1 and Stau2 co-purify with RNA

In order to isolate Staufen containing mRNPs 293 cells were transfected with plasmids expressing HA-tagged version of Stau1⁵⁵, Stau2⁵⁹ and Stau2⁶². Immunoprecipitations were performed with a monoclonal anti-HA antibody. Western blot analysis showed that a single band corresponding to each Staufen expressing construct was detected after IP (Figure 1A). To address if RNA was co-purifying with Stau1 and Stau2, RNA was isolated from the IPs and visualized using RNA pico chips (Figure 1B). As expected control IPs showed very low amount of co-purifying RNA (Figure 1B-1). While mainly two peaks corresponding to 18S and 28S ribosomal RNA were seen from 293 cells total RNA (Figure 1B-2). A clear enrichment of mRNA over ribosomal RNA was observed in samples of IPed Staufen-containing RNPs (Compare Figure 1B-3, -4 and -5 to 1B-2). These data showed that the IP protocol is very specific and that subpopulation of RNA co-IP with Staufen.

4.3.4.2 Microarray analysis of Staufen associated mRNAs

We took advantage of commercially available human DNA oligonucleotide microarrays from Affymetrix to identify en bloc Stau1 and Stau2 associated mRNAs.

Microarrays were hybridized with either: 1-RNA isolated from IPed RNPs 2-RNA from control IPs 3-total RNA from 293 cells. First, arrays hybridized with cRNA probes synthesized from 293 cells total RNA showed that 19491 probe sets (37.3% of total probe sets) corresponding to 12188 unique genes can be detected in these cells. Then, in order to identify Stau1⁵⁵-HA associated mRNAs, four independent IPs were performed and hybridizations were compared to control IPs. Hybridization results showed that the signals for 1607 probe sets were enriched by more than 2.5 fold over control IP. Four arrays were also used to detect Stau2 associated mRNAs: two for Stau2⁵⁹-HA and two for Stau2⁶²-HA. 2357 and 2008 probe sets were detected in association with Stau2⁵⁹-HA and Stau2⁶²-HA, respectively. We also compared the enrichment of these probe sets against their relative expression level in 293 cells total RNA. From the 1607 probe sets enriched in Stau1⁵⁵-HA IPs, 307 were also enriched compared to the total RNA expression data. Similarly, 794 probe sets out of the 2357 associated with Stau2⁵⁹-HA and 659 probe sets out of the 2008 associated with Stau2⁶²-HA displayed at least a 2.5 fold enrichment over total RNA expression profile. Results are plotted on Venn diagrams (Figure 2).

It has previously been reported that, at least in neurons, Stau1 and Stau2 can be part of distinct mRNPs (Duchaine et al., 2002) suggesting that different mRNA subpopulations are bound by Stau1 and Stau2. In accordance with this observation, 54% (875 probe sets) of Stau1-HA associated mRNAs are not enriched in Stau2 IPs. Similarly, 75% (2295 probe sets) of combined Stau2⁵⁹ and Stau2⁶² associated mRNAs are not enriched in Stau1-HA IPs.

Conversely, there is a certain proportion of mRNAs that are common to both Stau1 and Stau2. Genes represented by 385 probe sets are all enriched in Stau1⁵⁵-HA, Stau2⁵⁹-HA and Stau2⁶²-HA associated mRNAs.

4.3.4.3 Highly enriched mRNAs are involved in diverse cellular functions

We next tried to identify the putative mRNA targets with the best affinity for Stau1 and Stau2. To do so, we analyzed more closely the 150 probe sets showing the highest fold enrichment in Stau1⁵⁵-HA, Stau2⁵⁹-HA and Stau2⁶²-HA statistical microarray analysis. From these 450 probe sets, all hypothetical and non annotated genes were removed. This selection left 61 probe sets for Stau1⁵⁵-HA, 71 probe sets for Stau2⁵⁹-HA and 66 probe sets for Stau2⁶²-HA. 142 unique genes are represented by these 198 probe sets. After assigning a cellular function to each probe set, genes were classified accordingly (Table 1).

All genes were included into thirteen categories. Roughly half of the genes fell into three groups: metabolic enzymes and related proteins (22 mRNAs), signal transduction effectors (26 mRNAs) and transcription regulators (24 mRNAs). Another interesting category contains 10 mRNAs classified as playing a role in cell adhesion, motility and organization. This suggests that Stau1 could somehow be implicated in cell anchoring or motility by binding and localizing these transcripts. This is not unprecedented as β -actin (Farina et al., 2003; Oleynikov & Singer, 2003) and Arc (Steward et al., 1998; Martin,

2001) mRNAs which are involved in cellular reorganization are both transported and localized at precise sites in the cell via RNA transport mRNPs.

4.3.5 Discussion

Statistical analysis on mean-scale normalized MAS5 data was chosen over classic MAS5 analysis for additional stringency in order to correct for large variations between replicate chip hybridizations. In respect to this approach, some previously identified Stau1-associated mRNAs (Kim et al., 2005) were lost in this analysis, but the bulk of the genes reported in that previous study are still found to be Staufen co-purifying mRNAs (data not shown).

This study allowed the identification of mRNAs that are included into Staufen-containing mRNPs. In the future, it will be important to determine the nature of the structural recognition elements in the identified mRNAs. In addition, determining the position of the Staufen binding site in a particular mRNA is of primary importance. In fact, it has been demonstrated that if Stau1⁵⁵ is tethered to the 3'UTR of a reporter messenger it induces its decay by SMD (Kim et al., 2005). Yet another study showed that tethering Stau1⁵⁵ to a reporter mRNA bearing the Arf1 SBS in its 5'UTR region induces an increase in translational rate of the reporter and a shift of the reporter from monosomes to translating polysomes (Dugre-Brisson et al., 2005). Unfortunately, given the nature of Staufen-binding sites there is no high throughput technique available to assess where Staufen binds in a given group of mRNAs. This is mainly because Staufen binding sites are

not well characterized and also because the search for structured elements is more challenging than the search for a consensus sequence in an RNA population. So in investigating this matter, one should consider doing gene by gene approach. In that respect, the classification presented here of Staufen associated mRNAs in functional subclasses will be helpful in orienting further studies.

Some highly enriched mRNAs of special interest taken from Table 1 are presented below and the potential roles of Staufen in their posttranscriptional regulation are proposed. Among the enriched mRNAs with Stau2⁵⁹ there is eIF5A2. The function of eIF5A in translation is not well understood (Zanelli et al., 2006), but recent work in yeast showed that a temperature sensitive mutant of the related protein eIF5A1 causes specifically an increase in the stability of PTC (premature termination codon) containing mRNAs (Schrader et al., 2006). There are five major splice variants of human eIF5A2 mRNA with different 3'UTRs (Clement et al., 2006). Some of these mRNAs exhibit short half lives and Stau2 could be involved in eIF5A2 transcript specific stabilization or destabilization.

Another interesting mRNA is the bicistronic GDF1/LASS1 transcript that is enriched with Stau1⁵⁵-HA. GDF1 is a member of the transforming growth factor β (TGF- β) superfamily and is expressed from the second open reading frame (orf) of the 3 kb transcript (Lee, 1991). Stau1 could possibly be implicated in translational regulation of this mRNA by promoting translation of the GDF1 orf.

Yet another transcript of interest is the histone H2AV that encodes the histone H2A variant Z. H2A.Z mRNA is enriched in both Stau1 and Stau2 immunopurified complexes. H2A.Z is a replacement histone and its expression is cell cycle independent (Wunsch et al., 1991). Another particularity is that compared to other histone mRNAs H2A.Z contains a poly-A tail and so is not subjected to the 3' end processing undergone by cell-cycle dependent histones. Notably, the sequence conservation between mammalian H2A.Z mRNAs is higher in the 3'UTR portion than in the coding region suggesting a role for the 3'UTR sequence in regulating H2A.Z posttranscriptional regulation (Hatch & Bonner, 1988). Staufen is maybe substituting in a way to SLBP (Stem loop binding protein) function by binding to H2A.Z 3'UTR.

Our data indicate that there is an overlap between Stau1 and Stau2 associated mRNAs. We decided to look if there is also an overlap with other known mRNA populations associated to other RNA-binding proteins. FMRP (Fragile X mental retardation protein) is the product of the *Fmr1* gene. Absence or mutation of FMRP causes the Fragile X syndrome an X-linked form of mental retardation. It has been shown that FMRP is involved in translational repression and in synaptic plasticity (Zalfa et al., 2006). It was reported that FMRP co-purifies with at least 432 different mRNAs following immunoprecipitation from mouse brain extracts (Brown et al., 2001). FRMP is also found in complex with Stau1 (Brendel et al., 2004; Villace et al., 2004), which suggest that there could be a common set of target mRNAs for both proteins. In order to test this possibility we compared the 432 mRNAs previously identified as potential FMRP targets with the

Stau1⁵⁵-HA associated mRNA population identified in the present study. In their previous work, Brown and colleagues used Affymetrix mouse genome MG_U74 chips to uncover the identity of FMRP bound mRNAs. To be able to compare datasets between mouse and human gene chips, we first performed a search for probe sets corresponding to the human orthologs of mouse probe sets. This was done using the NetAffx Analysis Center tools that are available on Affymetrix website (www.affymetrix.com). From the 432 probe sets corresponding to FMRP associated mRNAs, 375 probe sets possess a human ortholog. These 375 probe sets represent 355 unique genes. Human U133 gene chip contains 1363 probe sets that represent the orthologs of the 375 mouse probe sets. Of these 1363 probe sets, 58 (4.3%) are enriched in Stau1⁵⁵-HA purification. These 58 probe sets represent 52 unique genes which leads to the conclusion that approximately 15% (52/355) of FMRP associated mRNAs are also enriched in Stau1⁵⁵-HA purification. Table 2 shows the identity of these common mRNAs.

This observation that a subgroup of Stau1⁵⁵-HA co-purifying mRNAs contains mRNAs that were shown to be also associated with FMRP is in agreement with a model of post-transcriptional gene regulation in which the protein content of mRNPs is diverse and dynamic and that it is the combinations of RNA-binding proteins found on a particular mRNA that ultimately direct its fate. Unfortunately, it is hard to gain a global picture of the relationships that exist between the RNA content of different mRNPs that were characterized using RIP-chip approach. This is due to the fact that comparisons are almost impossible to make between datasets available in the literature. Variability arises from

multiple factors: 1- diversity of array platforms used 2-tissue or cell type used as starting material 3-the developmental stage at which the experiment was conducted and 4-the species that were used to study mRNA content of mRNPs.

Finally, in our classification of the highly enriched mRNAs, we have sorted genes in 13 categories; almost all these genes play functions in the control of cell growth and in cellular integration of extracellular signals. There are also a certain number of translational factors. All in all, we have for the first time showed, by an unbiased approach, that Stau1 and Stau2 associates with different subsets of mRNAs in the cell and that there are even differences in affinity between Stau2⁵⁹ and Stau2⁶².

4.3.6 Acknowledgements

We thank the Genome Quebec Innovation Centre, in particular Rob Sladek and André Ponton, for microarray screening and analysis. We also thank Kirill Tarassov for comments on the manuscript. This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to L.D.G. L.F. was supported by scholarships from Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) and NSERC.

4.3.7 References

Bashirullah A, Cooperstock RL, Lipshitz HD. 1998. RNA localization in development. *Annu Rev Biochem* 67:335-394.

- Brendel C, Rehbein M, Kreienkamp HJ, Buck F, Richter D, Kindler S. 2004. Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem J* 384:239-246.
- Brennan CM, Steitz JA. 2001. HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci* 58:266-277.
- Brown V, Jin P, Ceman S, Darnell JC, O'Donnell WT, Tenenbaum SA, Jin X, Feng Y, Wilkinson KD, Keene JD, Darnell RB, Warren ST. 2001. Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell* 107:477-487.
- Chekulaeva M, Hentze MW, Ephrussi A. 2006. Bruno acts as a dual repressor of oskar translation, promoting mRNA oligomerization and formation of silencing particles. *Cell* 124:521-533.
- Chen CY, Gherzi R, Ong SE, Chan EL, Raijmakers R, Pruijn GJ, Stoecklin G, Moroni C, Mann M, Karin M. 2001. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107:451-464.
- Clement PM, Johansson HE, Wolff EC, Park MH. 2006. Differential expression of eIF5A-1 and eIF5A-2 in human cancer cells. *Febs J* 273:1102-1114.
- Duchaine T, Wang HJ, Luo M, Steinberg SV, Nabi IR, DesGroseillers L. 2000. A novel murine Staufen isoform modulates the RNA content of Staufen complexes. *Mol Cell Biol* 20:5592-5601.

- Duchaine TF, Hemraj I, Furic L, Deitinghoff A, Kiebler MA, DesGroseillers L. 2002. Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J Cell Sci* 115:3285-3295.
- Dugre-Brisson S, Elvira G, Boulay K, Chatel-Chaix L, Mouland AJ, DesGroseillers L. 2005. Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res* 33:4797-4812.
- Elvira G, Massie B, DesGroseillers L. 2006. The zinc-finger protein ZFR is critical for Staufen 2 isoform specific nucleocytoplasmic shuttling in neurons. *J Neurochem* 96:105-117.
- Evdokimova V, Ruzanov P, Anglesio MS, Sorokin AV, Ovchinnikov LP, Buckley J, Triche TJ, Sonenberg N, Sorensen PH. 2006. Akt-mediated YB-1 phosphorylation activates translation of silent mRNA species. *Mol Cell Biol* 26:277-292.
- Farina KL, Huttelmaier S, Musunuru K, Darnell R, Singer RH. 2003. Two ZBP1 KH domains facilitate beta-actin mRNA localization, granule formation, and cytoskeletal attachment. *J Cell Biol* 160:77-87.
- Hatch CL, Bonner WM. 1988. Sequence of cDNAs for mammalian H2A.Z, an evolutionarily diverged but highly conserved basal histone H2A isoprotein species. *Nucleic Acids Res* 16:1113-1124.
- Kanai Y, Dohmae N, Hirokawa N. 2004. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 43:513-525.

- Keene JD, Tenenbaum SA. 2002. Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. *Mol Cell* 9:1161-1167.
- Kim YK, Furic L, Desgroseillers L, Maquat LE. 2005. Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* 120:195-208.
- Kohrmann M, Luo M, Kaether C, DesGroseillers L, Dotti CG, Kiebler MA. 1999. Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol Biol Cell* 10:2945-2953.
- Lee SJ. 1991. Expression of growth/differentiation factor 1 in the nervous system: conservation of a bicistronic structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:4250-4254.
- Martin KC. 2001. Arc mRNA dynamics: return to sender--the NMDA receptor provides the targeting address for Arc mRNA. *Trends Neurosci* 24:621-623.
- Micklem DR, Adams J, Grunert S, St Johnston D. 2000. Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. *Embo J* 19:1366-1377.
- Oleynikov Y, Singer RH. 2003. Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization. *Curr Biol* 13:199-207.
- Riechmann V, Ephrussi A. 2001. Axis formation during *Drosophila* oogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 11:374-383.

- Schrader R, Young C, Koziar D, Hoffmann R, Lottspeich F. 2006. Temperature sensitive eIF5A mutant accumulates transcripts targeted to the nonsense mediated decay pathway. *J Biol Chem*.
- Steward O, Wallace CS, Lyford GL, Worley PF. 1998. Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* 21:741-751.
- Tang SJ, Meulemans D, Vazquez L, Colaco N, Schuman E. 2001. A role for a rat homolog of stauferin in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron* 32:463-475.
- Townley-Tilson WH, Pendergrass SA, Marzluff WF, Whitfield ML. 2006. Genome-wide analysis of mRNAs bound to the histone stem-loop binding protein. *Rna* 12:1853-1867.
- Vagner S, Galy B, Pyronnet S. 2001. Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Rep* 2:893-898.
- Villace P, Marion RM, Ortin J. 2004. The composition of Staufin-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 32:2411-2420.
- Wickham L, Duchaine T, Luo M, Nabi IR, DesGroseillers L. 1999. Mammalian staufin is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 19:2220-2230.

- Wodicka L, Dong H, Mittmann M, Ho MH, Lockhart DJ. 1997. Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* 15:1359-1367.
- Wunsch AM, Reinhardt K, Lough J. 1991. Normal transitions in synthesis of replacement histones H2A.Z and H3.3 during differentiation of dystrophic myotube cells. A brief note. *Mech Ageing Dev* 59:299-305.
- Zalfa F, Achsel T, Bagni C. 2006. mRNPs, polysomes or granules: FMRP in neuronal protein synthesis. *Curr Opin Neurobiol* 16:265-269.
- Zanelli CF, Maragno AL, Gregio AP, Komili S, Pandolfi JR, Mestriner CA, Lustrri WR, Valentini SR. 2006. eIF5A binds to translational machinery components and affects translation in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 348:1358-1366.

4.3.8 Figure Legends

Figure 1. Stau1 and Stau2 co-purify with RNA. (A) IP of HA-tagged Staufen constructs. 293 cells were transiently transfected with either one of the following plasmids expressing HA-tagged version of Stau1⁵⁵, Stau2⁵⁹, Stau2⁶² or mock transfected to control for nonspecific IP. Two days later, cells were lysed, a fraction of cell lysates was immunopurified using a mouse monoclonal α -HA antibody, and Stau1 (lane 1), Stau2⁵⁹ (lane 2) and Stau2⁶² (lane 3) were identified after IP using Western blotting and a rabbit polyclonal α -HA antibody. Lane 4 corresponds to the IP of mock transfected cells. (B) Analysis of the RNA content of Staufen IPs. RNA was extracted from the previously

described IPs (A). Total RNA was also extracted from 293 cells. RNA samples were run on a Bioanalyser RNA pico chip (Agilent). Migration profile of 293 cells total RNA sample shows mainly two peaks (B-2) corresponding to 18S and 28S ribosomal RNAs. Note that Bioanalyser profiles are not all plotted on the same absorbance scale.

Figure 2. Venn diagrams summarizing microarray analysis results. The RNA content isolated from each Staufen IP (Figure 1) was used to synthesize cRNA probes in order to hybridize Affymetrix HG_U133_plus_2 microarrays. (A) Number of probe sets showing an enrichment of at least 2.5 fold over the control IPs. (B) Number of probe sets that are both enriched over negative control IPs and total RNA relative expression data.

4.3.9 Figures

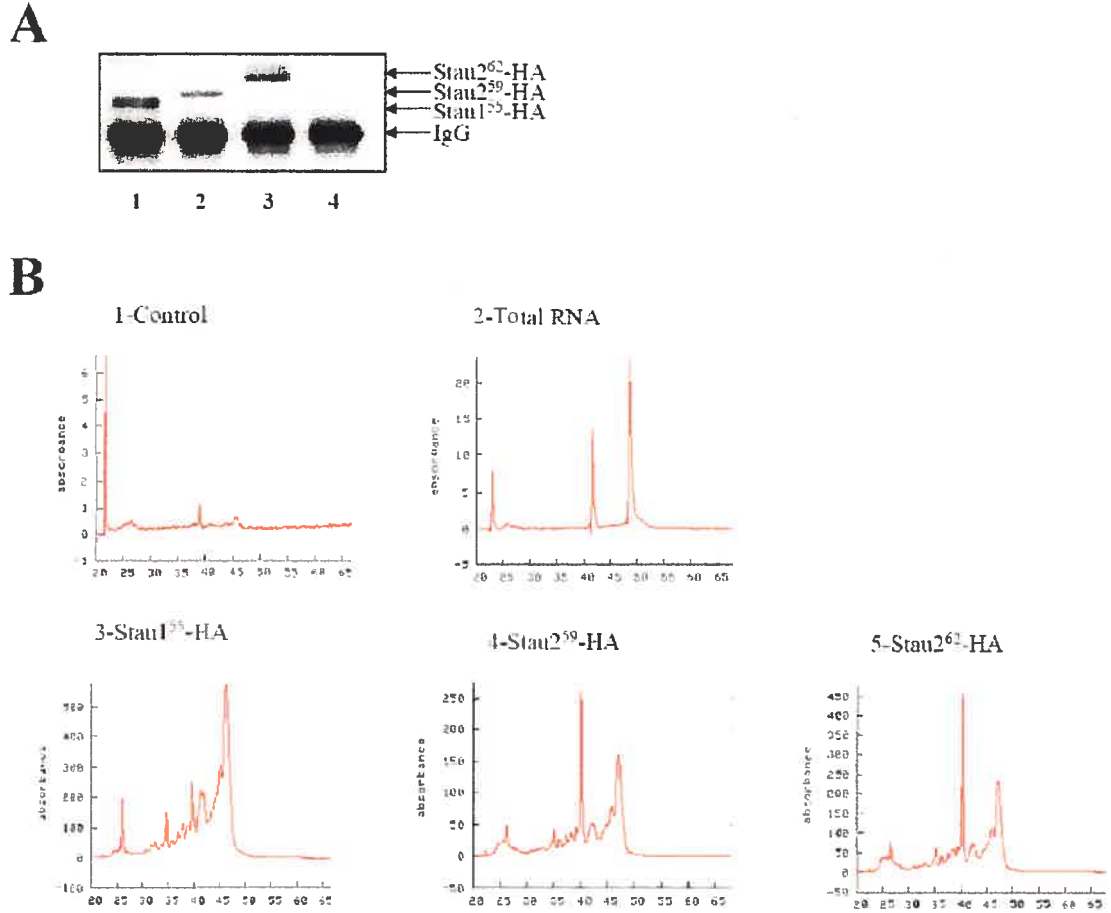


Figure 1 : Stau1 and Stau2 co-purify with RNA

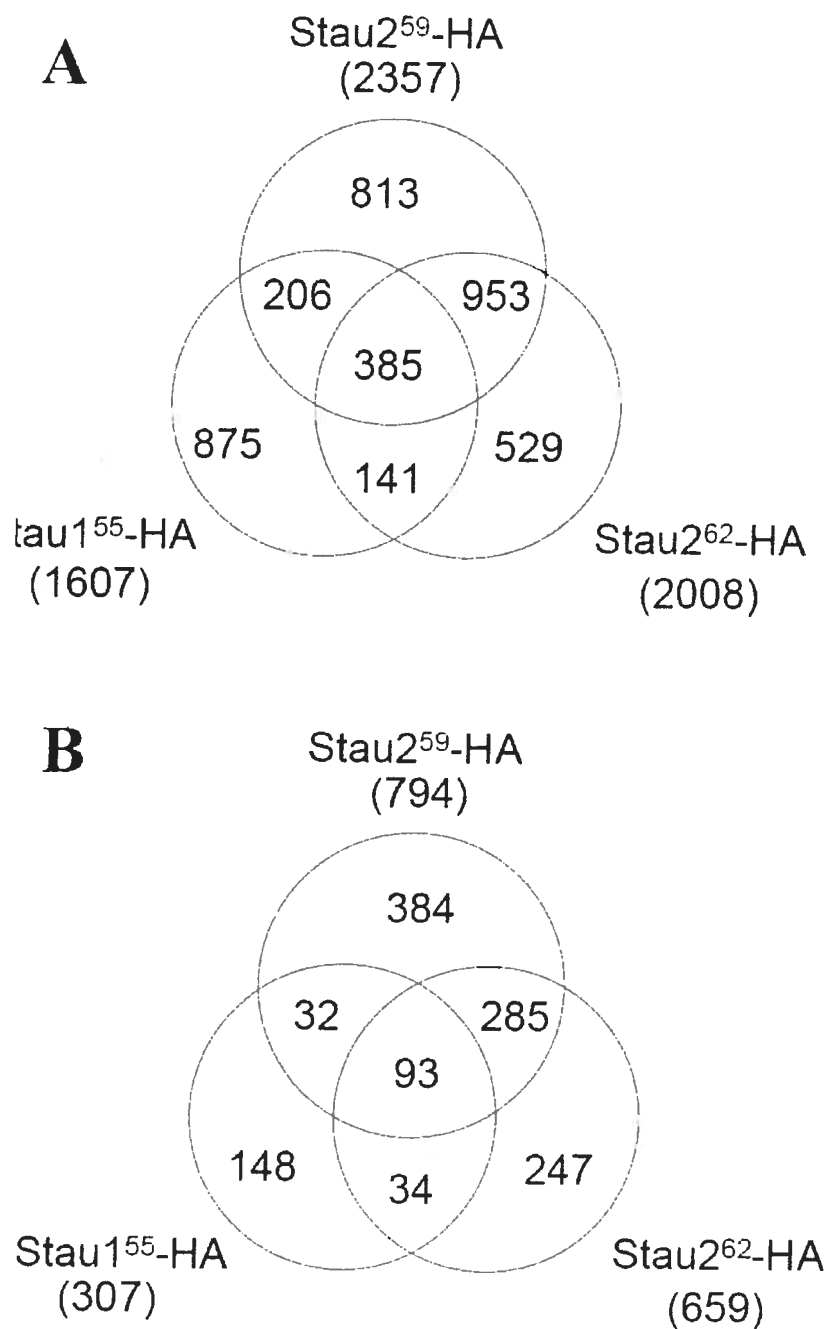


Figure 2: Venn diagrams summarizing microarray analysis results

Table 1: Staufen associated mRNAs displaying the highest fold enrichment over control are classified by cellular functions

Cellular functions	St1	St259	St262	Cellular functions	St1	St259	St262
Acrosome formation				Metabolism (continued)			
CASC5 cancer susceptibility candidate 5	x	x	x	DPYD dihydropyrimidine dehydrogenase			x
Cell adhesion, motility and organization				GDPD1 glycerophosphodiester phosphodiesterase 1	x		
COL18A1 Collagen type XVIII alpha 1	x			GLS Glutaminase			x
COL2A1 collagen, type II, alpha 1	x			GNPNAT1 glutamine-phosphate N-acetyltransferase 1			x
CRTAP cartilage associated protein	x			GSTCD glutathione S transferase, C-terminal domain			x
GJA7 Gap junction protein, alpha 7, -45kDa (connexin 45)	x	x	x	LETMD1 LETM1 domain containing 1	x		
GPC3 glypican 3		x	x	MAN2A1 Mannosidase alpha, class 2A, member 1			x
INADL InaD-like (Drosophila)	x			PCBD2 pterin-4 alpha-carbinolamine dehydratase	x		
IPP Intracisternal A particle promoted polypeptide	x	x	x	PDP2 Pyruvate dehydrogenase phosphatase isoenzyme 2	x		
ITGA6 integrin, alpha 6	x			PNPO pyridoxine 5-phosphate oxidase	x		
SVIL Supervillin				PSPH phosphoserine phosphatase	x		
WIRE WIRE protein				PTGIS prostaglandin I2 (prostaglycine) synthase	x		
Cell growth and differentiation				TDH L-threonine dehydrogenase	x		x
CHRD1 chordin-like 1		x	x	TMEM118 Transmembrane protein 118	x		x
EMP2 epithelial membrane protein 2		x	x	TMLHE Imine/lysine hydroxylase, epsilon			x
GDF1 growth differentiation factor 1	x			Progression through cell cycle			
IL17RB Interleukin 17 receptor B			x	ANAPC10 anaphase promoting complex subunit 10			x
LZIC Leucine zipper and CTNBP1 domain containing	x			APBA2BP Amyloid beta (A4) precursor protein-binding	x		
MTFR1 Mitochondrial fission regulator 1		x	x	CCNI Cyclin I			x
DNA: binding, repair, replication				FQSB FBX murine osteosarcoma viral oncogene homolog B			x
ATXN3 Ataxin 3				RAD1 RAD1 homolog (S. pombe)	x		
H2AFV H2A histone family, member V	x	x	x	SFN stratifin			x
MBO6 methyl-CpG binding domain protein 6		x	x	Protein biosynthesis, degradation and folding			
POLH polymerase (DNA directed), eta	x	x	x	AGTBP1 ATP/GTP binding protein 1			x
TMEM137 transmembrane protein 137			x	ATG10 ATG10 autophagy related 10 homolog(S cerevisiae)			x
Exocytosis				CYLD cylindromatosis (turban tumor syndrome)			x
EXOC6 Exocyst complex component 6	x			EIF5A2 eukaryotic translation initiation factor 5A2			x
RIMS3 regulating synaptic membrane exocytosis 3		x	x	FBXL4 F-box and leucine-rich repeat protein 4			x
SEC15L2 SEC15-like 2 (S. cerevisiae)		x	x	FNBP1 Fomrin binding protein 1			x
Immune response				LMANI lectin mannose-binding, 1			x
HLA-DQB1 major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1		x	x	MRPL19 Mitochondrial ribosomal protein L19			x
TIRAP Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain				MRPS16 mitochondrial ribosomal protein S16			x
Metabolism				PSMB2 Proteasome (prosome, macropain) subunit beta 2			x
ACOX1 acyl Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	x			RPL13 Ribosomal protein L13			x
ALG10 asparagine-linked glycosylation 10 homolog		x	x	RPL15 Ribosomal protein L15			x
AVTL1 acyltransferase like 1		x	x	UBA2 SUMO-1 activating enzyme subunit 2			x
BCKDHB Branched chain keto acid dehydrogenase E1		x	x	RNA processing			
CA5B carbonic anhydrase VB, mitochondrial		x	x	CPEB3 Cytoplasmic polyadenylation element binding 3			x
CKMT1A Creatine kinase, mitochondrial 1A		x	x	EXOSC2 Exosome component 2			x
DCAKD Diphospho-CoA kinase domain containing	x			HNRPM Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M			x

Table 2: mRNAs that are associated with both Stau1⁵⁵-HA (this study) and FRMP (Brown et al., 2001)

St1(55)-HA associated mRNAs	HG_U133	MG_U74v2	FMRP associated mRNAs
tyrosine kinase, non-receptor, 2	203839_s_at	102850_AT	tyrosine kinase, non-receptor, 2
adenylate cyclase 1 (brain)	213245_at	116691_AT	adenylate cyclase 1
ATPase, Class VI, type 11A	230875_s_at	103899_AT	ATPase, class VI, type 11A
chondroitin polymerizing factor	202175_at	97387_AT	DNA segment, Chr 1, Brigham & Women's
DIP2 disco-interacting protein 2 homolog A (Drosophila)	1552677_a_at	114468_AT	DIP2 disco-interacting protein 2 homolog A
chromosome 6 open reading frame 107	226135_at	103773_AT	RIKEN cDNA F830021D11 gene
ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 2	212760_at	111342_AT	ubiquitin protein ligase E3 component n-rec
chromosome 9 open reading frame 10	1555908_at	95488_AT	cDNA sequence BC010304
dipeptidyl-peptidase 9	230018_at	114469_AT	dipeptidylpeptidase 9
chromosome 15 open reading frame 39	215087_at	104389_AT	RIKEN cDNA 1700017B05 gene /// hypoth
dymeclin	223171_at	99988_AT	dymeclin
exostoses (multiple)-like 1	206329_at	115969_AT	exostoses (multiple)-like 1
glucocorticoid receptor DNA binding factor 1	229394_s_at	96208_AT	glucocorticoid receptor DNA binding factor
guanine nucleotide binding protein (G protein) alpha 1	221737_at	97226_AT	guanine nucleotide binding protein, alpha 1
ZXD family zinc finger C	230209_at	117039_AT	ZXD family zinc finger C
ZXD family zinc finger C	234991_at	117039_AT	ZXD family zinc finger C
zinc finger protein 42 (myeloid-specific retinoic acid-re	40569_at	94101_AT	zinc finger protein 98
WW, C2 and coiled-coil domain containing 1	241950_at	96518_AT	WW, C2 and coiled-coil domain containing
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 3	244015_at	96850_AT	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 3	243149_at	96850_AT	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma
AP1 gamma subunit binding protein 1	239678_at	133560_AT	AP1 gamma subunit binding protein 1
Spectrin domain with coiled-coils 1	240765_at	102942_AT	spectrin domain with coiled-coils 1
Cdk5 and Abl enzyme substrate 1	225531_at	117085_AT	Cdk5 and Abl enzyme substrate 1
AT rich interactive domain 2 (ARID, RFX-like)	225486_at	103079_AT	AT rich interactive domain 2 (Arid-rfx like)
hypothetical protein DKFZp761I2123	54970_at	102271_AT	DNA segment, Chr 11, Brigham & Women's
Sterile alpha motif domain containing 4B	227511_at	100889_AT	sterile alpha motif domain containing 4B
leucine rich repeat neuronal 6A	227933_at	139527_AT	leucine rich repeat neuronal 6A
KIAA0515	212068_s_at	107033_AT	RIKEN cDNA 5830434P21 gene
KIAA0515	212069_s_at	107033_AT	RIKEN cDNA 5830434P21 gene
TBC1 domain family, member 16	222116_s_at	110258_AT	TBC1 domain family, member 16
TBC1 domain family, member 16	228488_at	110258_AT	TBC1 domain family, member 16
jun D proto-oncogene	203752_s_at	102364_AT	Jun proto-oncogene related gene d1
KIAA0226	212735_at	111540_AT	RIKEN cDNA 1700021K19 gene
KIAA0284	213242_x_at	131216_F_AT	expressed sequence AW555464
KIAA0317	202128_at	109944_AT	RIKEN cDNA 1110018G07 gene
ATM/ATR-Substrate Chk2-Interacting Zn2+-finger pro	201854_s_at	130730_F_AT	cDNA sequence BC060631
kelch-like 21 (Drosophila)	203066_at	104293_AT	kelch-like 21 (Drosophila)
SET domain containing 1B	213153_at	129315_AT	SET domain containing 1B
TBC1 domain family, member 24	227908_at	97710_F_AT	TBC1 domain family, member 24
latrophilin 1	203488_at	112497_AT	latrophilin 1
latrophilin 1	219145_at	112497_AT	latrophilin 1
MCM3 minichromosome maintenance deficient 3 (S	c212269_s_at	97433_AT	minichromosome maintenance deficient 3 (
meningioma (disrupted in balanced translocation) 1	205330_at	110774_AT	meningioma 1
protein phosphatase 1, regulatory subunit 9B, spinoph	225124_at	112345_AT	protein phosphatase 1, regulatory subunit 9
WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2	204022_at	103717_AT	WW domain containing E3 ubiquitin protein
nischarin	227392_at	94236_AT	nischarin
Nuclear factor I/C (CCAAT-binding transcription factor	226895_at	92241_AT	nuclear factor I/C
phosphatidylinositol 4-kinase, catalytic, alpha polypep	207081_s_at	104208_AT	phosphatidylinositol 4-kinase, catalytic, alpi
PH domain and leucine rich repeat protein phosphata	212719_at	109399_AT	PH domain and leucine rich repeat protein
PRP8 pre-mRNA processing factor 8 homolog (S	ceri200000_s_at	98574_AT	pre-mRNA processing factor 8
RAB6 interacting protein 1	212561_at	104108_AT	Rab6 interacting protein 1
ral guanine nucleotide dissociation stimulator	209050_s_at	100530_AT	ral guanine nucleotide dissociation stimulat
synaptotagmin IX	1563658_a_at	107392_AT	synaptotagmin IX
transmembrane protein 1	209412_at	104202_AT	transmembrane protein 1
transmembrane protein 1	1555446_s_at	104202_AT	transmembrane protein 1
ubiquitin specific peptidase 2	229337_at	92820_AT	ubiquitin specific peptidase 2
unc-51-like kinase 1 (C. elegans)	209333_at	102332_AT	Unc-51 like kinase 1 (C. elegans)
zinc finger protein 236	222227_at	115154_AT	zinc finger protein 236

5 Discussion

La découverte d'une interaction directe entre les protéines Stau1 et Upf1 a représenté le point tournant des travaux effectués dans cette thèse. La recherche des ARNm associés à Stau1 et Stau2 avait surtout été entreprise dans l'optique de l'étude de la localisation intracellulaire de l'ARNm. Par contre, la recherche d'un motif consensus d'interaction entre Staufen et l'ARNdb est restée la ligne directrice du projet. Seront discutés dans les prochaines sections les thèmes suivants :

- Les différences fonctionnelles et mécanistiques entre le NMD et le SMD.
- Les structures d'ARNdb liées par Stau1 dans les ARNm Arf1 et STMN3.
- La présentation de modèles de régulation du métabolisme cellulaire par Stau1 et Stau2.

5.1 NMD et SMD : plus qu'une lettre de différence!

L'interaction entre Stau1 et Upf1 a été découverte lors d'un criblage qui a été effectué par double hybride dans le but d'identifier des partenaires protéiques de Upf1. Le fragment de Stau1 ainsi isolé qui est responsable de cette interaction consiste en une portion centrale de Stau1 comprenant le dsRBD4 et le TBD. La région de Upf1 qui interagit avec Stau1 est la même région que celle impliquée dans l'interaction avec Upf2, ce qui suggère qu'il pourrait exister une compétition entre le SMD et le NMD (Kim et Maquat, communication personnelle). Les prochaines sections présenteront les divergences et les similarités entre ces deux mécanismes de dégradation de l'ARNm, ainsi que les questions qui sont toujours sans réponses quant à leurs modes de fonctionnement.

5.1.1 Nécessité du codon non-sens

Le ciblage d'un ARNm vers la voie de dégradation par le NMD ou le SMD est basé sur la présence et la localisation du ou des codon(s) non-sens du transcrit. Pourquoi cette dépendance envers un codon non-sens? La réponse réside dans le fait que le ribosome joue un rôle prépondérant dans le SMD et le NMD. Le laps de temps au cours duquel le ribosome est arrêté sur un codon stop est nécessaire pour qu'il y ait interaction entre les facteurs protéiques impliqués dans le SMD et le NMD. Dans le cas du NMD, un codon stop qui déclenchera la dégradation doit se trouver à environ 50 à 55 nucléotides en amont d'une jonction exon-exon. Il est postulé que lors de la ronde pionnière de traduction, le ribosome enlève les protéines de l'EJC qui servent de marqueurs afin d'identifier les codons de terminaison prématurée. Ceci expliquerait pourquoi les ARNm sont uniquement sensibles au NMD lorsqu'ils subissent cette ronde pionnière de traduction, alors que les protéines de l'EJC sont toujours associées à l'ARNm. Il est important de rappeler que la grande majorité des ARNm ne sont pas dégradés par NMD puisque leur codon de terminaison endogène se retrouve au niveau du dernier exon et qu'il n'y a donc pas d'EJC présent en aval du ribosome lors des événements normaux de terminaison de la traduction.

Le SMD requiert également la présence d'un codon stop pour entraîner la dégradation d'un transcrit, mais n'est pas soumis aux contraintes liées aux événements d'épissage et d'association des protéines de l'EJC. En effet, c'est l'association de Staufen

Figure 1 : Comparaison des mécanismes NMD et SMD.

A. Lors de l'épissage des transcrits primaires, un complexe protéique (EJC, *exon junction complex*) se dépose une vingtaine de nucléotides en amont des jonctions exon-exon (JEE). Si ce complexe composé de plusieurs protéines dont les facteurs Upf3X et Upf2 recrute le facteur Upf1, le NMD sera déclenché. **B. (1)** Les transcrits porteurs de codons non-sens apparus à la suite d'une erreur de transcription sont éliminés par le NMD. Staufen1 n'est pas impliqué dans ce mécanisme. **(2-3)** Le recrutement de Staufen1 au moyen d'une protéine de fusion Staufen1-MS2 (MS2 étant une protéine qui lie une structure spécifique de l'ARN) sur la séquence de reconnaissance MS2 (MBS, *MS2-binding site*) déclenche le SMD si celle-ci est placée en aval du codon normal de terminaison. **(4)** Staufen1, en se liant à une séquence d'ARN (SBS, *Staufen1-binding site*) située en aval du codon de terminaison normal sur le transcrit endogène Arf1 déclenche le SMD. **(5)** Cette séquence est importante puisque sa délétion protège le transcrit Arf1 de la dégradation. **(6)** De même, un transcrit rapporteur auquel a été fusionnée la séquence SBS devient sensible au SMD.

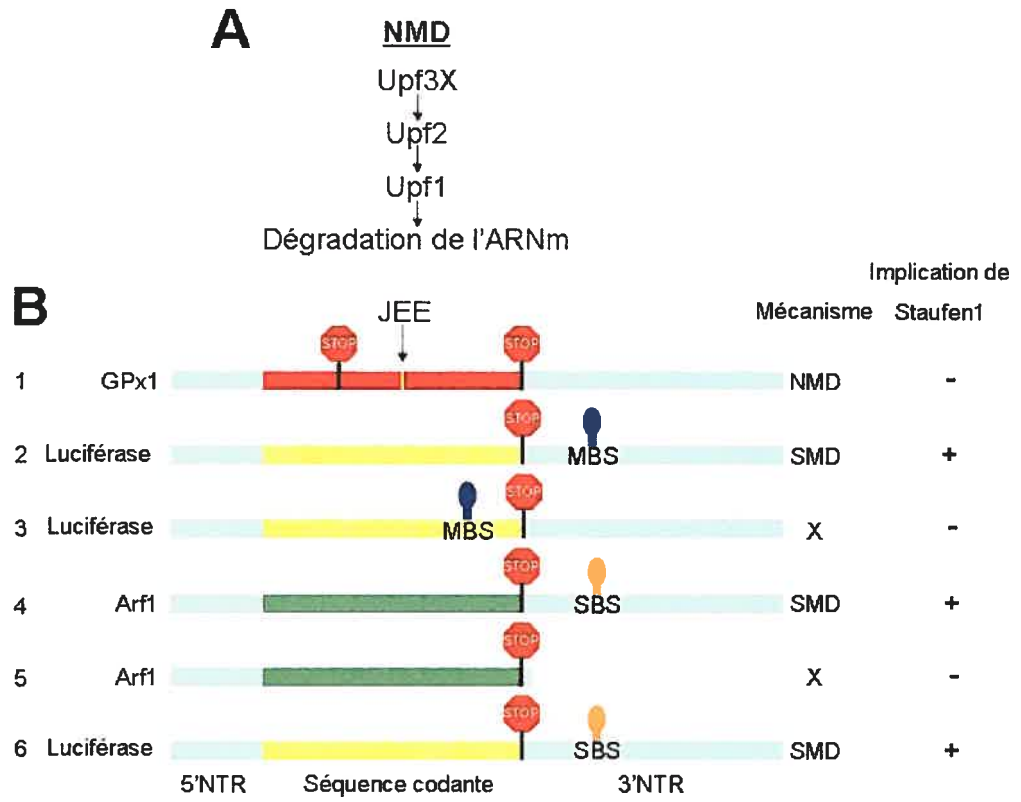


Figure 1 : Comparaison des mécanismes NMD et SMD.

Figure tirée de Furic et DesGroseillers (2005).

Figure 2 : Modèle de fonctionnement du SMD

A. La liaison du complexe Staufen1-Upf1 sur un transcrit peut induire la dégradation de ce transcrit. Le SMD ne requiert pas de jonction exon-exon, ni la présence des facteurs du complexe EJC. *B.* Lorsque le complexe Staufen1/Upf1 se lie en aval d'un codon de terminaison normal au niveau de la région 3'-non traduite (NTR) d'un ARNm, il entraîne la dégradation de celui-ci (flèche noire). *C.* Le SMD pourrait être modulé au niveau de l'association entre Staufen1 et Upf1, de la liaison de Staufen1 à l'ARNm et/ou de la modification post-translationnelle de Staufen1 par des facteurs encore inconnus.

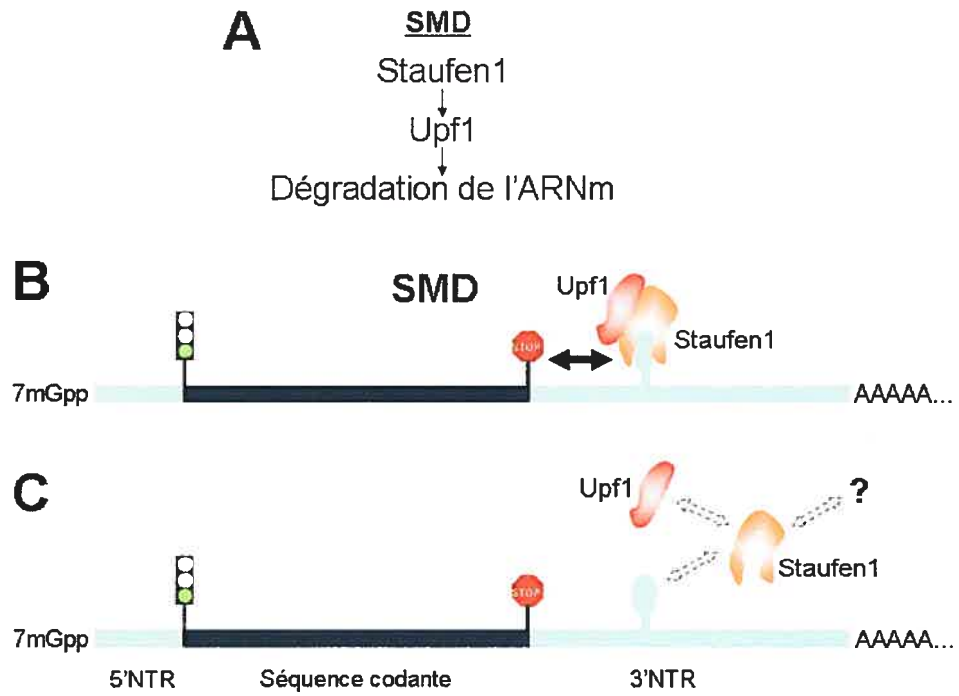


Figure 2 : Modèle de fonctionnement du SMD

Figure tirée de Furic et Desgroseillers (2005).

en aval du codon de terminaison qui dicte si l'ARNm sera dégradé. À l'opposé du NMD, dans le cas du SMD, Staufen n'est pas enlevé du transcrit lors d'une ronde pionnière de traduction. La dégradation induite par Staufen peut donc se faire également lorsque l'ARN est associé à eIF4E (Hosoda et al., 2005). La Figure 1 présente une comparaison du SMD et du NMD en montrant divers types d'ARNm rapporteurs et en indiquant s'ils sont sensibles ou non à l'un de ces deux modes de dégradation.

5.1.2 Mécanisme de dégradation

Il est postulé que puisque le NMD et le SMD font appel au recrutement de Upf1 afin d'entraîner la dégradation des transcrits, les étapes subséquentes au recrutement de Upf1 seraient identiques pour le NMD et le SMD. Par contre, il est possible que des divergences puissent exister entre ces deux modes de dégradation. Chez les mammifères, le modèle actuel expliquant la dégradation par NMD des ARNm qui recrute Upf1 est le suivant :

- 1- Lors de la terminaison de la traduction, un complexe protéique préformé contenant Upf1, la kinase SMG1 et les deux facteurs de relargage, eRF1 et eRF3 s'associe au ribosome (Kashima et al., 2006). Ce complexe est dénommé SURF.

- 2- La phosphorylation de Upf1 par SMG1 s'effectue uniquement si le complexe SURF, via Upf1, interagit avec Upf2 sur un EJC en aval du codon de terminaison (Kashima et al., 2006).
- 3- Upf1 phosphorylé recrute alors les protéines SMG5 et SMG7 (Ohnishi et al., 2003). Il y a ensuite localisation du transcrit vers les « *P-bodies* » et dégradation subséquente (Unterholzner et Izaurralde, 2004).

Tel que mentionné précédemment, pour que Upf1 soit phosphorylé par SMG1, il doit interagir avec Upf2. Cependant, dans le cas du SMD, Upf2 n'est pas impliqué dans la dégradation. Deux explications peuvent être données afin de réconcilier cette divergence. Premièrement, Stau1 est peut-être capable de stabiliser l'interaction Upf1-SMG1 et de favoriser la phosphorylation de Upf1 de la même manière que Upf2. Deuxièmement, si l'interaction Stau1-Upf1 est plus stable que l'interaction Upf1-Upf2, le complexe SURF pré-assemblé n'est peut-être pas nécessaire pour le SMD. Ainsi, SMG1 serait recruté simultanément par les facteurs de relargage et le dimère Stau1-Upf1, entraînant la phosphorylation de Upf1.

Une autre protéine, SMG6, est capable d'interagir avec Upf1 phosphorylé. SMG6 forme des granules cytoplasmiques indépendants des « *P-bodies* ». SMG6 possède également un domaine endonucléase PIN qui ressemble au domaine RNaseH et qui est fonctionnel *in vitro* (Glavan et al., 2006). Il a été rapporté que le NMD chez la drosophile implique un clivage endonucléolytique, mais l'identité de cette nucléase est encore

inconnue (Gatfield et Izaurralde, 2004). Il serait intéressant de déterminer si les ARNm dégradés par le SMD sont retrouvés dans les « *P-bodies* » avec SMG7 ou s'ils sont plutôt associés à SMG6 et clivés de manière endonucléolytique.

L'approche suivante permettrait de déterminer si le SMD fait appel à une endonucléase. Il s'agit d'inhiber les voies de dégradation $5' \rightarrow 3'$ et $3' \rightarrow 5'$ afin d'observer si un intermédiaire de clivage apparaît et si la taille de cet intermédiaire peut être corrélée avec la position du codon stop. Ce modèle de clivage par une endonucléase pourrait être particulièrement approprié dans le cas des ARNm localisés dans les dendrites où les « *P-bodies* » ne sont sûrement pas facilement accessibles. Dans ce cas, le recrutement de SMG6 par Upfl entraînerait un clivage du transcrit et un arrêt de la traduction locale. Nous reviendrons plus loin dans la discussion sur le rôle potentiel du SMD dans la régulation de la traduction dendritique de l'ARNm (Section 5.1.4).

5.1.3 Régulation du SMD

Le NMD est principalement un mécanisme de contrôle de la qualité qui sert à s'assurer qu'il n'y ait pas de synthèse de protéines tronquées ayant potentiellement des effets néfastes sur le métabolisme cellulaire. La découverte que l'ARNm Arf1 encodant le facteur de ribosylation de l'ADP-1, une GTPase impliquée dans le transport vésiculaire (Donaldson et Jackson, 2000), était une cible endogène du SMD a ouvert la voie à l'hypothèse que le SMD puisse être un mécanisme régulé (Figure 2). En effet, il serait peu probable que les ARNm soumis au SMD le soit toujours dans la même mesure. Alors,

comment le SMD pourrait-il être régulé? Plusieurs pistes peuvent être suivies pour tenter d'obtenir des éléments de réponses à cette question :

- La concentration cellulaire de Stau1 pourrait varier et ainsi modifier l'efficacité du SMD.
- La formation du complexe Stau1-Upf1 pourrait être contrôlée, par des modifications post-traductionnelles de Stau1 et/ou Upf1, par exemple.
- L'accessibilité de Stau1 au SBS pourrait être diminuée par compétition avec d'autres facteurs liant l'ARN.

La littérature ne recense pas beaucoup de résultats se rapportant aux variations d'expression de Stau1 chez les mammifères, que ce soit au cours du développement, de la différenciation cellulaire ou du cycle cellulaire. Tout de même, il a été montré que le niveau de l'ARNm de Stau1 dans des cellules intestinales IEC-6 varie selon la confluence. L'ARNm de Stau1 est également beaucoup plus exprimé dans les cellules de la crypte que dans celles du villus au niveau de la membrane intestinale (Islam et al., 2005). La localisation subcellulaire de Stau1, en créant des différences locales dans sa concentration, pourrait également avoir un rôle à jouer dans le SMD. En ce sens, lors de la différenciation des cellules Caco-2 en entérocytes, il y a une redistribution de Stau1 vers la membrane apicale et une exclusion du domaine baso-latéral (Gautrey et al., 2005). De plus, des résultats préliminaires tendent à montrer que la quantité de Stau1 dans les cellules 293 et HeLa serait modulée au cours de la progression à travers le cycle cellulaire (Viranaicken et DesGroseillers, communications personnelles).

La deuxième hypothèse est que l'association Stau1-Upf1 puisse être régulée afin de contrôler l'efficacité du SMD. Notons tout d'abord que la région de Staufen qui interagit avec Upf1, soit le dsRBD4 et le TBD, est également impliquée dans une autre interaction protéine-protéine avec la protéine phosphatase-1 (PP1) (Monshausen et al., 2002). Cette association nécessite le motif d'acides aminés RKVTF qui se trouve au centre du TBD de Stau1. Cette interaction entre Stau1 et PP1 semble être assez stable, puisque les deux protéines sont co-purifiées par immunoprécipitation. Il serait donc possible que PP1 et Upf1 soient en compétition pour interagir avec Stau1. Cette même région, comprenant le dsRBD4 et le TBD, permet également une association directe avec le ribosome (Luo et al., 2002). Cette interaction est indépendante de l'activité de liaison à l'ARN du dsRBD4. De plus, Stau1 est capable d'homo-dimériser, ce qui pourrait moduler l'interaction Stau1-Upf1 (Martel et DesGroseillers, manuscrit en préparation). Stau1 est également une phosphoprotéine (Annexes, page II), mais la ou les kinases impliquées dans cette phosphorylation sont encore inconnues. L'état de phosphorylation de Stau1 pourrait donc aussi avoir un impact sur l'association à Upf1. Dans le cas de Upf1, au moins trois kinases responsables de son état de phosphorylation ont été identifiées, soit SMG1, ATM et ATR (Azzalin et Lingner, 2006; Brumbaugh et al., 2004; Pal et al., 2001).

Finalement, l'accès de Stau1 au SBS pourrait être contrôlé. Nous avons vu précédemment que dans le cas de PKR (Section 1.2.2.3), la protéine cellulaire TRBP et la protéine virale E3L pouvaient empêcher son activation en se liant aux mêmes ligands d'ARN que PKR. Une situation similaire serait envisageable dans le cas de l'association de

Stau1 au SBS, des protéines comme ADAR, RHA ou TRBP pourraient entrer en compétition avec Stau1 pour la liaison au SBS. De plus, l'affinité de Stau1 pour le SBS pourrait varier en réponse à des modifications post-traductionnelles de Stau1, telles que la phosphorylation, la méthylation sur arginine ou l'ubiquitination.

5.1.4 SMD et ARNm dendritiques

Mis en contexte dans le modèle de localisation neuronale de l'ARNm par Stau1, le SMD peut devenir un mécanisme intéressant de contrôle de la durée de l'expression d'un messenger qui est réprimé durant son transport et qui ne doit être traduit que dans une courte fenêtre de temps. En effet, le SMD, tout comme le NMD, est un mécanisme de dégradation qui est dépendant de la traduction. Il serait alors possible de proposer un modèle où l'activation de la traduction d'un ARNm, lié par Stau1 en son 3'UTR, soit en compétition directe avec le recrutement par Stau1 de Upf1 et l'enclenchement du SMD. Ainsi, le laps de temps au cours duquel cet ARNm serait activement traduit pourrait être régulé par la rapidité d'action du SMD. Donc, lors de la dé-répression traductionnelle, si l'ARNm est déjà lié par le complexe Stau1-Upf1, le nombre de protéines produites sera potentiellement très faible. À l'opposé, dans le cas où Stau1 n'est pas présent en aval du codon de terminaison, la traduction pourra s'effectuer plus longtemps. Un état intermédiaire apparaîtrait lorsque Stau1, seul, serait associé au transcrit en absence de Upf1.

5.2 Association de Stau1 au 3'UTR de plusieurs ARNm

Les travaux présentés dans cette thèse constituent la première caractérisation, chez les mammifères, de sites de liaison à Stau1 dans des ARNm. Nous avons montré que Stau1 s'associe à la région 3'UTR des ARNm suivants : Arf1, Paics, Serpine1, Il7R, c-jun, GAP43 et STMN3 (Articles 1 et 2 et annexes pages IV à IX). La caractérisation des régions précises d'interaction entre Stau1 et les ARNm Arf1 et STMN3 a été entreprise. L'ARNm Arf1 est le premier ARNm dont il a été montré qu'il est une cible du SMD. L'ARNm STMN3 est enrichi dans les immunopurifications de Stau1 et est également fortement stabilisé lorsque Stau1 est sous-exprimé dans les cellules HeLa.

5.2.1 Le SBS de Arf1

Le SBS de Arf1 a premièrement été établi comme une région d'environ 230 nucléotides débutant à plus de 67 nucléotides en aval du codon de terminaison endogène (Article 1). La modélisation de la structure secondaire de cette région indique qu'une tige de 19 paires de bases peut possiblement se former entre les brins constitués des nucléotides 75 à 93 et 194 à 212. La tige potentielle est entièrement en double brins, sans aucun mésappariement ou excroissance (« *bulges* »). Cette double hélice est sensée adopter une conformation de type A et contient 10 paires G-C, 7 paires A-U et 2 paires G-U. La tige n'est pas coiffée par une tétraboucle, puisqu'il y a 100 nucléotides qui séparent les deux brins formant la tige. Attendu que Stau1 lie avec une grande affinité les régions en double

brins de l'ARN, nous avons étudié plus en détail les déterminants structuraux du SBS nécessaires pour qu'il y ait association.

La première étape fut de délimiter avec plus de précision la portion minimale représentant le SBS de Arf1. Pour ce faire, des délétions ont été effectuées en 5' et en 3' de la région contenant les 300 premiers nucléotides du 3'UTR de Arf1. Cette analyse a montré que le fait d'enlever les nucléotides 30 à 79 en 5' ou les nucléotides 199 à 249 en 3' diminue grandement l'association à Stau1. Il est à noter que ces deux régions sont relativement éloignées l'une de l'autre. Ceci est en accord avec le fait que Stau1 lie des structures en double brins et qu'il y avait donc plus de chance que la région minimale d'interaction ne contienne pas uniquement une courte suite de nucléotides dont la séquence primaire serait le déterminant d'association. Autre fait important, ces deux régions chevauchent les deux brins qui s'assembleraient en une tige en double brins de 19 paires de bases selon la modélisation de structure secondaire. Nous avons donc entrepris de tester plusieurs mutations ayant le potentiel de déstabiliser cette tige prédite, afin d'en déterminer l'impact sur l'association à Stau1. Une partie des résultats obtenus était incluse dans l'article 2, mais une analyse plus complète, semi-quantitative, a également été effectuée avec 10 constructions mutantes du SBS (Annexes pages IV à VI).

L'analyse globale de tous ces résultats indique que l'intégrité de la tige de 19 paires de base est essentielle pour qu'il y ait association optimale à Stau1. Les mutations introduites ailleurs que dans cette tige principale n'ont pas d'impact notable sur le

recrutement de Stau1. La seule exception étant la construction qui possède une délétion des 100 nucléotides séparant les deux brins de la tige. Dans cette construction, l'inter-région est remplacée par une tétra-boucle (UCGA). Ceci suggère que d'autres déterminants sont peut-être impliqués dans l'association optimale de Stau1 au SBS. Autre résultat intéressant, la construction d'un double mutant complémentaire au centre de la tige ne restaure pas le niveau d'association du type sauvage (en comparant la construction « Double » à la construction « WT »). Ce résultat tend à montrer que la seule présence d'une tige de 19 paires de bases ne donne pas nécessairement un ligand optimal de Stau1. Cette observation a une grande implication dans la compréhension des déterminants moléculaires jouant un rôle dans la reconnaissance par Stau1 d'un élément de structure en double brins. En effet, il existe peut-être une contribution additionnelle à l'affinité de liaison venant de la position de certaines paires A-U ou G-C, ainsi que de l'orientation de ces paires dans la tige. Ceci serait en accord avec les observations effectuées en analysant la structure cristallographique du complexe entre de l'ARNdb et le dsRBD2 de XlrpA (Section 1.3.2). Il avait alors été déduit qu'une paire G-C située dans le sillon mineur contacté par la boucle 2 du dsRBD contribuait à la liaison de XlrpA au duplex d'ARN. De plus, l'alternance des paires A-U et G-C peut avoir un impact sur la géométrie des sillons majeurs et mineurs (Cohen et al., 2005), ce qui également pourrait contribuer à l'affinité du dsRBD pour son ligand.

5.2.2 Le SBS de STMN3

L'ARNm de STMN3 (*Stathmin like-3*) encode une protéine contenant un domaine stathmine impliqué dans la dépolymérisation des microtubules mitotiques selon un cycle de phosphorylation/déphosphorylation (Gavet et al., 1998). La sous-expression de Stau1 dans des cellules HeLa entraîne une augmentation du niveau stationnaire de l'ARNm STMN3 de 5,5 fois (Article 2). L'ARNm STMN3 est également associé à Stau1 après immunoprécipitation (Article 3). Afin d'identifier la région de l'ARNm STMN3 responsable de l'association à Stau1, nous avons testé l'affinité de Stau1 pour trois constructions de STMN3, soit une construction exprimant le cDNA entier, une construction tronquée des nucléotides 73-696 du 3'UTR et une troisième construction tronquée des nucléotides 18 à 1542 du 3'UTR. Les deux constructions contenant des délétions dans la région 3'UTR sont co-immunopurifiées dans une proportion inférieure à 20% du niveau d'association du transcrit dérivé du cDNA entier (résultats non-présentés). Stau1 s'associe donc préférentiellement à un élément du 3'UTR.

La modélisation de la structure secondaire de la région du 3'UTR comprenant les nucléotides 260 à 855 montre la formation possible d'une longue tige de 20 paires de bases, sans aucun mésappariement et possédant une seule excroissance de un nucléotide (Annexes page VIII). La tige est composée de 13 paires C-G, 4 paires A-U et 3 paires G-U. Similairement à la tige du SBS de Arf1, la tige potentielle de STMN3 n'est pas coiffée d'une tétraboucle. 255 nucléotides séparent les deux brins impliqués dans la formation de la

tige. Une approche similaire à celle effectuée pour l'analyse du SBS de Arf1 a été utilisée afin d'étudier la contribution des divers éléments du SBS de STMN3 dans l'association à Stau1. Voici les conclusions principales tirées de cette analyse (Annexes page IX) :

- La déstabilisation de la tige diminue l'affinité pour Stau1.
- La délétion de l'inter-région entre les deux brins formant la tige diminue également l'association à Stau1.
- La construction d'un double mutant complémentaire au centre de la tige ne restaure pas entièrement le niveau d'association observé pour le SBS de type sauvage.

Ces conclusions sont en fait les mêmes que pour le SBS de Arf1 et la prochaine section s'intéressera à dresser un portrait global de ce qui est maintenant connu de l'association de Staufen à l'ARNm.

5.2.3 Déterminants structuraux d'interaction

5.2.3.1 Le signal de localisation de bicoid est hautement structuré

Antérieurement aux travaux présentés dans cette thèse, la seule région d'ARN interagissant avec Staufen qui avait été caractérisée en détail consistait en une portion du 3'UTR du transcrit bicoid de la drosophile (Figure 3)(Brunel et Ehresmann, 2004). La structure prédite se divise en 4 domaines distincts (numérotés II à V). Les domaines III, IV et V sont impliqués à divers degrés dans le recrutement de l'ARNm bicoid, ainsi que sa localisation et son ancrage subséquent au pôle antérieur de l'ovocyte. Le domaine III est

Figure 3: Structure de la région centrale du 3'UTR de bicoid (nucléotides 172 à 722)

La structure est divisée en 4 grands domaines (domaine II à V). Un domaine charnière se trouve à la jonction des domaines II, III et IV. Le modèle de structure secondaire a été obtenu à partir de clivages enzymatique et d'attaques chimiques. La RNase T1 (flèches débutant par un carré) clive les guanines non appariées. La RNase T2 (flèches débutant par un cercle) clive les adénines non appariées (et faiblement les uridines non appariées). La RNase VI clive les régions en double brins (flèches). L'intensité du clivage est représentée par des flèches plus larges et de caractère plus gras. Les attaques chimiques au DMS et au CMTC permettent l'identification des nucléotides non appariés. Les résultats sont présentés selon un code de couleur : rouge (très réactif), orange (modérément réactif), jaune (très faiblement réactif) et bleu (non-réactif).

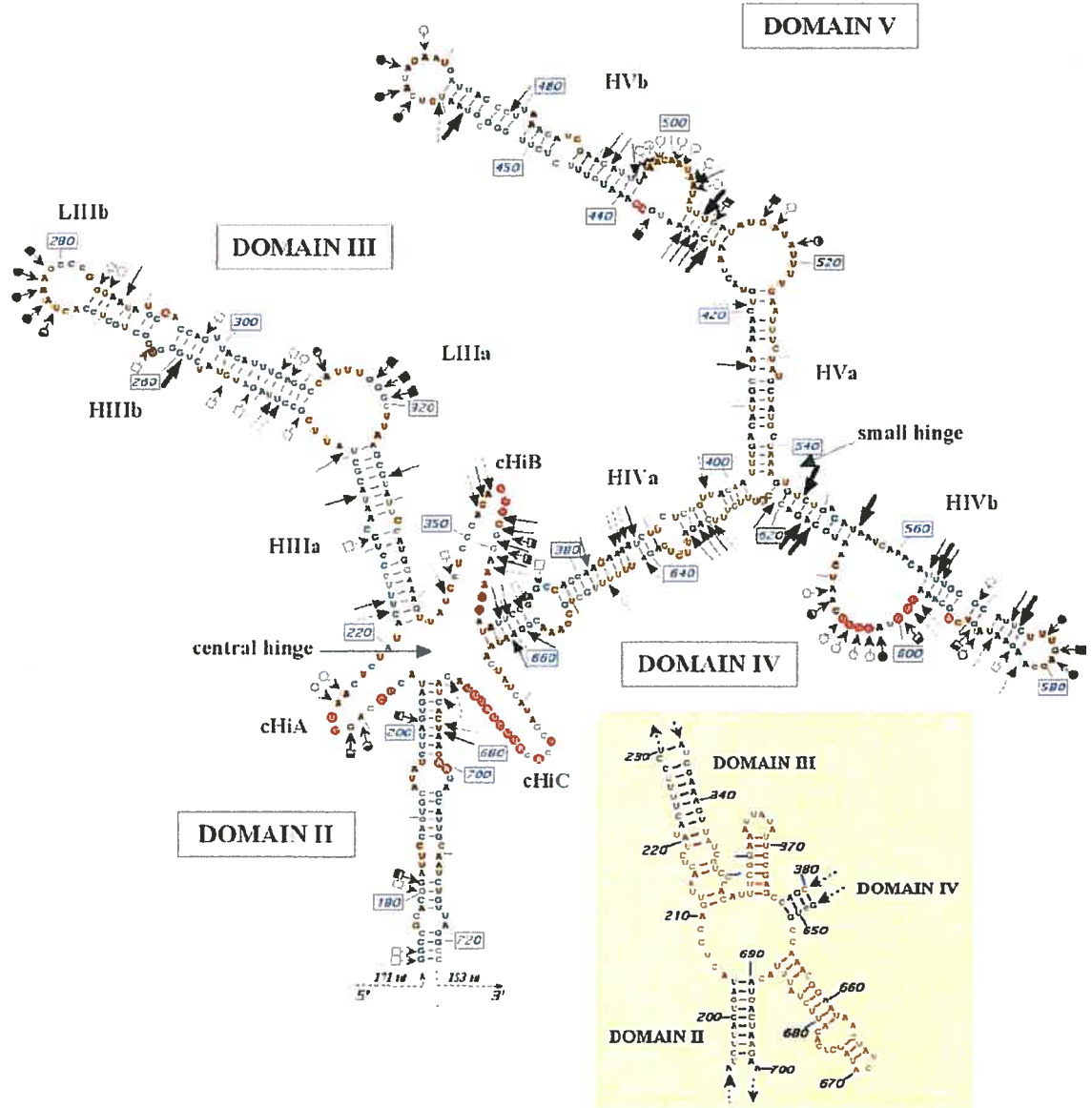


Figure 3: Structure de la région centrale du 3'UTR de bicoid (nucléotides 172 à 722)

Figure tirée de Brunel et Ehresmann (2004).

responsable d'un évènement de dimérisation qui est important pour la formation des complexes ribonucléoprotéiques de transport de bicoid (Ferrandon et al., 1997; Wagner et al., 2001). Il existe une controverse autour de l'utilité du domaine III dans la localisation de bicoid. Plusieurs travaux s'intéressant au signal de localisation ont été réalisés par injection de constructions mutantes au centre de l'embryon au stade blastoderme, ce qui n'est pas physiologique puisque la localisation de bicoid est terminée avant ce stade dans le contexte développemental. Il a d'ailleurs été montré que les domaines IV et V sont suffisants pour une localisation antérieure du transcrit dans l'ovocyte (Snee et al., 2005). Il n'en reste pas moins que le domaine III est capable de recruter Staufén dans les essais d'injection au niveau de l'embryon (Ferrandon et al., 1997).

En observant attentivement la structure déduite du domaine de localisation de bicoid, on peut voir plusieurs régions en double brins, dont certaines sont assez longues. Les régions HIIIa (18 paires de bases), HIIIb (16 paires de bases) et HVa (17 paires de bases) ne sont interrompues que par de rares mésappariements ou excroissances.

5.2.3.2 Modèle d'association de Staufén à l'ARNdb

Il est possible que Staufén en raison de ses multiples dsRBD s'associe à l'ARN en utilisant plus d'un dsRBD. Les données cristallographique concernant l'association du dsRBD2 de XlrpA montre que deux copies du dsRBD peuvent se positionner sur une double hélice d'ARN de 16 paires de bases (Ryter et Schultz, 1998). Nous savons aussi que le dsRBD3 de Staufén peut s'associer à une tige de 12 paires de bases (Ramos et al., 1999;

Ramos et al., 2000). Les résultats obtenus en étudiant le SBS de Arf1 montrent que la mutagenèse de quatre paires de bases à l'une ou l'autre des extrémités de la tige diminue grandement l'association à Stau1 et cela même s'il reste potentiellement une tige de 15 paires de bases dans chacun des cas. Il se pourrait donc que l'association optimale de Stau1 à l'ARNdb se fasse via deux dsRBD venant soit de deux copies de la protéine entière ou de deux dsRBD distincts de Stau1. Une observation expérimentale permet d'ailleurs de supporter cette hypothèse. Lors des essais de liaison *in vitro* de Stau1 à l'ARNdb, afin de déterminer la constante d'association de l'interaction, la courbe expérimentale obtenue était de forme sigmoïdale, ce qui suggère qu'il puisse y avoir coopérativité dans le mode d'association (Wickham et al., 1999).

Des travaux additionnels seront nécessaires pour mieux comprendre les déterminants structuraux requis afin d'avoir une association optimale et spécifique entre Staufen et l'ARNdb. Premièrement, des études cristallographiques pourraient être entreprises en utilisant la protéine Staufen entière, ou du moins les dsRBD-3 et -4 qui semblent avoir le plus d'affinité pour l'ARNdb, en complexe avec un ligand physiologique, tel que la tige de Arf1 ou de STMN3. De plus, les études de mutagenèse des SBS de Arf1 et STMN3 devront être poussées plus avant, afin de déterminer avec encore plus de précision si certains nucléotides sont préférés à des positions clés des tiges. Une étape préliminaire à ces études plus poussées serait de déterminer par clivages enzymatiques et attaques chimiques les conformations adoptées par ces deux SBS en solution. En effet, nous travaillons actuellement avec des prédictions structurelles déduites par des

algorithmes de calcul des structures de plus basses énergies et il est bien documenté que ces prédictions ne sont pas toujours le reflet de la réalité.

Une autre approche serait d'utiliser le SELEX afin de trouver les ligands optimaux de Stau1 et Stau2. Cependant, une étude récente a montré les limites de cette technique lorsqu'appliquée à la recherche de structures en double brins plutôt qu'à la recherche de séquences linéaires de nucléotides (Hallegger et al., 2006). Tel que mentionné dans l'introduction (Section 1.5.1), le SELEX a été utilisé pour trouver des ligands des dsRBD2 de XlrpA et de ADAR1. Après onze ou douze rondes d'enrichissement, les ligands isolés ont été séquencés et classés en différentes sous-familles selon leur identité de séquence. Cependant, lors des tests de liaison effectués dans le but de déterminer les constantes d'association de ces ligands aux dsRBD2 de ADAR1 et de XlrpA, aucune différence d'affinité n'a été observée. C'est à dire que les ligands enrichis spécifiquement avec le dsRBD2 de ADAR1 sont liés avec la même affinité par le dsRBD2 de XlrpA et vice-versa. Il est tout même important de noter que tous les ligands de forte affinité possédaient une structure secondaire relativement similaire comprenant un site de liaison défini par deux courtes tiges séparées par une boucle interne.

Par contre, nous disposons possiblement d'un nouvel outil pour tester l'association de Stau1 à l'ARN : le SMD. En utilisant le SBS de Arf1 dans des études d'association, il serait théoriquement possible de corréler l'affinité de Stau1 pour le SBS en observant le niveau stationnaire d'un ARNm rapporteur contenant diverses mutations dans le SBS. Cette

approche est présentement à l'essai et pourrait accélérer grandement l'étude des déterminants structuraux du SBS de Arf1 responsables de l'association à Stau1. En effet, cette approche permet d'éviter la co-immunoprécipitation de l'ARNm avec Stau1 et tous les problèmes de reproductibilité qui en découlent.

5.3 Régulation du métabolisme cellulaire par Stau1 et Stau2

Dans cette dernière section de la discussion, une synthèse des résultats obtenus dans cette thèse sera présentée dans l'optique d'établir un modèle intégré des diverses fonctions cellulaires de Stau1 et Stau2. Il est important de souligner encore une fois l'explosion du nombre de données acquises sur les fonctions des protéines Staufen de mammifères qui a eu lieu durant le laps de temps au cours duquel les travaux ici présentés ont été effectués.

Nous savons maintenant que Stau1 et Stau2 peuvent transiter par le noyau et le nucléole (Macchi et al., 2004; Martel et al., 2006), deux endroits où Staufen s'associe peut-être soit à l'ARNm, aux ribosomes ou à d'autres types d'ARN. Ceci n'exclut pas, par contre, la possibilité que Staufen puisse s'associer à l'ARN dans le cytoplasme. Nous savons également que la position à laquelle Staufen se trouve associé à un ARNm peut avoir des effets diamétralement opposés sur le sort de cet ARNm. En effet, le recrutement de Stau1 en 5' d'un transcrit dont la traduction est réprimée permet une activation de la traduction (Dugre-Brisson et al., 2005). À l'inverse, le recrutement de Stau1 dans la portion 3'UTR du transcrit peut causer sa dégradation par SMD (Kim et al., 2005b). Nous ne savons pas pour l'instant si Stau2 possède les deux mêmes activités, mais des résultats

préliminaires laissent croire que Stau2 peut également entraîner le SMD d'un rapporteur (Kim et Maquat, communications personnelles).

Il serait donc possible de classer les ARNm associés à Stau1 et Stau2 en quatre grandes catégories dont l'appartenance à l'une d'entre elles ne serait pas mutuellement exclusive de l'appartenance aux autres :

- ARNm dont la traduction est stimulée ou activée par association à Staufen
- ARNm dégradé par SMD lors de l'association à Staufen
- ARNm transporté à un site subcellulaire pour synthèse locale de la protéine encodée
- ARNm co-purifié indirectement en raison d'une liaison directe Staufen-ribosome

La découverte que des milliers d'ARNm sont potentiellement associés à Stau1 et Stau2 (Article 3) complique relativement la tâche dans l'assignation de ces divers transcrits à l'une ou l'autre des catégories ci-haut mentionnées. Différentes approches pourront être utilisées afin d'identifier des sous-groupes d'ARNm dans cette population générale. Premièrement, des travaux sont déjà en cours afin d'identifier les ARNm cellulaires qui adopte un profil de sédimentation distinct lors d'une surexpression de Stau1. Ces ARNm peuvent être plus activement traduits s'ils sont associés, par exemple, en plus grande partie aux polysomes. Une surexpression de Staufen pourrait également entraîner une dégradation plus active de certains des ARNm associés. Il serait également approprié de purifier Staufen à partir de divers compartiments cellulaires, par exemple, à partir des dendrites de neurones.

Il sera également important de s'intéresser aux différences de spécificité d'association de Stau1 et Stau2 aux ARNm. En effet, plusieurs ARNm communs sont co-purifiés avec ces deux protéines, mais il existe des sous-populations distinctes d'ARNm qui sont associées spécifiquement à l'une ou l'autre de ces deux protéines. Quels sont les facteurs responsables de cette spécificité? Plusieurs pistes de réponse peuvent être explorées. Premièrement, même si les dsRBD-2, -3 et -4 sont hautement conservés entre Stau1 et Stau2, il est possible que certains acides aminés non-conservés soient impliqués dans la discrimination de motifs d'association plus spécifiques à Stau1 ou à Stau2. Une manière simple de vérifier cette hypothèse serait de construire des chimères de Stau1 et Stau2 en échangeant leurs dsRBD, afin de déterminer si la spécificité de liaison vient uniquement des dsRBD. Deuxièmement, des régions non-conservées entre les deux protéines comme le dsRBD1 de Stau2 ou le dsRBD5 de Stau1 pourraient avoir un rôle à jouer dans la reconnaissance et l'association à certains ARNm spécifiques. Troisièmement, le recrutement de Stau1 ou Stau2 sur certains ARNm est peut-être contrôlé par l'association à des partenaires protéiques qui interagissent spécifiquement avec Stau1 ou Stau2. La spécificité de liaison découlerait alors de l'affinité du complexe pour un motif de liaison.

Un des plus grands défis sera d'identifier les voies de signalisation cellulaires qui sont responsables de la phosphorylation/déphosphorylation de Staufen. La contribution de modifications post-traductionnelles à la modulation des diverses fonctions de Staufen pourrait être la clé qui permettrait une régulation fine de tous les événements moléculaires initiés par Staufen. Pour appuyer cette hypothèse, il a été montré que chez le xénope

XStau1 et XStau2 sont phosphorylés par la voie MAPK lors de la maturation méiotique au pôle végétal, un stade où plusieurs ARNm localisés au cortex végétal sont libérés (Allison et al., 2004). Ce qui suggère un lien entre l'état de phosphorylation de Staufen et le métabolisme des ARNm localisés.

De plus, la génération de souris invalidées pour les gènes Stau1 et Stau2 serait un outil exceptionnel pour pouvoir apprécier les différences précises dans le rôle de ces deux protéines. Cependant, le nombre d'ARNm qui sont potentiellement associés autant à Stau1 qu'à Stau2 nécessitera peut-être la génération d'une souris où les deux gènes seront inactivés, afin de déterminer l'impact global de l'absence de Staufen sur le métabolisme cellulaire. En raison du rôle potentiel de Staufen lors du développement, il est fortement possible que la délétion de Staufen entraîne une mort embryonnaire, la création de souris dans lesquelles l'inactivation des gènes Stau1 et Stau2 est conditionnelle serait donc de mise.

Finalement, nous avons montré que parmi les ARNm co-purifiés avec Stau1 se trouvait un certain nombre d'ARNm ayant également été identifiés comme associés à la protéine FMRP (Article 3). Ce résultat s'ajoute à de multiples observations qui suggèrent que les complexes ribonucléoprotéiques sont très hétérogènes et que plusieurs combinaisons de protéines liant l'ARN peuvent s'associer aux transcrits (Elvira et al., 2006b; Gehring et al., 2005; Kanai et al., 2004; Ohashi et al., 2002). Il sera important au cours des prochaines années d'accumuler des données sur la composition en ARNm de

divers complexes ribonucléoprotéiques à l'intérieur d'un même type cellulaire et en utilisant les mêmes plateformes d'identification. Ceci permettra enfin d'avoir une vision globale des relations qui existent entre les diverses protéines liant l'ARN.

En terminant, il est important de souligner que durant la période où les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués, un pan insoupçonné de la biologie des ARN a été mis au jour. En effet, l'importance physiologique des petits ARN non codants, tels les miRNA, les siRNA et les transcrits d'éléments *Alu* (Conrad et al., 2006; Hulme et al., 2006; Kawasaki et al., 2004; Smalheiser et Torvik, 2006), pour n'en nommer que quelques-uns, a radicalement changé la perception des fonctions de l'ARN dans les processus cellulaires. De nouveaux outils sont maintenant à la disposition de la communauté scientifique pour identifier efficacement la présence de ces petits ARN. Il serait donc approprié de déterminer si Staufén s'associe également à des transcrit non-codants, et ce, puisqu'il a été montré que plusieurs autres protéines à dsRBD sont retrouvées en complexe avec ces molécules (Chendrimada et al., 2005; Haase et al., 2005; Han et al., 2006; Kawahara et Nishikura, 2006; Macrae et al., 2006).

Conclusion

Les travaux présentés dans cette thèse ont permis de faire croître de manière significative le lot de connaissances sur les protéines Staufen de mammifères. L'isolation et la détermination du contenu en ARNm des complexes protéiques contenant Stau1 et Stau2 ont permis de mener à la découverte d'un nouveau mécanisme cellulaire de dégradation de l'ARNm : le SMD. De plus, pour la première fois chez les mammifères, des structures d'ARNdb reconnues par Staufen à l'intérieur d'ARNm endogènes ont été caractérisées. Les résultats contenus dans cette thèse pourront servir de base à de multiples études subséquentes s'intéressant à une meilleure définition des rôles cellulaires de Staufen.

Bibliographie

Ackermann, T., Gramlich, V., Klump, H., Knable, T., Schmid, E. D., Seliger, H., and Stulz, J. (1979). Demonstration of G . U wobble base pairs by Raman and IR spectroscopy. *Biophys Chem* 10, 231-238.

Albert, T. K., Lemaire, M., van Berkum, N. L., Gentz, R., Collart, M. A., and Timmers, H. T. (2000). Isolation and characterization of human orthologs of yeast CCR4-NOT complex subunits. *Nucleic Acids Res* 28, 809-817.

Allison, R., Czaplinski, K., Git, A., Adegbenro, E., Stennard, F., Houliston, E., and Standart, N. (2004). Two distinct Staufen isoforms in *Xenopus* are vegetally localized during oogenesis. *Rna* 10, 1751-1763.

Amrani, N., Ganesan, R., Kervestin, S., Mangus, D. A., Ghosh, S., and Jacobson, A. (2004). A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* 432, 112-118.

Anderson, J. S., and Parker, R. P. (1998). The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *Embo J* 17, 1497-1506.

Arciga-Reyes, L., Wootton, L., Kieffer, M., and Davies, B. (2006). UPF1 is required for nonsense-mediated mRNA decay (NMD) and RNAi in *Arabidopsis*. *Plant J* 47, 480-489.

Aronov, S., Aranda, G., Behar, L., and Ginzburg, I. (2001). Axonal tau mRNA localization coincides with tau protein in living neuronal cells and depends on axonal targeting signal. *J Neurosci* 21, 6577-6587.

Aronov, S., Aranda, G., Behar, L., and Ginzburg, I. (2002). Visualization of translated tau protein in the axons of neuronal P19 cells and characterization of tau RNP granules. *J Cell Sci* 115, 3817-3827.

- Ayoubi, T. A., and Van De Ven, W. J. (1996). Regulation of gene expression by alternative promoters. *Faseb J* 10, 453-460.
- Azzalin, C. M., and Lingner, J. (2006). The human RNA surveillance factor UPF1 is required for S phase progression and genome stability. *Curr Biol* 16, 433-439.
- Bakheet, T., Williams, B. R., and Khabar, K. S. (2003). ARED 2.0: an update of AU-rich element mRNA database. *Nucleic Acids Res* 31, 421-423.
- Bashkurov, V. I., Scherthan, H., Solinger, J. A., Buerstedde, J. M., and Heyer, W. D. (1997). A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. *J Cell Biol* 136, 761-773.
- Bass, B. L. (2002). RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA. *Annu Rev Biochem* 71, 817-846.
- Bassell, G. J., and Singer, R. H. (2001). Neuronal RNA localization and the cytoskeleton. *Results Probl Cell Differ* 34, 41-56.
- Bassell, G. J., Singer, R. H., and Kosik, K. S. (1994). Association of poly(A) mRNA with microtubules in cultured neurons. *Neuron* 12, 571-582.
- Beelman, C. A., and Parker, R. (1995). Degradation of mRNA in eukaryotes. *Cell* 81, 179-183.
- Bernstein, P., Peltz, S. W., and Ross, J. (1989). The poly(A)-poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro. *Mol Cell Biol* 9, 659-670.
- Bernstein, P., and Ross, J. (1989). Poly(A), poly(A) binding protein and the regulation of mRNA stability. *Trends Biochem Sci* 14, 373-377.

- Blackshear, P. J. (2002). Tristetraprolin and other CCCH tandem zinc-finger proteins in the regulation of mRNA turnover. *Biochem Soc Trans* 30, 945-952.
- Brendel, C., Rehbein, M., Kreienkamp, H. J., Buck, F., Richter, D., and Kindler, S. (2004). Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem J* 384, 239-246.
- 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 Staufen protein. *Science* 289, 2120-2122.
- Brennan, C. M., and Steitz, J. A. (2001). HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci* 58, 266-277.
- Broadus, J., Fuerstenberg, S., and Doe, C. Q. (1998). Staufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature* 391, 792-795.
- Brown, V., Jin, P., Ceman, S., Darnell, J. C., O'Donnell, W. T., Tenenbaum, S. A., Jin, X., Feng, Y., Wilkinson, K. D., Keene, J. D., *et al.* (2001). Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell* 107, 477-487.
- Brumbaugh, K. M., Otterness, D. M., Geisen, C., Oliveira, V., Brognard, J., Li, X., Lejeune, F., Tibbetts, R. S., Maquat, L. E., and Abraham, R. T. (2004). The mRNA surveillance protein hSMG-1 functions in genotoxic stress response pathways in mammalian cells. *Mol Cell* 14, 585-598.
- Brunel, C., and Ehresmann, C. (2004). Secondary structure of the 3' UTR of bicoid mRNA. *Biochimie* 86, 91-104.

- Buchner, G., Bassi, M. T., Andolfi, G., Ballabio, A., and Franco, B. (1999). Identification of a novel homolog of the *Drosophila* staufer protein in the chromosome 8q13-q21.1 region. *Genomics* 62, 113-118.
- Calero, G., Wilson, K. F., Ly, T., Rios-Steiner, J. L., Clardy, J. C., and Cerione, R. A. (2002). Structural basis of m⁷GpppG binding to the nuclear cap-binding protein complex. *Nat Struct Biol* 9, 912-917.
- Chang, K. Y., and Ramos, A. (2005). The double-stranded RNA-binding motif, a versatile macromolecular docking platform. *Febs J* 272, 2109-2117.
- Chang, L. H., and Marshall, A. G. (1986). Identification of three G.U base pairs in *Bacillus subtilis* ribosomal 5S RNA via 500-MHz proton homonuclear Overhauser enhancements. *Biochemistry* 25, 3056-3063.
- Chen, C. Y., Gherzi, R., Ong, S. E., Chan, E. L., Raijmakers, R., Pruijn, G. J., Stoecklin, G., Moroni, C., Mann, M., and Karin, M. (2001). AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* 107, 451-464.
- Chendrimada, T. P., Gregory, R. I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436, 740-744.
- Chiu, S. Y., Lejeune, F., Ranganathan, A. C., and Maquat, L. E. (2004). The pioneer translation initiation complex is functionally distinct from but structurally overlaps with the steady-state translation initiation complex. *Genes Dev* 18, 745-754.
- Cohen, R. S., Zhang, S., and Dollar, G. L. (2005). The positional, structural, and sequence requirements of the *Drosophila* TLS RNA localization element. *Rna* 11, 1017-1029.

Conrad, R., Barrier, M., and Ford, L. P. (2006). Role of miRNA and miRNA processing factors in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 78, 107-117.

Dar, A. C., Dever, T. E., and Sicheri, F. (2005). Higher-order substrate recognition of eIF2alpha by the RNA-dependent protein kinase PKR. *Cell* 122, 887-900.

Darnell, J. C., Jensen, K. B., Jin, P., Brown, V., Warren, S. T., and Darnell, R. B. (2001). Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell* 107, 489-499.

DesGroseillers, L., and Lemieux, N. (1996). Localization of a human double-stranded RNA-binding protein gene (STAU) to band 20q13.1 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 36, 527-529.

Dollenmaier, G., and Weitz, M. (2003). Interaction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with secondary and tertiary RNA structural elements of the hepatitis A virus 3' translated and non-translated regions. *J Gen Virol* 84, 403-414.

Donaldson, J. G., and Jackson, C. L. (2000). Regulators and effectors of the ARF GTPases. *Curr Opin Cell Biol* 12, 475-482.

Dorin, D., Bonnet, M. C., Bannwarth, S., Gagnol, A., Meurs, E. F., and Vaquero, C. (2003). The TAR RNA-binding protein, TRBP, stimulates the expression of TAR-containing RNAs in vitro and in vivo independently of its ability to inhibit the dsRNA-dependent kinase PKR. *J Biol Chem* 278, 4440-4448.

Duchaine, T., Wang, H. J., Luo, M., Steinberg, S. V., Nabi, I. R., and DesGroseillers, L. (2000). A novel murine Staufen isoform modulates the RNA content of Staufen complexes. *Mol Cell Biol* 20, 5592-5601.

- Duchaine, T. F., Hemraj, I., Furic, L., Deitinghoff, A., Kiebler, M. A., and DesGroseillers, L. (2002). Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J Cell Sci* 115, 3285-3295.
- Dugre-Brisson, S., Elvira, G., Boulay, K., Chatel-Chaix, L., Mouland, A. J., and DesGroseillers, L. (2005). Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res* 33, 4797-4812.
- Eberwine, J., Belt, B., Kacharina, J. E., and Miyashiro, K. (2002). Analysis of subcellularly localized mRNAs using in situ hybridization, mRNA amplification, and expression profiling. *Neurochem Res* 27, 1065-1077.
- Elvira, G., Massie, B., and DesGroseillers, L. (2006a). The zinc-finger protein ZFR is critical for Staufen 2 isoform specific nucleocytoplasmic shuttling in neurons. *J Neurochem* 96, 105-117.
- Elvira, G., Wasiak, S., Blandford, V., Tong, X. K., Serrano, A., Fan, X., del Rayo Sanchez-Carbente, M., Servant, F., Bell, A. W., Boismenu, D., *et al.* (2006b). Characterization of an RNA granule from developing brain. *Mol Cell Proteomics* 5, 635-651.
- Ephrussi, A., and Lehmann, R. (1992). Induction of germ cell formation by oskar. *Nature* 358, 387-392.
- Evdokimova, V., Ruzanov, P., Anglesio, M. S., Sorokin, A. V., Ovchinnikov, L. P., Buckley, J., Triche, T. J., Sonenberg, N., and Sorensen, P. H. (2006). Akt-mediated YB-1 phosphorylation activates translation of silent mRNA species. *Mol Cell Biol* 26, 277-292.
- Ferrandon, D., Elphick, L., Nusslein-Volhard, C., and St Johnston, D. (1994). Staufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* 79, 1221-1232.

- Ferrandon, D., Koch, I., Westhof, E., and Nusslein-Volhard, C. (1997). RNA-RNA interaction is required for the formation of specific bicoid mRNA 3' UTR-STAUFIN ribonucleoprotein particles. *Embo J* 16, 1751-1758.
- Fierro-Monti, I., and Mathews, M. B. (2000). Proteins binding to duplexed RNA: one motif, multiple functions. *Trends Biochem Sci* 25, 241-246.
- Filipowicz, W. (1978). Functions of the 5,-terminal m7G cap in eukaryotic mRNA. *FEBS Lett* 96, 1-11.
- Frischmeyer, P. A., and Dietz, H. C. (1999). Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet* 8, 1893-1900.
- Furic, L., and Desgroseillers, L. (2005). [Post-transcriptional regulation of gene expression: another role for Staufin1]. *Med Sci (Paris)* 21, 571-573.
- Galarneau, A., and Richard, S. (2005). Target RNA motif and target mRNAs of the Quaking STAR protein. *Nat Struct Mol Biol* 12, 691-698.
- Gatfield, D., and Izaurralde, E. (2004). Nonsense-mediated messenger RNA decay is initiated by endonucleolytic cleavage in *Drosophila*. *Nature* 429, 575-578.
- Gautrey, H., McConnell, J., Hall, J., and Hesketh, J. (2005). Polarised distribution of the RNA-binding protein Staufin in differentiated intestinal epithelial cells. *FEBS Lett* 579, 2226-2230.
- Gavet, O., Ozon, S., Manceau, V., Lawler, S., Curmi, P., and Sobel, A. (1998). The stathmin phosphoprotein family: intracellular localization and effects on the microtubule network. *J Cell Sci* 111 (Pt 22), 3333-3346.

- Gehring, N. H., Kunz, J. B., Neu-Yilik, G., Breit, S., Viegas, M. H., Hentze, M. W., and Kulozik, A. E. (2005). Exon-junction complex components specify distinct routes of nonsense-mediated mRNA decay with differential cofactor requirements. *Mol Cell* *20*, 65-75.
- Glavan, F., Behm-Ansmant, I., Izaurralde, E., and Conti, E. (2006). Structures of the PIN domains of SMG6 and SMG5 reveal a nuclease within the mRNA surveillance complex. *Embo J* *25*, 5117-5125.
- Goetze, B., Tuebing, F., Xie, Y., Dorostkar, M. M., Thomas, S., Pehl, U., Boehm, S., Macchi, P., and Kiebler, M. A. (2006). The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Staufen2 is required for dendritic spine morphogenesis. *J Cell Biol* *172*, 221-231.
- Govin, J., Caron, C., Lestrat, C., Rousseaux, S., and Khochbin, S. (2004). The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *Eur J Biochem* *271*, 3459-3469.
- Gregory, R. I., Chendrimada, T. P., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* *123*, 631-640.
- Haase, A. D., Jaskiewicz, L., Zhang, H., Laine, S., Sack, R., Gatignol, A., and Filipowicz, W. (2005). TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep* *6*, 961-967.
- Hallegger, M., Taschner, A., and Jantsch, M. F. (2006). RNA aptamers binding the double-stranded RNA-binding domain. *Rna*.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K. H., Nam, J. W., Heo, I., Rhee, J. K., Sohn, S. Y., Cho, Y., Zhang, B. T., and Kim, V. N. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* *125*, 887-901.

- Hartman, T. R., Qian, S., Bolinger, C., Fernandez, S., Schoenberg, D. R., and Boris-Lawrie, K. (2006). RNA helicase A is necessary for translation of selected messenger RNAs. *Nat Struct Mol Biol*.
- Hartmuth, K., Urlaub, H., Vornlocher, H. P., Will, C. L., Gentzel, M., Wilm, M., and Luhrmann, R. (2002). Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 16719-16724.
- Hartmuth, K., Vornlocher, H. P., and Luhrmann, R. (2004). Tobramycin affinity tag purification of spliceosomes. *Methods Mol Biol* *257*, 47-64.
- Hentze, M. W. (1997). eIF4G: a multipurpose ribosome adapter? *Science* *275*, 500-501.
- Herbert, A., and Rich, A. (2001). The role of binding domains for dsRNA and Z-DNA in the in vivo editing of minimal substrates by ADAR1. *PNAS* *98*, 12132-12137.
- Hosoda, N., Kim, Y. K., Lejeune, F., and Maquat, L. E. (2005). CBP80 promotes interaction of Upf1 with Upf2 during nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* *12*, 893-901.
- Hu, M., Liu, Q. S., Chang, K. T., and Berg, D. K. (2002). Nicotinic regulation of CREB activation in hippocampal neurons by glutamatergic and nonglutamatergic pathways. *Mol Cell Neurosci* *21*, 616-625.
- Huang, Y. S., Carson, J. H., Barbarese, E., and Richter, J. D. (2003). Facilitation of dendritic mRNA transport by CPEB. *Genes Dev* *17*, 638-653.
- Huang, Y. S., Jung, M. Y., Sarkissian, M., and Richter, J. D. (2002). N-methyl-D-aspartate receptor signaling results in Aurora kinase-catalyzed CPEB phosphorylation and alpha CaMKII mRNA polyadenylation at synapses. *Embo J* *21*, 2139-2148.

- Hulme, A. E., Bogerd, H. P., Cullen, B. R., and Moran, J. V. (2006). Selective inhibition of Alu retrotransposition by APOBEC3G. *Gene*.
- Irion, U., Adams, J., Chang, C. W., and St Johnston, D. (2006). Miranda couples oskar mRNA/Staufen complexes to the bicoid mRNA localization pathway. *Dev Biol* 297, 522-533.
- Ishigaki, Y., Li, X., Serin, G., and Maquat, L. E. (2001). Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell* 106, 607-617.
- Islam, S., Montgomery, R. K., Fialkovich, J. J., and Grand, R. J. (2005). Developmental and regional expression and localization of mRNAs encoding proteins involved in RNA translocation. *J Histochem Cytochem* 53, 1501-1509.
- Kanai, Y., Dohmae, N., and Hirokawa, N. (2004). Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 43, 513-525.
- Kashima, I., Yamashita, A., Izumi, N., Kataoka, N., Morishita, R., Hoshino, S., Ohno, M., Dreyfuss, G., and Ohno, S. (2006). Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* 20, 355-367.
- Kawagishi-Kobayashi, M., Silverman, J. B., Ung, T. L., and Dever, T. E. (1997). Regulation of the protein kinase PKR by the vaccinia virus pseudosubstrate inhibitor K3L is dependent on residues conserved between the K3L protein and the PKR substrate eIF2alpha. *Mol Cell Biol* 17, 4146-4158.
- Kawahara, Y., and Nishikura, K. (2006). Extensive adenosine-to-inosine editing detected in Alu repeats of antisense RNAs reveals scarcity of sense-antisense duplex formation. *FEBS Lett* 580, 2301-2305.

- Kawasaki, H., Wadhwa, R., and Taira, K. (2004). World of small RNAs: from ribozymes to siRNA and miRNA. *Differentiation* 72, 58-64.
- Kim, H. K., Kim, Y. B., Kim, E. G., and Schuman, E. (2005a). Measurement of dendritic mRNA transport using ribosomal markers. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 895-900.
- Kim, K. C., and Kim, H. K. (2005). Role of Staufen in dendritic mRNA transport and its modulation. *Neurosci Lett*.
- Kim, V. N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 376-385.
- Kim, Y. K., Furic, L., Desgroseillers, L., and Maquat, L. E. (2005b). Mammalian Staufen I recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* 120, 195-208.
- Kohrmann, M., Luo, M., Kaether, C., DesGroseillers, L., Dotti, C. G., and Kiebler, M. A. (1999). Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Mol Biol Cell* 10, 2945-2953.
- Kunz, J. B., Neu-Yilik, G., Hentze, M. W., Kulozik, A. E., and Gehring, N. H. (2006). Functions of hUpf3a and hUpf3b in nonsense-mediated mRNA decay and translation. *Rna* 12, 1015-1022.
- Langland, J. O., and Jacobs, B. L. (2004). Inhibition of PKR by vaccinia virus: role of the N- and C-terminal domains of E3L. *Virology* 324, 419-429.
- Larcher, J. C., Gasmi, L., Viranaicken, W., Edde, B., Bernard, R., Ginzburg, I., and Denoulet, P. (2004). Ilf3 and NF90 associate with the axonal targeting element of Tau mRNA. *Faseb J* 18, 1761-1763.

- Laroia, G., Cuesta, R., Brewer, G., and Schneider, R. J. (1999). Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science* *284*, 499-502.
- Le Hir, H., Gatfield, D., Izaurralde, E., and Moore, M. J. (2001). The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *Embo J* *20*, 4987-4997.
- Le Hir, H., Izaurralde, E., Maquat, L. E., and Moore, M. J. (2000a). The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *Embo J* *19*, 6860-6869.
- Le Hir, H., Moore, M. J., and Maquat, L. E. (2000b). Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions. *Genes Dev* *14*, 1098-1108.
- Lee, K., Fajardo, M., and Braun, R. (1996). A testis cytoplasmic RNA-binding protein that has the properties of a translational repressor. *Mol Cell Biol* *16*, 3023-3034.
- Lehmann, R., and Ephrussi, A. (1994). Germ plasm formation and germ cell determination in *Drosophila*. *Ciba Found Symp* *182*, 282-296; discussion 296-300.
- Litman, P., Barg, J., and Ginzburg, I. (1994). Microtubules are involved in the localization of tau mRNA in primary neuronal cell cultures. *Neuron* *13*, 1463-1474.
- Litman, P., Barg, J., Rindzoonski, L., and Ginzburg, I. (1993). Subcellular localization of tau mRNA in differentiating neuronal cell culture: implications for neuronal polarity. *Neuron* *10*, 627-638.
- Luo, M., Duchaine, T. F., and DesGroseillers, L. (2002). Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association. *Biochem J* *365*, 817-824.

Lyford, G. L., Yamagata, K., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., Sanders, L. K., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Lanahan, A. A., and Worley, P. F. (1995). Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* 14, 433-445.

Lykke-Andersen, J. (2002). Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay. *Mol Cell Biol* 22, 8114-8121.

Macchi, P., Brownawell, A. M., Grunewald, B., DesGroseillers, L., Macara, I. G., and Kiebler, M. A. (2004). The brain-specific double-stranded RNA-binding protein Stauf2: nucleolar accumulation and isoform-specific exportin-5-dependent export. *J Biol Chem* 279, 31440-31444.

Macdonald, P. M., and Kerr, K. (1997). Redundant RNA recognition events in bicoid mRNA localization. *Rna* 3, 1413-1420.

Macrae, I. J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A. N., Cande, W. Z., Adams, P. D., and Doudna, J. A. (2006). Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* 311, 195-198.

Mallardo, M., Deitinghoff, A., Muller, J., Goetze, B., Macchi, P., Peters, C., and Kiebler, M. A. (2003). Isolation and characterization of Staufin-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2100-2105.

Manche, L., Green, S. R., Schmedt, C., and Mathews, M. B. (1992). Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Mol Cell Biol* 12, 5238-5248.

Marion, R. M., Fortes, P., Beloso, A., Dotti, C., and Ortin, J. (1999). A human sequence homologue of Staufin is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 19, 2212-2219.

- Martel, C., Macchi, P., Furic, L., Kiebler, M. A., and Desgroseillers, L. (2006). Staufen I is imported into the nucleolus via a bipartite nuclear localization signal and several modulatory determinants. *Biochem J* 393, 245-254.
- Mayford, M., Baranes, D., Podsypanina, K., and Kandel, E. R. (1996). The 3'-untranslated region of CaMKII alpha is a cis-acting signal for the localization and translation of mRNA in dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13250-13255.
- Mendell, J. T., Sharifi, N. A., Meyers, J. L., Martinez-Murillo, F., and Dietz, H. C. (2004). Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. *Nat Genet* 36, 1073-1078.
- Micklem, D. R., Adams, J., Grunert, S., and St Johnston, D. (2000). Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. *Embo J* 19, 1366-1377.
- Miki, T., and Yoneda, Y. (2004). Alternative splicing of Staufen2 creates the nuclear export signal for CRM1 (Exportin 1). *J Biol Chem* 279, 47473-47479.
- Miller, S., Yasuda, M., Coats, J. K., Jones, Y., Martone, M. E., and Mayford, M. (2002). Disruption of dendritic translation of CaMKIIalpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuron* 36, 507-519.
- Miyashiro, K. Y., Beckel-Mitchener, A., Purk, T. P., Becker, K. G., Barret, T., Liu, L., Carbonetto, S., Weiler, I. J., Greenough, W. T., and Eberwine, J. (2003). RNA cargoes associating with FMRP reveal deficits in cellular functioning in Fmr1 null mice. *Neuron* 37, 417-431.
- Monshausen, M., Rehbein, M., Richter, D., and Kindler, S. (2002). The RNA-binding protein Staufen from rat brain interacts with protein phosphatase-1. *J Neurochem* 81, 557-564.

- Mouland, A. J., Mercier, J., Luo, M., Bernier, L., DesGroseillers, L., and Cohen, E. A. (2000). The double-stranded RNA-binding protein Staufen is incorporated in human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in genomic RNA encapsidation. *J Virol* 74, 5441-5451.
- Nanduri, S., Carpick, B. W., Yang, Y., Williams, B. R., and Qin, J. (1998). Structure of the double-stranded RNA-binding domain of the protein kinase PKR reveals the molecular basis of its dsRNA-mediated activation. *Embo J* 17, 5458-5465.
- Nicholson, A. W. (1999). Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiol Rev* 23, 371-390.
- Odreman-Macchioli, F. E., Tisminetzky, S. G., Zotti, M., Baralle, F. E., and Buratti, E. (2000). Influence of correct secondary and tertiary RNA folding on the binding of cellular factors to the HCV IRES. *Nucleic Acids Res* 28, 875-885.
- Ohashi, S., Koike, K., Omori, A., Ichinose, S., Ohara, S., Kobayashi, S., Sato, T. A., and Anzai, K. (2002). Identification of mRNA/protein (mRNP) complexes containing Puralpha, mStaufen, fragile X protein, and myosin Va and their association with rough endoplasmic reticulum equipped with a kinesin motor. *J Biol Chem* 277, 37804-37810.
- Ohnishi, T., Yamashita, A., Kashima, I., Schell, T., Anders, K. R., Grimson, A., Hachiya, T., Hentze, M. W., Anderson, P., and Ohno, S. (2003). Phosphorylation of hUPF1 induces formation of mRNA surveillance complexes containing hSMG-5 and hSMG-7. *Mol Cell* 12, 1187-1200.
- Ong, C. L., Thorpe, J. C., Gorry, P. R., Bannwarth, S., Jaworowski, A., Howard, J. L., Chung, S., Campbell, S., Christensen, H. S., Clerzius, G., *et al.* (2005). Low TRBP levels support an innate human immunodeficiency virus type 1 resistance in astrocytes by enhancing the PKR antiviral response. *J Virol* 79, 12763-12772.

- Pal, M., Ishigaki, Y., Nagy, E., and Maquat, L. E. (2001). Evidence that phosphorylation of human Upfl protein varies with intracellular location and is mediated by a wortmannin-sensitive and rapamycin-sensitive PI 3-kinase-related kinase signaling pathway. *Rna* 7, 5-15.
- Palacios, I. M., Gatfield, D., St Johnston, D., and Izaurralde, E. (2004). An eIF4AIII-containing complex required for mRNA localization and nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* 427, 753-757.
- Pantopoulos, K. (2004). Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. *Ann N Y Acad Sci* 1012, 1-13.
- Patel, C. V., Handy, I., Goldsmith, T., and Patel, R. C. (2000). PACT, a stress-modulated cellular activator of interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase, PKR. *J Biol Chem* 275, 37993-37998.
- Patel, R. C., and Sen, G. C. (1998a). PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR. *Embo J* 17, 4379-4390.
- Patel, R. C., and Sen, G. C. (1998b). Requirement of PKR dimerization mediated by specific hydrophobic residues for its activation by double-stranded RNA and its antigrowth effects in yeast. *Mol Cell Biol* 18, 7009-7019.
- Prasanth, K. V., Prasanth, S. G., Xuan, Z., Hearn, S., Freier, S. M., Bennett, C. F., Zhang, M. Q., and Spector, D. L. (2005). Regulating gene expression through RNA nuclear retention. *Cell* 123, 249-263.
- Ramasamy, S., Wang, H., Quach, H. N., and Sampath, K. (2006). Zebrafish Staufen1 and Staufen2 are required for the survival and migration of primordial germ cells. *Dev Biol*.

- Ramos, A., Bayer, P., and Varani, G. (1999). Determination of the structure of the RNA complex of a double-stranded RNA-binding domain from *Drosophila* Staufen protein. *Biopolymers* 52, 181-196.
- Ramos, A., Grunert, S., Adams, J., Micklem, D. R., Proctor, M. R., Freund, S., Bycroft, M., St Johnston, D., and Varani, G. (2000). RNA recognition by a Staufen double-stranded RNA-binding domain. *Embo J* 19, 997-1009.
- Riechmann, V., and Ephrussi, A. (2001). Axis formation during *Drosophila* oogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 11, 374-383.
- Rueter, S. M., Dawson, T. R., and Emeson, R. B. (1999). Regulation of alternative splicing by RNA editing. *Nature* 399, 75-80.
- Ryter, J. M., and Schultz, S. C. (1998). Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA. *Embo J* 17, 7505-7513.
- Sagliocco, F. A., Zhu, D., Vega Laso, M. R., McCarthy, J. E., Tuite, M. F., and Brown, A. J. (1994). Rapid mRNA degradation in yeast can proceed independently of translational elongation. *J Biol Chem* 269, 18630-18637.
- Saunders, L. R., and Barber, G. N. (2003). The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions. *Faseb J* 17, 961-983.
- Schupbach, T., and Wieschaus, E. (1986). Germline autonomy of maternal-effect mutations altering the embryonic body pattern of *Drosophila*. *Dev Biol* 113, 443-448.
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199-208.

- Sharp, T. V., Moonan, F., Romashko, A., Joshi, B., Barber, G. N., and Jagus, R. (1998). The vaccinia virus E3L gene product interacts with both the regulatory and the substrate binding regions of PKR: implications for PKR autoregulation. *Virology* 250, 302-315.
- Short, J. D., and Pfarr, C. M. (2002). Translational regulation of the JunD messenger RNA. *J Biol Chem* 277, 32697-32705.
- Smalheiser, N. R., and Torvik, V. I. (2006). Alu elements within human mRNAs are probable microRNA targets. *Trends Genet* 22, 532-536.
- Snee, M. J., Arn, E. A., Bullock, S. L., and Macdonald, P. M. (2005). Recognition of the bcd mRNA localization signal in *Drosophila* embryos and ovaries. *Mol Cell Biol* 25, 1501-1510.
- Srivastava, A. K., and Schlessinger, D. (1990). Mechanism and regulation of bacterial ribosomal RNA processing. *Annu Rev Microbiol* 44, 105-129.
- St Johnston, D., Beuchle, D., and Nusslein-Volhard, C. (1991). Stauf, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* 66, 51-63.
- Staley, J. P., and Guthrie, C. (1998). Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell* 92, 315-326.
- Stamm, S., Ben-Ari, S., Rafalska, I., Tang, Y., Zhang, Z., Toiber, D., Thanaraj, T. A., and Soreq, H. (2005). Function of alternative splicing. *Gene* 344, 1-20.
- Steward, O., Wallace, C. S., Lyford, G. L., and Worley, P. F. (1998). Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* 21, 741-751.

- Steward, O., and Worley, P. (2002). Local synthesis of proteins at synaptic sites on dendrites: role in synaptic plasticity and memory consolidation? *Neurobiol Learn Mem* 78, 508-527.
- Steward, O., and Worley, P. F. (2001). Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation. *Neuron* 30, 227-240.
- Sun, W., Jun, E., and Nicholson, A. W. (2001a). Intrinsic double-stranded-RNA processing activity of Escherichia coli ribonuclease III lacking the dsRNA-binding domain. *Biochemistry* 40, 14976-14984.
- Sun, X., Li, X., Moriarty, P. M., Henics, T., LaDuca, J. P., and Maquat, L. E. (2001b). Nonsense-mediated decay of mRNA for the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is detectable in cultured cells but masked or inhibited in rat tissues. *Mol Biol Cell* 12, 1009-1017.
- Tang, S. J., Meulemans, D., Vazquez, L., Colaco, N., and Schuman, E. (2001). A role for a rat homolog of staufen in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron* 32, 463-475.
- Tenenbaum, S. A., Carson, C. C., Lager, P. J., and Keene, J. D. (2000). Identifying mRNA subsets in messenger ribonucleoprotein complexes by using cDNA arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14085-14090.
- Thomas, M. G., Martinez Tosar, L. J., Loschi, M., Pasquini, J. M., Correale, J., Kindler, S., and Boccaccio, G. L. (2005). Staufen recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes. *Mol Biol Cell* 16, 405-420.
- Thomis, D. C., and Samuel, C. E. (1993). Mechanism of interferon action: evidence for intermolecular autophosphorylation and autoactivation of the interferon-induced, RNA-dependent protein kinase PKR. *J Virol* 67, 7695-7700.

- Thomis, D. C., and Samuel, C. E. (1995). Mechanism of interferon action: characterization of the intermolecular autophosphorylation of PKR, the interferon-inducible, RNA-dependent protein kinase. *J Virol* 69, 5195-5198.
- Townley-Tilson, W. H., Pendergrass, S. A., Marzluff, W. F., and Whitfield, M. L. (2006). Genome-wide analysis of mRNAs bound to the histone stem-loop binding protein. *Rna* 12, 1853-1867.
- Uchida, N., Hoshino, S., and Katada, T. (2004). Identification of a human cytoplasmic poly(A) nuclease complex stimulated by poly(A)-binding protein. *J Biol Chem* 279, 1383-1391.
- Unterholzner, L., and Izaurralde, E. (2004). SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. *Mol Cell* 16, 587-596.
- Villace, P., Marion, R. M., and Ortin, J. (2004). The composition of Staufen-containing RNA granules from human cells indicates their role in the regulated transport and translation of messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 32, 2411-2420.
- Wagner, B. J., DeMaria, C. T., Sun, Y., Wilson, G. M., and Brewer, G. (1998). Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms. *Genomics* 48, 195-202.
- Wagner, C., Palacios, I., Jaeger, L., St Johnston, D., Ehresmann, B., Ehresmann, C., and Brunel, C. (2001). Dimerization of the 3'UTR of bicoid mRNA involves a two-step mechanism. *J Mol Biol* 313, 511-524.
- Waris, G., Sarker, S., and Siddiqui, A. (2004). Two-step affinity purification of the hepatitis C virus ribonucleoprotein complex. *Rna* 10, 321-329.

- Wickham, L., Duchaine, T., Luo, M., Nabi, I. R., and DesGroseillers, L. (1999). Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 19, 2220-2230.
- Winstall, E., Gamache, M., and Raymond, V. (1995). Rapid mRNA degradation mediated by the c-fos 3' AU-rich element and that mediated by the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor 3' AU-rich element occur through similar polysome-associated mechanisms. *Mol Cell Biol* 15, 3796-3804.
- Zenklusen, D., and Stutz, F. (2001). Nuclear export of mRNA. *FEBS Lett* 498, 150-156.
- Zhang, F., Romano, P. R., Nagamura-Inoue, T., Tian, B., Dever, T. E., Mathews, M. B., Ozato, K., and Hinnebusch, A. G. (2001). Binding of double-stranded RNA to protein kinase PKR is required for dimerization and promotes critical autophosphorylation events in the activation loop. *J Biol Chem* 276, 24946-24958.
- Zhang, S., and Grosse, F. (1997). Domain structure of human nuclear DNA helicase II (RNA helicase A). *J Biol Chem* 272, 11487-11494.
- Zhao, C., York, A., Yang, F., Forsthoefel, D. J., Dave, V., Fu, D., Zhang, D., Corado, M. S., Small, S., Seeger, M. A., and Ma, J. (2002). The activity of the *Drosophila* morphogenetic protein Bicoid is inhibited by a domain located outside its homeodomain. *Development* 129, 1669-1680.
- Zhong, J., Peters, A. H., Lee, K., and Braun, R. E. (1999). A double-stranded RNA binding protein required for activation of repressed messages in mammalian germ cells. *Nat Genet* 22, 171-174.

Annexes

Annexe 1

Staufen1 est une phosphoprotéine

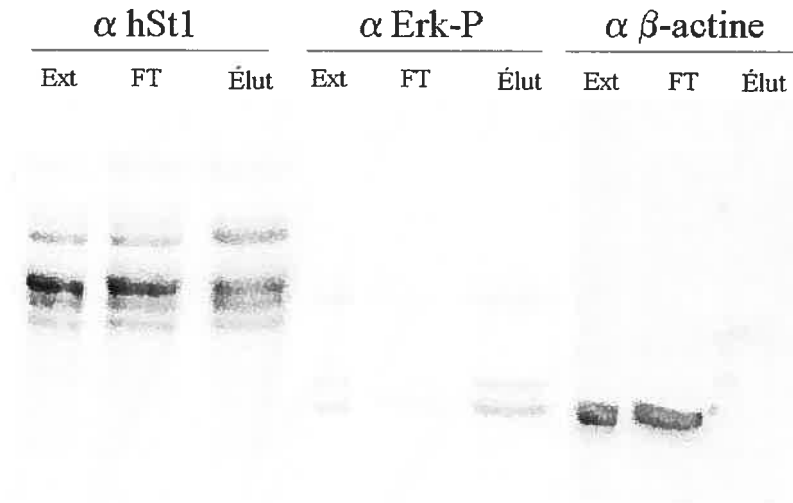


Figure 1 : Staufen est une phosphoprotéine.

Le kit d'isolation de phosphoprotéines (Qiagen) a été utilisé pour séparer les protéines phosphorylées et non-phosphorylées à partir d'extraits de cellules 293T. L'analyse des fractions recueillies après chromatographie a été effectuée par immunobuvardage de type *Western*. L'état de phosphorylation de trois protéines a été testé, soit hStau1, Erk et l'actine β . (Ext : extrait total avant chromatographie; FT : *flow thru*; Élut : élution) Nous pouvons voir que hStau1 est retrouvé sous la forme phosphorylée et non-phosphorylée en utilisant un anticorps monoclonal de souris dirigé contre hStau1. L'utilisation d'un anticorps spécifique à la forme phosphorylée de Erk montre que Erk phosphorylé est préférentiellement retrouvé dans la fraction de protéines liées à la colonne. À l'inverse, un anticorps dirigé contre l'actine β montre que cette protéine n'est pas phosphorylée. Ces deux dernières protéines ont été testées pour démontrer que ces colonnes permettent vraiment une séparation efficace des protéines cellulaires selon leur état de phosphorylation.

Annexe 2

Analyse semi-quantitative de l'association de Stau1 au SBS de Arf1

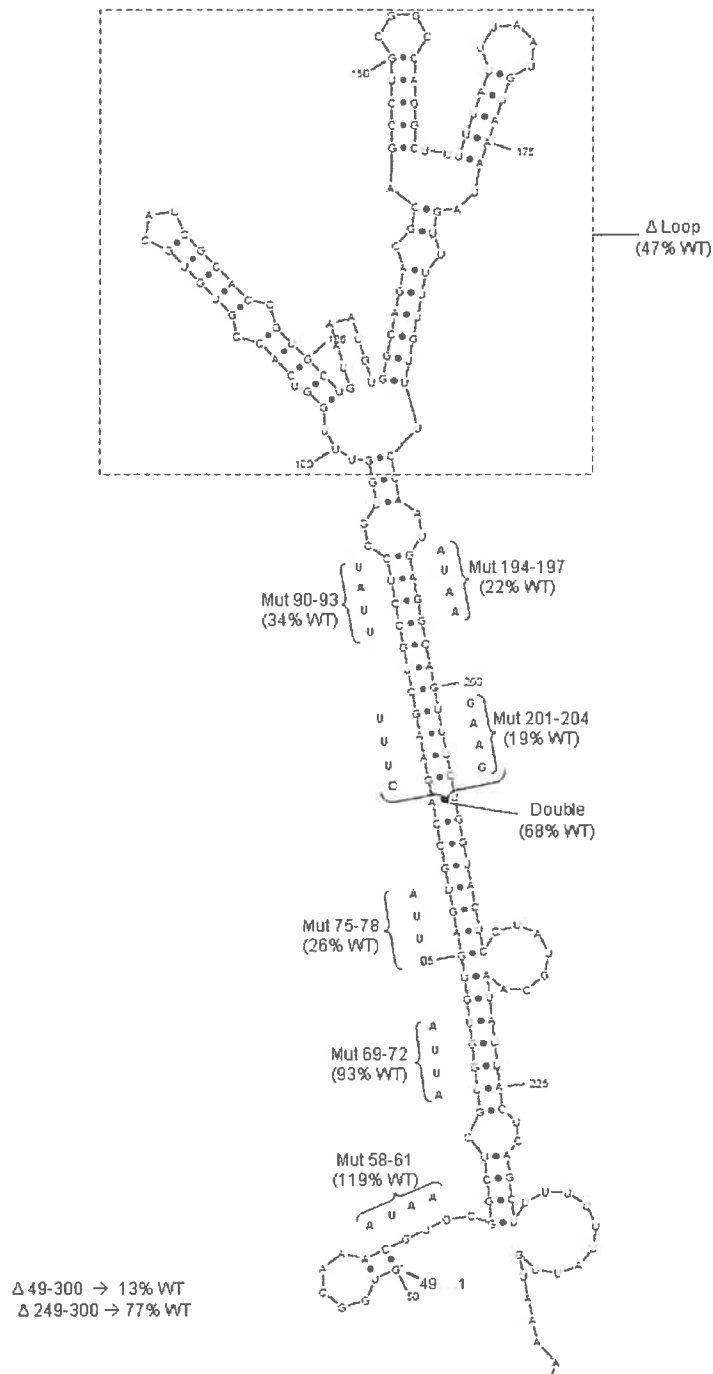


Figure 2 : Structure modélisée du SBS de Arf1

Représentation des mutations introduites dans la structure prédite du SBS de Arf1 et pourcentages de liaison des divers mutants par rapport au SBS de type sauvage.

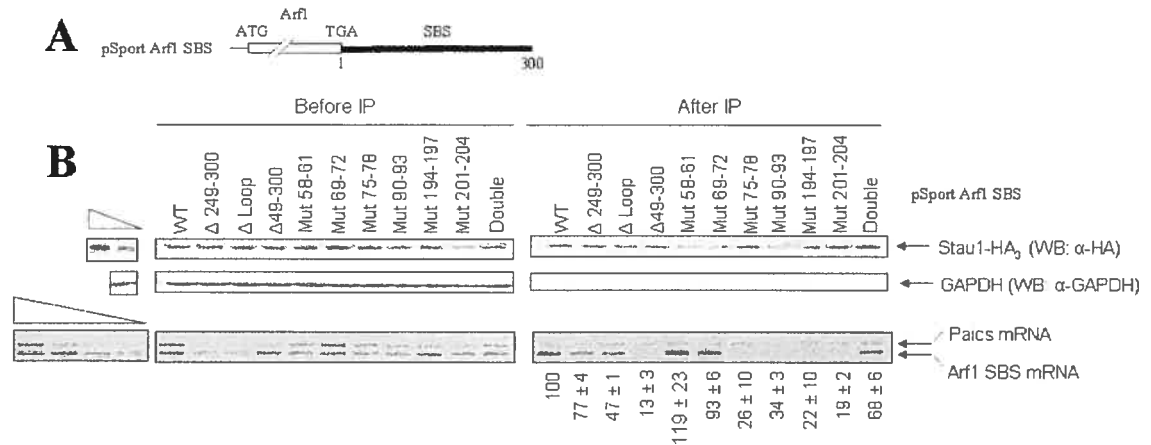


Figure 3 : Analyse semi-quantitative de l'association de Stau1 au SBS de Arf1

Des cellules 293 ont été transfectées de manière transitoire avec pCDNA3-Stau1-HA, ainsi qu'avec un des onze plasmides pSport-Arf1-SBS (A) suivants exprimant diverses délétions et mutations du SBS de Arf1, soit les constructions WT (type sauvage), Δ 249-300, Δ Loop, Δ 49-300, Mut 58-61, Mut 68-72, Mut 75-78, Mut 90-93, Mut 194-197, Mut 201-204 et Double. Le plasmide pSport-Paics exprimant l'ARNm entier de la carboxylase du phosphoribosylaminoimidazole et la synthétase du succinocarboxamide phosphoribosylaminoimidazole a été transfecté en combinaison avec chacun des plasmides pSport-Arf1-SBS et sert de contrôle positif de liaison à Stau1. 48 heures après la transfection les cellules ont été lysées et une fraction du lysat a servi à extraire les protéines et l'ARN pour analyse des ratios « avant IP ». L'autre fraction des lysats a été incubée avec un anticorps anti-HA pour immunoprécipiter Stau1. Après IP, le contenu en protéines et ARN a été extrait pour analyse des ratios « après IP ». (B) L'analyse par immunobuvardage de type *Western* montre que les IP sont spécifiques, puisque GAPDH n'est pas co-immunoprécipité avec Stau1-HA. L'analyse semi-quantitative du ratio entre Arf1 et Paics a été réalisée par RT-PCR. Les pourcentages représentent le rapport de l'intensité Arf1/Paics « après IP » sur le rapport Arf1/Paics « avant IP ».

Annexe 3

Analyse semi-quantitative de l'association de Stau1 au SBS de STMN3

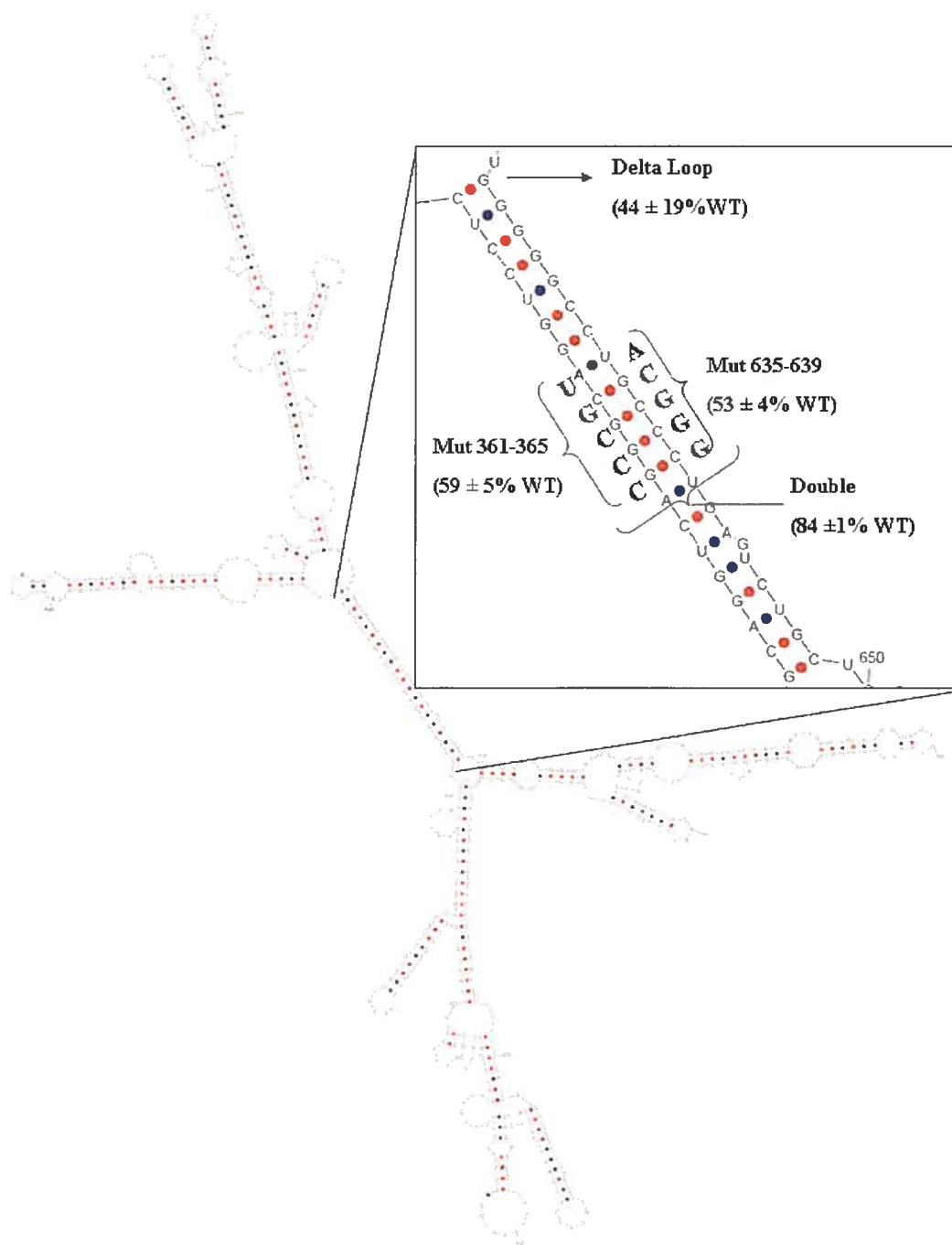


Figure 4 : Structure modélisée du SBS de STMN3

Représentation des mutations introduites dans la structure prédite du SBS de STMN3 et pourcentages de liaison des divers mutants par rapport au SBS de type sauvage.

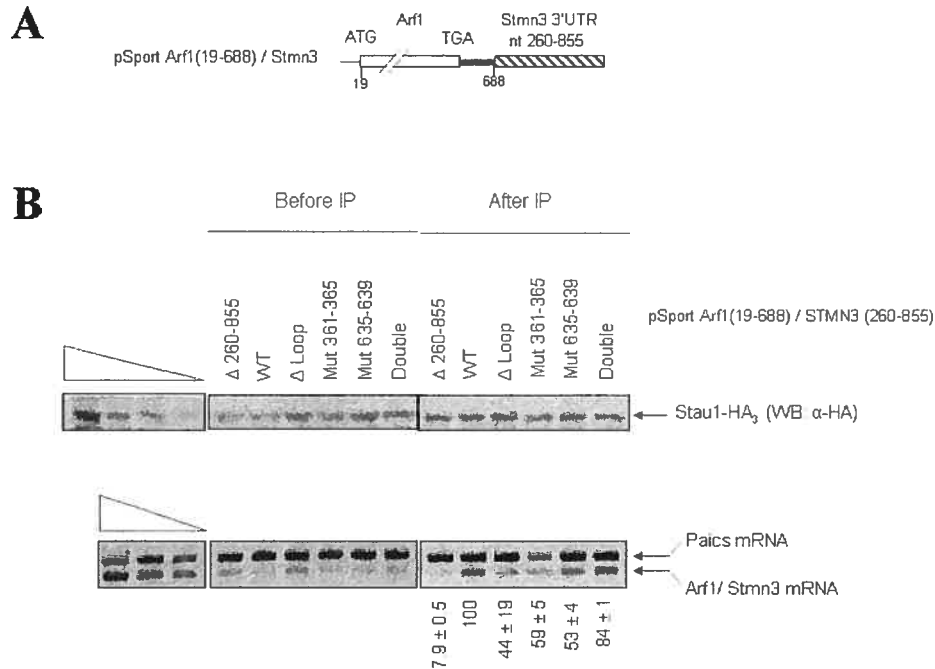


Figure 5 : Analyse semi-quantitative de l'association de Stau1 au SBS de STMN3

Des cellules 293 ont été transfectées de manière transitoire avec pCDNA3-Stau1-HA, ainsi qu'avec un des six plasmides pSport-Arf1-STMN3 (A) suivants exprimant diverses délétions et mutations du SBS de STMN3, soit les constructions WT (type sauvage), Δ 260-855, Δ Loop, Mut 361-365, Mut 635-639 et Double. Le plasmide pSport-Paics exprimant l'ARNm entier de la carboxylase du phosphoribosylaminoimidazole et la synthétase du succinocarboxamide phosphoribosylaminoimidazole a été transfecté en combinaison avec chacun des plasmides pSport-Arf1-STMN3 et sert de contrôle positif de liaison à Stau1. 48 heures après la transfection les cellules ont été lysées et une fraction du lysat a servi à extraire les protéines et l'ARN pour analyse des ratios « avant IP ». L'autre fraction des lysats a été incubée avec un anticorps anti-HA pour immunoprécipiter Stau1. Après IP, le contenu en protéines et ARN a été extrait pour analyse des ratios « après IP ». (B) L'analyse semi-quantitative du ratio entre Arf1 et Paics a été réalisée par RT-PCR. Les pourcentages représentent le ratio de l'intensité Arf1/Paics « après IP » sur le ratio Arf1/Paics « avant IP ».