

Université de Montréal

**Identification de modifications post-traductionnelles de
Staufen1 et étude de leur fonction régulatrice**

par

Karine Boulay

Département de biochimie

Faculté de médecine

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

Août 2012

© Karine Boulay, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Identification de modifications post-traductionnelles de Staufen1 et étude de leur fonction
régulatrice

présentée par :
Karine Boulay

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Pascal Chartrand, président-rapporteur
Dr Luc DesGroseillers, directeur de recherche
Dr Muriel Aubry, membre du jury
Dr Imed Gallouzi, examinateur externe
Dr Gertraud Burger, représentante du doyen de la FES

Résumé

La régulation post-transcriptionnelle joue un rôle de premier plan dans le contrôle fin de l'expression génique en permettant une modulation de la synthèse de protéines dans le temps et l'espace, en fonction des besoins de la cellule. Ainsi, des protéines reconnaissant des éléments d'ARN présents sur des transcrits peuvent influencer toutes les étapes de leur existence, soit leur épissage, leur export nucléaire, leur localisation subcellulaire, leur traduction et leur dégradation. Staufen1 (Stau1) est un membre de la famille des protéines liant l'ARN double-brin qui contribue à la régulation post-transcriptionnelle par son implication dans des mécanismes qui vont promouvoir l'épissage alternatif, le transport, la dé-répression de la traduction et l'induction de la dégradation d'ARN messagers (ARNm) spécifiques. L'identité des cibles potentielles de Stau1 est maintenant connue puisqu'une étude à l'échelle du génome a montré que la protéine s'associe à près de 7% du transcriptome des cellules HEK293T. Ces ARNm se classent dans un large éventail de catégories fonctionnelles, mais il est tout de même intéressant de noter qu'une grande proportion d'entre eux code pour des protéines reliées au métabolisme cellulaire et à la régulation de processus cellulaires. En considérant toutes ces informations, nous avons émis l'hypothèse que les différentes activités de Stau1 puissent être modulées afin de contrôler adéquatement l'expression des transcrits liés par la protéine.

Dans la mesure où certains ARNm faisant partie des complexes définis par la présence de Stau1 codent pour des régulateurs clés de la prolifération cellulaire, nous avons voulu examiner si l'expression de la protéine varie au cours du cycle de division cellulaire. Nous avons montré que l'abondance de Stau1 est maximale en début de mitose et qu'elle diminue ensuite lorsque les cellules complètent la division cellulaire. Nous avons ensuite découvert que cette baisse d'expression de Stau1 en sortie de mitose dépend du complexe promoteur d'anaphase/cyclosome (APC/C). En soutien à l'idée que Stau1 soit une cible de cette ubiquitine ligase de type E3, nous avons de plus démontré que Stau1 est ubiquitiné et dégradé par le protéasome. Ce contrôle des niveaux de Stau1 semble important puisque la

surexpression de la protéine retarde la sortie de mitose et entraîne une diminution importante de la prolifération cellulaire.

Par ailleurs, nous avons supposé que les différentes fonctions de Stau1 puissent également être sujettes à une régulation. Compte tenu que les activités de nombreuses protéines liant l'ARN peuvent être contrôlées par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, nous avons voulu tester la possibilité que Stau1 soit phosphorylé. L'immunopurification de Stau1 et son analyse par spectrométrie de masse nous a permis d'identifier trois phosphosites dans la protéine. L'évaluation du rôle de ces événements de phosphorylation à l'aide de mutants phosphomimétiques ou non-phosphorylables a révélé que la modification de Stau1 pourrait compromettre son association à la protéine UPF1. Comme cette interaction est nécessaire pour déstabiliser les transcrits liés par Stau1, nos résultats suggèrent fortement que la fonction de Stau1 dans la dégradation d'ARNm est régulée négativement par sa phosphorylation.

Toutes ces données mettent en lumière l'importance des modifications post-traductionnelles telles que l'ubiquitination et la phosphorylation dans la modulation de l'expression et des fonctions de Stau1. Somme toute, il est vraisemblable que ces mécanismes de contrôle puissent avoir un impact significatif sur le destin des ARNm liés par Stau1, particulièrement dans un contexte de progression dans le cycle cellulaire.

Mots-clés : Staufen, ARN messager, régulation post-transcriptionnelle, cycle cellulaire, complexe promoteur d'anaphase/cyclosome (APC/C), ubiquitination, phosphorylation.

Abstract

Post-transcriptional regulation plays a major role in the fine tuning of gene expression by allowing a modulation of protein synthesis in space and time, according to cellular requirements. For instance, proteins recognizing RNA elements on transcripts can influence all the steps of their existence, such as their splicing, nuclear export, subcellular localization, translation and degradation. Stau1 (Stau1) is a member of the double-stranded RNA-binding protein family that contributes to the post-transcriptional regulation of gene expression by its involvement in mechanisms that promote alternative splicing, transport, de-repression of translation and decay of specific messenger RNAs (mRNAs). The identity of potential Stau1 targets is now known as genome-wide analyses have shown that the protein is associated with about 7% of the HEK293T cell transcriptome. Although these mRNAs are classified in a broad range of functional categories, a large proportion of them code for proteins related to cellular metabolism and regulation of cellular processes. Considering all this information, we hypothesized that the different activities of Stau1 may be modulated in order to control appropriately the expression of Stau1-bound mRNAs.

Since some of the mRNAs that are part of Stau1-containing complexes encode key regulators of cell proliferation, we wanted to examine whether Stau1 expression fluctuates during the cell division cycle. We showed that Stau1 abundance peaks at the onset of mitosis and then decreases as cells complete division. We then found that Stau1 down-regulation in mitosis exit is mediated by the anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C). To support the idea that Stau1 is a target of this E3-ubiquitin ligase, we further demonstrated that Stau1 is ubiquitinated and degraded by the proteasome. The importance of controlling Stau1 levels during the cell cycle is underscored by the observation that its overexpression delays mitotic exit and impairs cell proliferation.

Furthermore, we speculated that Stau1 different functions may also be regulated. In the view that the activities of numerous RNA-binding proteins can be controlled by post-

translational modifications such as phosphorylation, we tested the possibility that Stau1 is phosphorylated. Mass spectrometry analysis of immunopurified Stau1 allowed the identification of three phosphosites in this protein. Assessment of the role of these phosphorylation events using phosphomimetic or non-phosphorylatable mutants revealed that Stau1 phosphorylation may compromise its association with Upf1. Because this interaction is necessary to elicit the destabilisation of Stau1-bound RNAs, our results strongly suggest that Stau1 function in mRNA decay is negatively regulated by its phosphorylation.

Collectively, these data highlight the importance of post-translational modifications such as ubiquitination and phosphorylation in the modulation of Stau1 expression and functions. Overall, the mechanisms that control Stau1 are likely to have a significant impact on the fate of Stau1-bound mRNAs, especially in the context of cell cycle progression.

Keywords : Staufen, messenger RNA, post-transcriptional regulation, cell cycle, anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C), ubiquitination, phosphorylation.

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	xiii
Liste des figures.....	xiv
Abréviations.....	xvi
Remerciements.....	xx
1. Introduction.....	1
1.1 Régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique.....	2
1.1.1 Épissage.....	3
1.1.1.1 Principes de base.....	3
1.1.1.2 Épissage alternatif.....	5
1.1.2 Export nucléaire.....	8
1.1.2.1 Export nucléaire par NXF1-p15.....	8
1.1.2.2 Régulation de l'export via des modifications post-traductionnelles.....	10
1.1.2.3 Voies alternatives.....	11
1.1.3 Localisation d'ARNm.....	12
1.1.3.1 Mécanismes de localisation d'ARNm.....	12
1.1.3.2 Localisation d'ARNm et développement.....	14
1.1.3.3 Localisation d'ARNm et division cellulaire asymétrique.....	16
1.1.3.4 Localisation d'ARNm et motilité cellulaire.....	17
1.1.3.5 Localisation d'ARNm et plasticité synaptique.....	18
1.1.3.6 Localisation d'ARNm et structures cellulaires.....	19
1.1.4 Traduction.....	20
1.1.4.1 Initiation.....	21
1.1.4.2 Élongation.....	24
1.1.4.3 Terminaison et recyclage du ribosome.....	24

1.1.4.4	Contrôle traductionnel.....	25
1.1.4.5	Exemples de mécanismes de contrôle traductionnel globaux.....	25
1.1.4.6	Exemple de mécanismes de contrôle traductionnel spécifiques	28
1.1.4.6.1	Contrôle par encombrement stérique	28
1.1.4.6.2	Sites internes d'entrée du ribosome (IRES).....	28
1.1.4.6.3	Inhibition du recrutement du complexe de pré-initiation	29
1.1.4.6.4	Inhibition du recrutement d'eIF4F	29
1.1.4.6.5	Mécanismes de contrôle ciblant eIF4E	29
1.1.4.6.6	Mécanismes de contrôle ciblant eIF4G	30
1.1.4.6.7	Inhibition du recrutement de la grande sous-unité ribosomique	31
1.1.4.6.8	Mécanismes de contrôle post-initiation.....	33
1.1.5	Dégradation d'ARNm	33
1.1.5.1	Machinerie de dégradation.....	33
1.1.5.2	Éléments d'instabilité.....	35
1.1.5.3	Dégradation induite par les miARN.....	37
1.1.5.4	Dégradation induite par codon non-sens.....	37
1.2	Hypothèse de l'opéron post-transcriptionnel	40
1.2.1	Hypothèse de l'opéron post-transcriptionnel ou régulons d'ARN.....	41
1.2.2	Observations qui soutiennent l'hypothèse du régulon d'ARN.....	42
1.2.3	Exemples de régulons d'ARN potentiels.....	43
1.2.4	Rôle central des protéines liant l'ARN	45
1.3	Régulation post-traductionnelle des protéines liant l'ARN.....	46
1.3.1	Phosphorylation des protéines liant l'ARN	46
1.3.1.1	Modulation de la liaison d'ARN.....	47
1.3.1.2	Modulation des partenaires protéiques.....	47
1.3.1.3	Modulation de la localisation subcellulaire	49
1.3.1.4	Modulation de la stabilité.....	50
1.3.2	Ubiquitination des protéines liant l'ARN	50

1.3.2.1	Ubiquitine ligases et système ubiquitine-protéasome	51
1.3.2.2	Modulation de la stabilité des protéines liant l'ARN	54
1.3.2.3	Autres rôles de l'ubiquitination des protéines liant l'ARN	55
1.4	Régulation de l'expression génique et cycle cellulaire	56
1.4.1	Aperçu du cycle de division cellulaire	56
1.4.2	Mécanismes de régulation du cycle cellulaire	59
1.4.2.1	Cyclines et kinases dépendantes des cyclines	60
1.4.2.2	Ubiquitination par le complexe SCF	63
1.4.2.3	Ubiquitination par l'APC/C	64
1.4.3	Régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique et cycle cellulaire	70
1.5	La protéine Staufén, un régulateur post-transcriptionnel de l'expression génique	74
1.5.1	Rôles de Staufén chez la drosophile	74
1.5.2	Les protéines Staufén chez les mammifères	75
1.5.2.1	Comparaison des protéines Staufén des mammifères et de la drosophile	76
1.5.2.2	Description des différents isoformes de Stau1 et Stau2	76
1.5.3	Le dsRBD, un domaine essentiel aux fonctions de Staufén	78
1.5.3.1	Caractéristiques des dsRBD	78
1.5.3.2	Activité des dsRBD de Stau1	80
1.5.3.3	Liaison d'ARN par Stau1	82
1.5.4	Localisation subcellulaire de Stau1	83
1.5.4.1	Transit nucléocytoplasmique de Stau1	84
1.5.4.2	Association de Stau1 aux membranes et au cytosquelette	85
1.5.4.3	Stau1 est un composant de complexes ribonucléoprotéiques	86
1.5.5	Fonctions de Stau1 dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique	87
1.5.5.1	Stau1 est impliqué dans le transport d'ARNm	88
1.5.5.2	Stau1 dé-réprime la traduction de messagers	89
1.5.5.3	Stau1 est le médiateur d'une nouvelle voie de dégradation d'ARNm	92

1.5.5.4	Stau1 semble influencer l'épissage alternatif et pourrait de plus favoriser l'export nucléaire	93
1.5.6	Rôles physiologiques de Stau1	96
1.5.6.1	Stau1 et la différenciation cellulaire	96
1.5.6.2	Fonction de Stau1 dans l'établissement de la mémoire.....	97
1.5.6.3	Rôle de Stau1 dans la réplication du VIH-1.....	98
1.6	Hypothèses de recherche.....	98
2.	Résultats	100
2.1	Article 1: Cell cycle-dependent expression of Staufen1 is controlled by the anaphase promoting complex/cyclosome	100
2.1.1	Mise en contexte	100
2.1.2	Abstract	103
2.1.3	Introduction.....	104
2.1.4	Materials and methods	107
2.1.5	Results.....	112
2.1.6	Discussion	119
2.1.7	Acknowledgment	124
2.1.8	References.....	125
2.1.9	Figure legends.....	130
2.1.10	Figures.....	135
2.2	Article 2: Phosphorylation of Staufen1: a putative role in the regulation of Staufen1-mediated mRNA decay.....	142
2.2.1	Mise en contexte	142
2.2.2	Abstract	145
2.2.3	Introduction.....	146
2.2.4	Materials and methods	149
2.2.5	Results.....	155
2.2.6	Discussion.....	162

2.2.7	Acknowledgment	167
2.2.8	References	168
2.2.9	Figure legends	172
2.2.10	Figures	176
3.	Discussion	183
3.1	L'expression de Stau1 est régulée en fonction du cycle de division cellulaire..	183
3.1.1	Régulation de l'abondance de Stau1 en sortie de mitose : mécanisme proposé	184
3.1.1.1	Importance des co-activateurs de l'APC/C	184
3.1.1.2	Motifs impliqués dans la reconnaissance de Stau1 par l'APC/C	187
3.1.1.3	Ubiquitination de Stau1 par l'APC/C	191
3.1.2	L'expression de Stau1 est maximale en début de mitose.....	192
3.2	Stau1 est-il important pour la progression dans le cycle cellulaire?.....	194
3.2.1	Contributions potentielles de Stau1 au processus de division cellulaire.....	195
3.2.1.1	Liens possibles entre les fonctions moléculaires de Stau1 et le déroulement de la mitose	198
3.2.1.2	Implications possibles de Stau1 indépendantes de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique.....	202
3.2.2	Stau1 joue-t-il un rôle en phase G ₁ ?.....	203
3.3	Pourquoi le contrôle des niveaux de Stau1 est-il important pour la prolifération cellulaire?	204
3.4	Stau1 est potentiellement régulé par un mécanisme impliquant sa phosphorylation	207
3.4.1	Stau1 est une phosphoprotéine.....	207
3.4.1.1	Caractérisation des phosphosites identifiés.....	209
3.4.1.2	Y'a-t-il d'autres phosphosites dans Stau1 ⁵⁵ ?	212
3.4.1.3	Quelles sont les kinases impliquées dans la phosphorylation de Stau1?	215
3.4.1.4	Est-ce que la phosphorylation de Stau1 est un processus réversible?....	216

3.4.2	Rôle présumé de la phosphorylation du TBD de Stau1 dans la régulation du SMD	216
3.4.2.1	La phosphorylation de Stau1 pourrait bloquer son interaction avec UPF1	217
3.4.2.2	Est-ce que la phosphorylation du TBD de Stau1 inhibe le SMD?	218
3.4.2.3	Régulation du SMD au cours du cycle cellulaire.....	220
3.4.3	La phosphorylation de Stau1 remplit-elle d'autres fonctions?	221
3.4.3.1	Existe-t-il un lien entre la phosphorylation et la stabilité de Stau1?.....	222
Annexes.....		I
Annexe I: Liste des contributions à d'autres articles que ceux inclus dans cette thèse.		I
Annexe II: Article		II
Annexe III: Tableaux relatifs à la discussion.....		XLIII

Liste des tableaux

Introduction

Tableau I : Exemples de régulation post-transcriptionnelle de gènes jouant des rôles dans la progression dans le cycle de division cellulaire et dans la prolifération cellulaire.....73

Résultats

Article 2

Tableau I: Phosphorylated Stau1 peptides detected by mass spectrometry.182

Annexes

Annexe 3

Tableau I : Liste des ARNm associés à Stau1 en prométaphase.....XLIII

Tableau II: Liste des ARNm associés à la fois avec Stau1 en prométaphase et avec le fuseau mitotique (Blower M. et al 2007).LXVII

Tableau III: ARNm associés à Stau1 en prométaphase qui codent pour des protéines avec des fonctions connues en mitose.LXIX

Liste des figures

Introduction

Figure 1: Représentation schématique du processus d'épissage d'ARNm.	4
Figure 2: Déposition d'un EJC sur un ARNm épissé.	7
Figure 3: Voie générale d'export nucléaire des ARNm.	9
Figure 4: Localisation d'ARNm de déterminants maternels dans l'ovocyte de drosophile.	15
Figure 5: Initiation de la traduction chez les eucaryotes.	23
Figure 6: Exemples de mécanismes spécifiques d'inhibition de l'initiation de la traduction.	32
Figure 7: Voies de dégradation des ARNm de mammifères.	35
Figure 8: Modèle proposé pour le NMD de mammifères.	39
Figure 9: Représentation schématique du système ubiquitine-protéasome.	53
Figure 10: Représentation schématique du cycle cellulaire de mammifères.	59
Figure 11: Périodes d'activité des différentes Cdk au cours du cycle cellulaire de mammifères.	63
Figure 12: Périodes d'activité des E3 ubiquitines ligases SCF et APC/C au cours du cycle cellulaire.	69
Figure 13 : Représentation schématique de l'organisation des domaines fonctionnels des différents isoformes des protéines Stau humaines en relation avec la protéine Staufen de drosophile.	77
Figure 14 : Structure du dsRBD3 de Staufen de drosophile en complexe avec une tige-boucle d'ARN déterminée par RMN à haute résolution.	79
Figure 15: Aperçu des différentes fonctions de Stau1 dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique.	96

Résultats

Article 1

Figure 1: Stau1 protein levels vary during the cell cycle.	136
Figure 2: Stau1 expression peaks in late G2/early mitosis and then declines as cells complete division.	137
Figure 3: Stau1 is a substrate of the ubiquitin proteasome system.	138
Figure 4: Stau1 down-regulation during mitotic exit is dependent on the APC/C activator Cdh1.....	139
Figure 5: Stau1 down-regulation is dependent on a D-box motif.	140
Figure 6: Expression of Stau1 ⁵⁵ -Dmut-HA3 delays exit from mitosis.	141
Figure 7: Stau1 ⁵⁵ overexpression impairs cell proliferation.	142

Article 2

Figure 1: Stau1 is a phosphoprotein.	177
Figure 2: Purification of Stau155-FLAG for mass spectrometry analysis.	178
Figure 3: Distribution and conservation of phosphorylation sites in Stau1.	179
Figure 4: Characterization of phospho-mimetic or non-phosphorylatable point mutants of Stau1 ⁵⁵	180
Figure 5: Phospho-mimetic mutations T291D and S309D impair Stau1-UPF1-binding. .	181
Figure 6: Stau1 interaction with UPF1 is reduced in mitotic cells.	182

Discussion

Figure 1: Stau1 interagit avec Cdh1 et Cdc20.....	186
Figure 2: La délétion des 88 premiers acides aminés de Stau1 l'empêche de s'associer à Cdh1.	191
Figure 3: La diminution des niveaux endogènes de Stau1 n'affecte pas la prolifération cellulaire.	198
Figure 4: Le point isoélectrique des isoformes de Stau1 varie durant le cycle cellulaire. .	212

Abréviations

ADN:	Acide désoxyribonucléique
APC/C:	Complexe promoteur d'anaphase/cyclosome
Arf1:	"ADP-ribosylation factor 1"
ARN:	Acide ribonucléique
ARNm:	ARN messenger
ARNt:	ARN de transfert
ATP:	Adénosine triphosphate
AU:	Adénine et Uracile
Bcd:	Bicoid
Cdk:	Kinase dépendante des cyclines
CKII:	Caséine kinase II
CKAP2 :	Protéine associée au cytosquelette 2
CPE:	Élément de polyadénylation cytoplasmique
DAPI:	4',6'-diamidino-2-phénylindole
D box:	Boîte de dégradation
DM1 :	Dystrophie musculaire myotonique de type 1
DMPK :	Protéine kinase dystrophia myotonica
DNA-PK:	Protéine kinase dépendante de l'ADN
dsRBD:	Domaine de liaison à l'ARN double-brin
DUB:	"Deubiquitinating enzymes"
eEF:	Facteur d'élongation eucaryote
eIF:	Facteur d'initiation eucaryote
eRF:	Facteur de terminaison eucaryote
EKR1:	"Extracellular signal-regulated kinase 1"
Grk:	Gurken
GST :	Glutathione S-transférase
GTP:	Guanine triphosphate
hnRNP:	Ribonucléoprotéine hétérogène nucléaire

IR:	Récepteur de l'insuline
IRE:	Élément de réponse au fer
IRES:	Site interne d'entrée du ribosome
kDa:	kiloDalton
KEN box:	Boîte Lysine/Acide glutamique/Asparagine
MBP:	"Myelin basic protein"
MCC:	"Mitotic checkpoint complex"
miARN:	MicroARN
miRNP:	Particule micro-ribonucléoprotéique
mTOR:	"Mamalian target of rapamycin"
NIK:	Kinase induisant le facteur nucléaire NF- κ B
NMD:	Dégradation induite par codon non-sens
P-bodies:	"Processing bodies"
PolyA:	Polyadénosine
PP1:	Protéine phosphatase-1
Pros:	Prospero
PTC:	Codon stop prématuré
RHA:	ARN hélicase A
RNP:	Particule ribonucléoprotéique
RT-qPCR:	Transcription inverse-réaction en chaîne par polymérase quantitative
SAC:	"Spindle Assembly Checkpoint"
SBS:	Site de liaison de Stau1
SCF:	Complexe SKP1-Cul1-protéine F-box
SDS-PAGE:	Gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
Ser:	Sérine
SIDA:	Syndrome d'immunodéficience acquise
SMD:	"Staufen mediated decay"
SnARN:	Petit ARN nucléaire
SnRNP:	Petites particules ribonucléoprotéiques nucléaires
SR:	Protéines riches en sérines et arginines

Stau:	Staufen
TBD:	Domaine de liaison à la tubuline
Thr:	Thréonine
Tyr:	Tyrosine
UTR:	Région non traduite
VIH-1:	Virus de l'immunodéficience humaine de type 1
YFP:	Protéine jaune fluorescente
ZBP1:	"Zipcode binding protein 1"

À tous ceux qui ont cru en moi

Remerciements

C'est maintenant le dénouement d'un cycle qui approche. Tout cela ne s'est certainement pas déroulé comme je m'y attendais et s'est sans doute quelque peu éternisé vers la fin. Cependant, tout ce temps passé dans les couloirs du département de biochimie m'a permis de faire une série de belles rencontres qui ont très certainement influencé le cours de mes études au cycles supérieurs. Dans cette section, je tiens à rendre hommage à ces personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de cette thèse.

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Luc Desgroseillers, qui m'a accueillie dans son labo et m'a transmis son grand intérêt pour la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique. Je sais que tout le monde te l'a déjà dit, mais je te remercie pour ta grande disponibilité et ton écoute. Tu as également fait preuve d'une grande patience ainsi que de beaucoup de gentillesse et cela aura fait toute la différence. J'ai apprécié ton ouverture d'esprit et la confiance que tu m'as accordée, cela m'a beaucoup touchée. Tu auras été tout le contraire du cliché du patron tyrannique dont on entend souvent parler en science. Bref, je te remercie pour ta grande humanité.

Je tiens également à souligner l'importance des organismes subventionnaires qui ont financé les projets auxquels j'ai participé, soit le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie (CRSNG) et les Instituts de Recherche en Santé du Canada (IRSC). Je remercie également le CRNSG, le Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) et la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales (FESP) de l'université de Montréal pour les bourses qu'ils m'ont octroyées.

Je veux remercier les employés du département de biochimie de l'université de Montréal pour leur soutien précieux. Mentions spéciales à Louise Cournoyer pour son aide en culture cellulaire et à Sylvie Beauchemin pour son avoir rendue plus simple toute la paperasse administrative de l'université.

Je souhaite remercier tous mes collègues avec qui j'ai relevé ce défi et qui ont contribué à le rendre moins imposant. Tout d'abord, je voudrais remercier Thomas Duchaine pour avoir pris de son temps précieux de rédaction de thèse pour me former l'été de mon arrivée au laboratoire. Maintenant, je comprends! Merci également à George Elvira et Demian Barbas pour leur grand sens de l'humour qui a mis de la joie dans ce processus sérieux qu'est un doctorat. Merci à Catherine Martel pour sa grande intensité autant dans le laboratoire que dans les soirées qui suivaient nos dures journées de labeur. Enfin, merci à Luc Furic pour son grand amour pour la science qu'il a su transmettre autour de lui. En passant, Luc, je te pardonne même si tu m'as fait pleurer!

J'aimerais également remercier d'anciens membres du laboratoire que j'ai eu la chance de côtoyer plus longuement. Merci tout d'abord à Samuel Dugré-Brisson avec qui j'ai eu le privilège de collaborer sur plusieurs projets. Je n'oublierai jamais tous ces repas du midi passés ensemble à comparer nos lunchs fait à partir de recettes de Ricardo. Ta témérité m'a beaucoup inspirée. Merci à Marjolaine Maher-Laporte, surtout pour sa fraîcheur et sa grande naïveté. J'aurai passé de nombreux bons moments avec toi, autant dans le labo qu'à l'extérieur. Même si tu es passée du côté obscur de la force, je t'aime quand même. Merci à Wildriss Viranaicken pour son sens de l'innovation qui a eu de grandes répercussions sur l'orientation de mes projets de recherche. Je te suis redevable de beaucoup de choses et sans toi, les sujets abordés dans cette thèse seraient très certainement différents. Merci à Gabriel Lapointe pour sa grande générosité. J'ai beaucoup apprécié que tu sois toujours disponible pour aider tout le monde. Merci à Maria Sanchez pour sa grande sagesse. Merci à Céline Fréchina, Linda Huang et Frédérique Badeaux pour leur soutien technique. Mention spéciale à Linda pour toutes ses contributions au frigo de la honte. Enfin, merci à Mireille Moreau qui, même si elle est passée rapidement au labo, a su apporter sa joie de vivre au 5e étage.

Je ne peux passer sous silence l'importance des membres actuels du laboratoire, même si certains ne sont là que depuis peu. Je tiens tout d'abord à remercier Véronique

Trépanier, l'autre ancienne du labo pour son apport à tous mes projets. Merci à ta spontanéité et à ton amour de la musique qui m'a permis de découvrir de belles choses. Merci à Mehdi Ghram pour sa grande curiosité scientifique et sa rigueur. J'espère que tu auras beaucoup de plaisir à continuer les projets. Merci à Stéphanie Mollet pour sa compassion et son authenticité. Merci également à Rémy Beaujois pour son grand sens de l'humour et ses tentatives d'imiter l'accent québécois. Enfin, merci à Sacha Blain qui était aussi ordonnée que moi (...) et qui m'aura fait passer de bons moments de folie dans le labo.

J'ai aussi une petite pensée pour ces stagiaires d'été que j'ai eus à former. Merci donc à Mathieu Flamand, Maude Martin et Guillaume Caron, qui sans le savoir, m'ont permis d'apprendre beaucoup de choses sur l'encadrement en laboratoire ainsi que sur moi-même.

Je veux également remercier les anciens de l'aile A5 qui sans participer directement à mes projets, ont tout de même fait en sorte que j'étais heureuse de me présenter au laboratoire à chaque matin. Merci à Frédérick-Antoine Mallette et Mathieu St-Louis pour toutes ces fois où ils sont venus m'empêcher de travailler. Vous avez contribué à mettre une ambiance que je souhaiterais retrouver partout où je passerai. Je remercie également vos conjointes respectives, Véronique Bériault et Mélisa Albernhe-Lahaie, qui s'organisent souvent pour que l'on se revoie, même si vous avez quitté l'université pour relever de nouveaux défis. Pour les mêmes raisons, je remercie Élise Hébert.

Je tiens à remercier des collègues d'autres laboratoires qui m'ont aussi aidé dans mon cheminement. Merci aux gens du laboratoire de Gerardo Ferbeyre pour tous les réactifs et instruments partagés. Mention spéciale à Véronique Bourdeau pour sa grande patience pour répondre à mes questions et à Marie-France Gaumont-Leclerc pour tous les câlins réconfortants qu'elle a pu me faire au fil des années. Merci aux gens du laboratoire de Pascal Chartrand et en particulier Nicolas Paquin et Anne-Laure Finoux pour toutes les discussions de couloir que nous avons eues. Je souhaite remercier Xavier Mascle pour sa

grande disponibilité (peu importe le jour et l'heure, il est là!) et pour toutes ces conversations scientifiques que nous avons eues lors de mes passages au 3^e étage. Enfin, je souhaite remercier le Dr Nathalie Grandvaux, qui en plus d'être une amie, a toujours été là pour m'écouter et me conseiller, autant d'un point de vue scientifique que personnel.

Je voudrais remercier toute mon groupe de volley-ball, qui même s'ils n'ont pas de lien direct avec mon cheminement académique, ont fait en sorte que je respecte la formule suivante : « Un esprit sain dans un corps sain ».

Je souhaite rendre hommage à mes parents, René et Francine, qui m'ont toujours soutenu et ce inconditionnellement. Je vous remercie de m'avoir poussé à choisir une carrière que j'aime et d'avoir respecté mes décisions. Je vous suis également reconnaissante d'avoir toujours été là et d'avoir accepté de ne pas toujours comprendre ce que je fais. Je vous remercie pour les valeurs que vous m'avez transmises et pour m'avoir toujours affirmé que l'important, c'était que je fasse mon possible. Je souhaite également remercier mon frère et sa conjointe, Maxime et Sarah. Merci pour tous ces bons moments passés en famille, qui m'ont aidé à persévérer autant durant les hauts que durant les bas.

Pour conclure, je souhaite dédier cette thèse à une personne très spéciale qui pourrait pratiquement faire partie de toutes les catégories de personnes nommées précédemment. En effet, je veux remercier mon amoureux, Laurent Châtel-Chaix qui m'a accompagné dans toutes les épreuves que j'ai dû traverser durant mon doctorat. Je te remercie pour toutes ces soirées passées ensemble au laboratoire, personne d'autre que toi n'aurait pu comprendre les efforts que j'y ai mis. Je te remercie d'avoir été là dans les instants de doute, sans toi, je ne sais pas si j'y serais arrivée. Je sais que ça n'a pas dû être tous les jours facile et je te suis très reconnaissante d'avoir cru en moi et de m'avoir poussée à aller jusqu'au bout. Je t'aime et je n'oublierai jamais tout ce que tu as fait pour moi.

1. Introduction

Dans le but d'assurer leur survie, tous les organismes doivent être en mesure de moduler l'expression de leurs gènes afin de s'adapter à une panoplie de situations et maintenir leur homéostasie. Ceci est visible chez les organismes unicellulaires alors que la régulation de leur expression génique permet une réponse adéquate aux différentes conditions auxquelles ils sont exposés. Un phénomène similaire est observable chez les pluricellulaires puisque même si toutes les cellules somatiques d'un tel organisme possèdent le même bagage génétique, il est clair qu'un contrôle de l'expression des gènes permet leur croissance, leur division et leur différenciation (384). La régulation de l'expression est un concept démontré depuis les années 1960, alors que l'opéron bactérien a été identifié (239). Les opérons d'ADN facilitent la coordination spatio-temporelle de l'expression de gènes impliqués dans un même processus par l'intermédiaire de la transcription d'ARNm polycistroniques. Ces transcrits contiennent ainsi l'information nécessaire à la synthèse de plusieurs protéines faisant partie d'une voie commune.

Grâce à l'avènement de la technologie des micropuces d'ADN (160), il a été possible de montrer que l'expression des gènes est également hautement contrôlée chez les eucaryotes en fonction des besoins de la cellule et ce, malgré la quasi absence de gènes exprimés sous forme de polycistrons. Les micropuces d'ADN permettent d'identifier les gènes exprimés dans un type cellulaire en reflétant les niveaux d'ARNm présents dans la cellule. Il est établi que la modulation de la transcription par des facteurs se liant à des éléments promoteurs et répresseurs retrouvés dans le génome contribue grandement à l'expression coordonnée des gènes. Toutefois, les niveaux observés de certaines protéines ne sont pas toujours le reflet des quantités cellulaires d'ARNm qui codent pour ces dernières (174, 191, 202, 232, 506). La régulation post-transcriptionnelle est donc un mécanisme qui participe au contrôle fin de l'expression des gènes en aidant les cellules à s'adapter à leur environnement et à répondre à des signaux physiologiques.

Dans cette section, il sera question de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique. Ainsi, les différents événements qui succèdent à la transcription pour

mener ultimement à la synthèse des protéines seront décrits. L'hypothèse des régulateurs d'ARN sera ensuite exposée. Cette dernière suppose que la régulation de messagers qui codent pour des protéines fonctionnellement reliées ou qui partagent une localisation subcellulaire commune puisse être coordonnée, en fonction des besoins de la cellule. Ceci permettra de mettre en évidence le rôle central joué par les protéines liant l'ARN dans le contrôle de l'expression génique. D'ailleurs, la contribution des modifications post-traductionnelles à la modulation des fonctions des protéines liant l'ARN sera expliquée. Par la suite, le cycle de division cellulaire sera abordé puisqu'il s'agit d'un exemple illustrant bien l'importance de contrôler finement l'expression des gènes et ce à plusieurs niveaux. Enfin, les connaissances se rattachant au sujet principal de cette thèse, soit la protéine liant l'ARN Staufen1 (Stau1), seront présentées.

1.1 Régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique

Chez les procaryotes, la transcription et la traduction sont des phénomènes intimement liés alors que chez les eucaryotes, le noyau est une barrière physique qui sépare les deux processus. Cela a pour effet d'augmenter le nombre d'étapes qui mènent à l'expression des gènes et de rendre plus complexe sa régulation. Les événements nucléaires subis par un transcrit influencent d'ailleurs son destin subséquent à l'export de l'ARNm du noyau vers le cytoplasme. Entre autres, tous les ARNm sont modifiés par l'ajout d'une coiffe 7-méthylguanosine en 5' du messenger dès le début de la transcription, et par l'ajout d'une queue polyadénosine (polyA) en 3' de l'ARNm à la fin de la transcription (414). Ces structures vont moduler l'export, la stabilité et la traduction du messenger (337, 414). Également, les ARNm sont transcrits sous forme de pré-ARNm et contiennent des introns qui doivent être enlevés avant l'export, phénomène appelé épissage.

1.1.1 Épissage

1.1.1.1 Principes de base

Les gènes eucaryotes sont morcelés dans le génome et il doit y avoir un assemblage des exons afin d'exprimer ces gènes sous une forme continue. Le spliceosome est une énorme machine qui a pour tâche de catalyser l'épissage. Il est composé de cinq particules ribonucléoprotéiques nucléaires (snRNP) formées par cinq petits ARN nucléaires (snARN) soit les snARN U1, U2, U4, U5 et U6. Ces derniers sont associés à plus de 300 protéines (246).

Le spliceosome est une structure dynamique qui s'assemble en plusieurs étapes qui sont illustrées à la figure 1A. La première étape est la formation du complexe E (pour "early"). Elle consiste en la reconnaissance d'un site d'épissage consensus en 5' d'un intron par appariement avec le snARN U1 et en l'identification de la fin d'un intron par liaison de la protéine U2AF. Par la suite, le recrutement du snRNP U2 par U2AF permet la formation du complexe A. L'assemblage subséquent des snRNP 4, 5 et 6 génère le complexe B. Finalement, la perte des snRNP U1 et U4 engendre le complexe C, qui va catalyser deux réactions de transestérification qui mènent à la ligation entre deux exons, tel qu'illustré à la figure 1B (41).

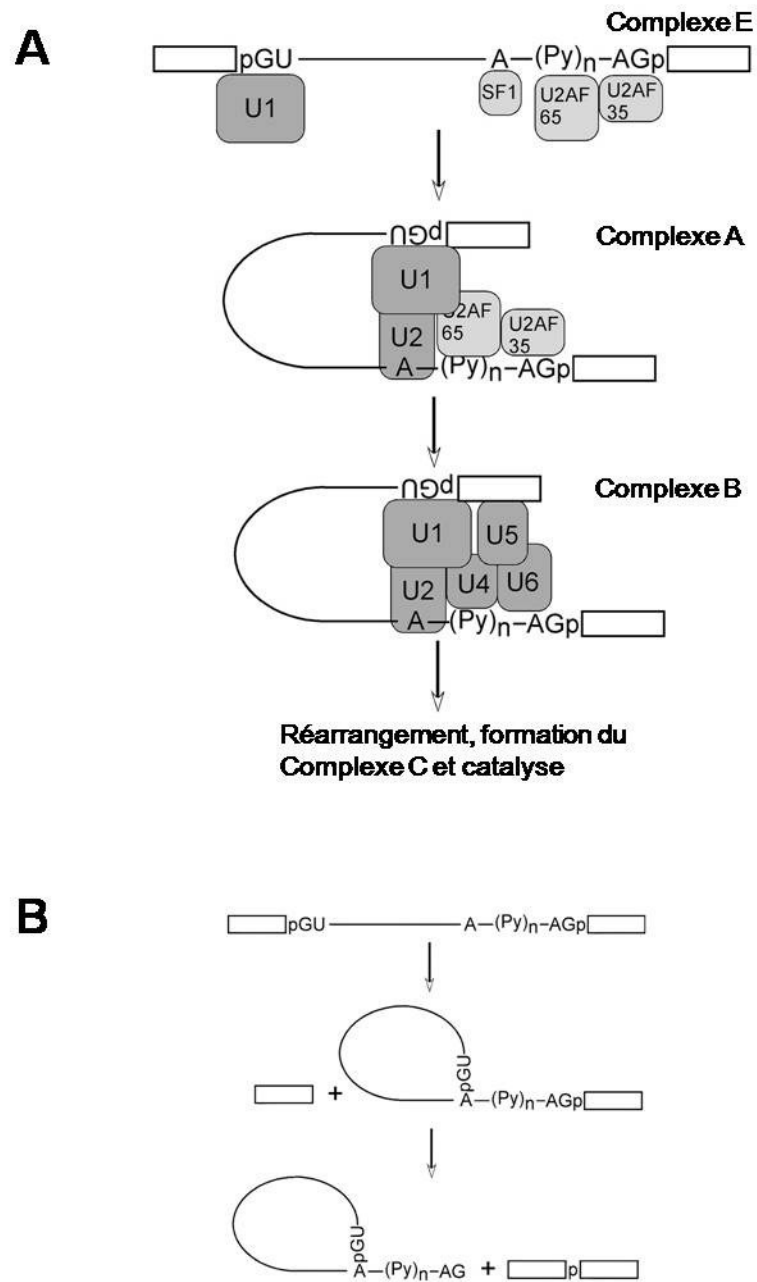


Figure 1: Représentation schématique du processus d'épissage d'ARNm. A) Étapes d'assemblage du spliceosome. B) Réactions de transestérification catalysées par le complexe C. Adapté de (41)

1.1.1.2 Épissage alternatif

Chez les eucaryotes pluricellulaires, les introns sont plus nombreux et plus longs et les sites d'épissage ne sont pas aussi consensuels que chez la levure (210). Par conséquent, il y a plusieurs assemblages d'exons possibles, un phénomène appelé épissage alternatif. Il a d'ailleurs été évalué que de 40 à 80% des gènes humains sont sujets à l'épissage alternatif (344). De plus, de 70 à 90% de ces événements résultent en une protéine modifiée, permettant souvent l'acquisition de nouvelles propriétés. Ceci illustre que l'épissage alternatif est une façon significative d'augmenter le protéome d'un organisme possédant un génome plus compact et représente un moyen de réguler l'expression génique (459).

Puisque les sites d'épissage des pré-ARNm des métazoaires sont plus variables au niveau de leur séquence, certains exons sont plus facilement reconnus par le spliceosome (210). De plus, des éléments présents en *cis* dans les exons et les introns d'un ARN vont faciliter ou encore inhiber l'emploi d'un site d'épissage. Ces éléments sont reconnus avec plus ou moins de spécificité par des protéines liant l'ARN. De façon générale, les protéines de type SR vont encourager la sélection d'un site alors que les protéines de type hnRNP vont l'inhiber, bien qu'il y ait des exceptions (218). Des combinaisons de ces éléments sont également observées et peuvent influencer le choix des sites d'épissage (344). Toutes les étapes d'assemblage du spliceosome peuvent être régulées par des protéines liant le pré-ARNm, les snARN ou les protéines d'assemblage, donc le choix des sites d'épissage peut être modulé à tout moment et même juste avant la deuxième réaction de transestérification qui engendre la ligation de deux exons (218). Enfin, il est intéressant de noter que certaines protéines régulatrices de l'épissage se liant au niveau des exons vont demeurer associées au transcrit mature et favoriser son export. Ces protéines, qu'elles soient de type SR ou hnRNP vont accompagner l'ARNm dans le cytoplasme et influencer son transport, sa stabilité et sa traduction (125, 222). Par exemple, la protéine de type SR ASF/SF2 recrute la kinase mTOR, ce qui augmente par conséquent l'initiation de la traduction de transcrits spécifiquement liés par ce facteur (354).

Plusieurs évidences suggèrent que l'épissage alternatif peut être modulé en fonction de la signalisation intra et extracellulaire pour permettre l'expression de protéines avec des propriétés biologiques différentes (479). Il a été montré que l'épissage alternatif contribue à la réponse des cellules à plusieurs événements tels que l'apoptose, la progression dans le cycle cellulaire, les chocs thermiques et l'activité neuronale (459). Il n'est donc pas surprenant que la présence de mutations de protéines impliquées dans l'épissage alternatif puisse causer de nombreuses maladies telles que le cancer et les maladies neurodégénératives (98). Aussi, la plupart des protéines contrôlant le choix du site d'épissage peuvent être régulées par des modifications post-traductionnelles et il a été clairement démontré que la phosphorylation réversible de certains de ces facteurs module conséquemment l'épissage (479). La signalisation cellulaire permet donc une réponse rapide de la cellule qui est observable entre autres au niveau de l'épissage et qui se traduit par l'expression de protéines spécifiques.

1.1.1.3 Complexe de jonction exon-exon

Pendant l'épissage d'un pré-ARNm, il y a formation d'un complexe protéique qui s'assemble sur le transcrit indépendamment de sa séquence. Ce complexe, appelé complexe de jonction exon-exon (EJC), est formé à une position spécifique, soit 20 à 24 nucléotides en amont de la jonction entre deux exons (296, 297). Le cœur du complexe est un assemblage hétérotétramérique entre l'ARN hélicase eIF4AIII, qui va lier directement l'ARN sur une distance couvrant 8 nucléotides, et les protéines Barentsz, Mago et Y14 (12, 20, 50, 496). Ce tétramère constitue une plateforme à laquelle vont se joindre plusieurs protéines qui vont déterminer le sort de l'ARNm. Par exemple, des facteurs d'épissage vont s'y associer pendant la maturation de l'ARN (296, 426). La figure 2 montre une représentation de l'EJC.

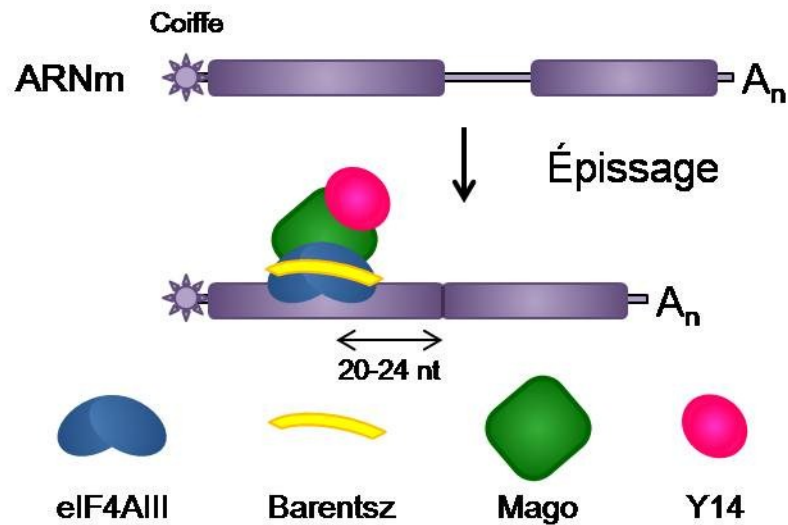


Figure 2: Déposition d'un EJC sur un ARNm épissé. Le complexe de base est un hétérotétramère formé des protéines eIF4AIII, Barentsz, Mago et Y14 qui est assemblé à une distance de 20 à 24 nucléotides en amont d'une jonction exon-exon. D'après (50).

Il a été observé chez le xénope qu'un ARNm possédant un intron était plus facilement exporté dans le cytoplasme qu'un messager équivalent sans intron (323). D'ailleurs, il a été montré que l'EJC peut faciliter l'export d'un transcrit en recrutant des facteurs de transport nucléocytoplasmique (295), bien que ce complexe ne soit pas essentiel à l'export (168). Ce point de vue largement accepté sur le rôle de l'EJC dans l'export est toutefois remis en question par une étude qui suggère que la machinerie d'export soit plutôt recrutée via le complexe liant la coiffe, en 5' du messager (84). Somme toute, il semble y avoir un couplage entre l'épissage et l'export, ce qui augmenterait l'export des ARNm épissés (515).

L'EJC demeure fermement lié à l'ARNm même après que celui-ci ait traversé le pore nucléaire et joue d'ailleurs des rôles au niveau du cytoplasme. Chez la drosophile, il a été démontré que les protéines de l'EJC sont essentielles à la localisation du messager maternel *oskar* (*osk*) au pôle postérieur de l'ovocyte (389) et que l'épissage du premier intron *d'osk* est nécessaire à cette localisation (204). Aussi, il est connu que l'EJC favorise

l'expression des messagers épissés (117, 533). Dans cet ordre d'idées, le recrutement artificiel de protéines du complexe de jonction exon-exon dans la séquence codante d'un messenger rapporteur augmente sa traduction, probablement en favorisant le recrutement des ribosomes (377). Il a d'ailleurs été montré que la protéine SKAR s'associe à l'EJC et lie la protéine S6 kinase 1, qui contribue à l'activation de la traduction en réponse à la signalisation par mTOR. Ceci pourrait expliquer que l'épissage accroît la traduction des messagers via l'EJC (327).

L'EJC est finalement dissocié du messenger lors du passage des ribosomes au cours de la ronde pionnière de traduction, à l'aide de la protéine associée au ribosome PYM qui démantèle le complexe (123, 172, 304). Dans la majorité des transcrits, il n'y a pas de jonctions exon-exon dans les régions 3'UTR. Ainsi, après le passage des ribosomes, il ne reste plus de complexes EJC sur le transcrit. Toutefois, si une jonction subsiste à plus de 50 nucléotides en aval d'un codon stop, la plateforme qu'est l'EJC permet l'assemblage d'un complexe qui va entraîner la dégradation de l'ARN (305). Ce mécanisme de dégradation, appelé dégradation induite par codon non-sens (NMD), sera décrit en profondeur plus loin dans cette introduction.

Ainsi, l'EJC a plusieurs rôles biologiques qui vont moduler la vie d'un ARNm de sa maturation jusqu'à sa disparition. Il est assumé que l'EJC est déposé près de chacune des jonctions exon-exon formées, bien que ce ne soit pas prouvé (181). Il n'y a pour l'instant aucune évidence montrant une régulation au niveau de la formation de l'EJC. Il semble que ce soit la présence et la position d'un EJC sur le messenger qui affecte le destin d'un ARNm.

1.1.2 Export nucléaire

1.1.2.1 Export nucléaire par NXF1-p15

Dès que la maturation d'un ARNm est complétée, ce dernier peut être transporté vers le cytoplasme à travers les pores nucléaires. Il existe un récepteur pour l'export qui

interagit avec le pore et qui est spécifiquement impliqué dans le transport nucléocytoplasmique d'ARNm. Il s'agit d'un hétérodimère composé des protéines NXF1/TAP et p15, appelées respectivement Mex67p et Mtr2p chez la levure (424). La grande majorité des messagers sont exportés grâce à ce système. Ils s'associent soit directement au récepteur qui a la capacité de lier l'ARN (249, 253, 451) soit par l'intermédiaire de protéines adaptatrices tel qu'illustré à la figure 3. Par exemple, il y a plusieurs évidences qui montrent que la protéine liant l'ARN Aly/REF contribue à l'export de messagers, puisqu'elle peut lier NXF1-p15 (486). Cette protéine s'associe au complexe nucléaire liant la coiffe, ce qui permettrait de faire un lien entre la maturation et l'export d'ARNm (84).

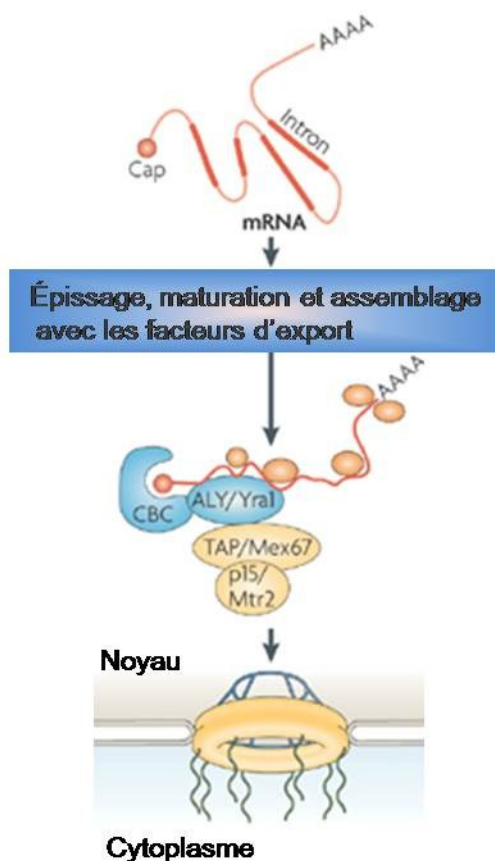


Figure 3: Voie générale d'export nucléaire des ARNm. Le complexe récepteur pour l'export est en jaune et les protéines adaptatrices de l'export sont en bleu. Adapté de (277)

1.1.2.2 Régulation de l'export via des modifications post-traductionnelles

L'export nucléaire peut être régulé et à cette fin, les protéines adaptatrices sont soumises à des modifications post-traductionnelles. Les cas les mieux caractérisés à ce jour nous proviennent de la levure *S. cerevisiae*. Par exemple, la protéine de type SR Npl3p est soumise à un cycle de phosphorylation/déphosphorylation qui va moduler son rôle dans l'export (177). Cette protéine sous forme phosphorylée est recrutée sur les transcrits de façon co-transcriptionnelle. Sa déphosphorylation par la phosphatase Glc7p permet son interaction avec le récepteur d'export Mex67p-Mtr2p et le transport nucléocytoplasmique efficace des messagers (177). Une fois dans le cytoplasme, la kinase Sky1p phosphoryle Npl3p ce qui entraîne sa dissociation de l'ARNm et de Mex67p-Mtr2 et favorise son import nucléaire via l'importine Mtr10 (178, 453). Conséquemment, cette régulation permet un transport unidirectionnel des messagers associés à Npl3p vers le cytoplasme (177). Ce phénomène semble être conservé chez les métazoaires puisque certaines protéines de type SR sont recrutées sous forme hyperphosphorylée sur les pré-ARNm et sont par la suite déphosphorylées ce qui facilite leur interaction avec NXF1-p15 (222, 223, 284).

Également, d'autres modifications post-traductionnelles de protéines liant l'ARN ont le potentiel de moduler l'export de messagers. Par exemple, la méthylation d'arginines de Npl3p favorise son export nucléaire (457, 541). Pour expliquer ce phénomène, il a été proposé que cette modification diminue l'interaction entre Npl3p et des protéines nucléaires (350). Enfin, certaines évidences laissent croire que l'ubiquitination de protéines joue un rôle positif dans l'export puisque chez la levure, au moins deux E3 ubiquitines ligases, soit Rsp5p et Tom1p, participent à ce processus (132, 374, 432). Il est intéressant de constater que Mex67p possède un motif d'interaction avec l'ubiquitine et qu'une protéine faisant partie d'un complexe couplant la transcription à l'export, Hpr1, est ubiquitinée par Rsp5p (200, 201). L'ubiquitination pourrait donc contribuer à la coordination entre la synthèse et l'export des messagers chez la levure.

1.1.2.3 Voies alternatives

Quelques voies alternatives d'export ont été caractérisées et représentent d'autres moyens pour la cellule de réguler l'expression génique via l'export d'ARNm. Par exemple, chez l'humain, il existe au moins 3 autres protéines de la famille NXF qui pourraient jouer un rôle dans le transport nucléocytoplasmique (208). Entre autres, la protéine NXF2 est exprimée principalement dans les neurones (494) et montre une activité d'export d'ARNm (208).

Également, quelques messagers semblent être transportés via la voie CRM1. Ce récepteur d'export est responsable du transport nucléocytoplasmique des protéines et de certains types d'ARN, tel les ARNs ribosomiques (229). Ainsi, la capacité de la protéine NXF3 à exporter de l'ARN polyadénylé a été étudiée. NXF3 a une similarité de séquence avec NXF1, bien qu'il ne possède pas de domaine d'association au pore nucléaire. NXF3 peut lier de l'ARN et s'associe à CRM1 grâce à un signal d'export nucléaire. Ceci suggère que NXF3 pourrait être un récepteur pour l'export nucléaire, bien qu'à ce jour il n'y ait pas d'ARNm exportés par cette voie qui sont identifiés (547). D'autres protéines liant l'ARN s'associent à CRM1 pour permettre le transport de messagers spécifiques. C'est le cas de HuR, qui s'associe à des transcrits contenant des éléments riches en ribonucléotides AU ("AU-rich element" ou ARE) et qui jouerait un rôle dans l'export CRM1-dépendant des messagers codant pour le proto-oncogène c-fos (56) et pour CD83 (412). Aussi, il semble que le facteur d'initiation de la traduction eIF4E, qui lie la coiffe de l'ARNm, contribue à l'export CRM1-dépendant de certains ARNm codants pour des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. Ce mécanisme requiert un élément de sensibilité à eIF4E, présent dans le 3' UTR de ces transcrits (103).

L'emprunt de ces voies alternatives est cependant restreint puisque l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques à certaines d'entre elles n'affecte pas la majorité des messagers qui sont exportés normalement, probablement grâce à NXF1-p15 (161). Une étude a montré

que l'inhibition de l'export nucléaire CRM1-dépendant par la leptomycine B n'affecte l'export d'ARNm que dans certains types cellulaires, tel que les cellules T (448). Il est donc suggéré qu'une minorité de messagers emprunte des routes alternatives pour l'export. Ceci permettrait une régulation de l'expression de certains ARNm impliqués dans des processus cellulaires précis, sans affecter l'export en général (229).

1.1.3 Localisation d'ARNm

Bien que l'objectif de l'expression des gènes soit la production de protéines, les ARNm naissants dans le cytoplasme ne sont pas nécessairement pris immédiatement en charge par la machinerie de synthèse. Certaines protéines doivent être exprimées dans un lieu précis afin d'accomplir leurs fonctions et à cette fin, le ciblage des protéines peut s'effectuer via des séquences peptidique précises. Toutefois, la localisation d'ARNm préalablement à la traduction permet avantageusement à la cellule d'effectuer un contrôle spatial de l'expression génique. D'un point de vue énergétique, ce processus est économique, compte tenu qu'un seul messager peut subir plusieurs rondes de traduction. Par conséquent, une concentration locale de la protéine produite est générée (474). De plus, on peut supposer que cela facilite l'assemblage de complexes par l'expression coordonnée de gènes dans un emplacement subcellulaire commun (127, 474).

1.1.3.1 Mécanismes de localisation d'ARNm

Il existe différentes façons d'acheminer un transcrit vers sa destination finale et plusieurs mécanismes ont été décrits. D'ailleurs, c'est souvent une combinaison de ces mécanismes qui mène à la localisation d'un ARNm, qui sera ultérieurement traduit localement (364).

Un premier mécanisme qui peut paraître insolite est la synthèse localisée du messager. Ce procédé plutôt marginal a été décrit entre autres dans les myofibres, qui sont des cellules multinucléées. Il semble que suite à des signaux émis par le nerf d'une jonction

neuromusculaire, il y ait une activation de la transcription des ARNm qui encodent les sous-unités δ et ϵ du récepteur à l'acétylcholine uniquement dans les noyaux à proximité de la jonction (58, 466). Par conséquent, une concentration du messenger est apparente spécifiquement à cet endroit. Dans un autre ordre d'idées, la diffusion d'un transcrit conjuguée au captage local de ce dernier constitue une autre tactique menant au ciblage d'un ARNm. Cette stratégie a été observée durant l'ovogénèse de la drosophile et elle conduit à la localisation du déterminant maternel *nanos* au pôle postérieur l'oeuf (151). Par la suite, la vaste majorité de *nanos* qui n'est pas localisée sera dégradée, en même temps que de nombreux autres transcrits provenant de la mère (26, 491). La protection locale contre la dégradation est donc un autre moyen de localiser des transcrits. Ceci semble courant lors de l'ovogénèse alors que près de 300 transcrits sont soumis à ce procédé au pôle postérieur de l'oeuf (388). Enfin, un dernier mécanisme illustré par plusieurs études implique un transport actif de l'ARNm sur le cytosquelette, que ce soit sur les filaments d'actine par des myosines ou sur les microtubules à l'aide de dynéines et/ou de kinésines (475). Il est supposé que les messagers sont reconnus en *trans* par des complexes protéiques qui recrutent également des moteurs moléculaires. Il existe aussi une variante à ce modèle puisqu'il a été démontré que certaines organelles transportées peuvent servir de support à la localisation d'ARNm (94). Une fois l'ARNm parvenu à destination, il doit être maintenu en place et le cytosquelette joue clairement un rôle dans l'ancrage des messagers localisés (319).

Il y a des points communs à tous les mécanismes qui sont essentiels pour rendre le processus de localisation efficace. Les ARNm destinés à être localisés doivent posséder des signaux en *cis* qui permettent leur reconnaissance par des protéines liant l'ARN, ce qui contribue à la spécificité du ciblage. Le messenger doit également demeurer sous une forme silencieuse lors de son transit, puisque son expression délocalisée est potentiellement préjudiciable pour la cellule. C'est entre autres le cas pour la protéine MBP, qui est exprimée dans les cellules gliales et qui est impliquée dans la formation de la gaine de myéline qui entoure les axones des neurones. Le messenger de MBP est transporté dans les

prolongements des oligodendrocytes où la protéine est traduite localement (5, 6, 280, 530). Cette protéine colle à de nombreuses structures telles les membranes lipidiques et entraîne leur compression. Il est donc facile de concevoir que l'expression ectopique de MBP dans le corps cellulaire serait catastrophique pour la cellule (474).

La localisation d'ARNm est impliquée dans plusieurs phénomènes de polarisation cellulaire tels que le développement, la division cellulaire asymétrique, la motilité cellulaire et la plasticité synaptique (475). Outre ces situations particulières, de récentes évidences suggèrent que la localisation d'ARNm pourrait contribuer à la production ciblée de protéines vers des organelles où elles sont requises, évoquant la possibilité que la localisation d'ARNm soit un processus plus répandu que ce que l'on croyait auparavant.

1.1.3.2 Localisation d'ARNm et développement

Lors du développement chez certains animaux, la localisation de déterminants maternels sert à communiquer des informations qui permettent d'établir les plans corporels antéro-postérieur et dorso-ventral. Le contrôle spatial de l'expression de ces gènes est crucial puisque les destinées cellulaires dans un espace vont dépendre de la présence et parfois même de concentration de ces molécules régulatrices. Chez quelques organismes tels que la drosophile, le xénope, l'ascidie, l'oursin et le poisson zèbre, il est démontré que l'esquisse des plans de développement est établie bien avant la fécondation, par la localisation d'ARNm lors de l'ovogénèse (274).

La drosophile est un organisme modèle qui a été abondamment utilisé pour illustrer l'importance de la localisation d'ARNm. Tel que mentionné précédemment, le morphogène *nanos* est localisé au pôle postérieur de l'oeuf (section 1.1.3.1) et ce positionnement dépend de la protéine Osk (140). L'ARNm *osk* est également expédié au pôle postérieur préalablement à son expression, par un mécanisme impliquant un transport actif sur les microtubules à l'aide de la kinésine I (55, 554). *Osk* est transcrit dans les cellules nourricières de l'oeuf et se déplace vers le pôle postérieur sous la forme d'un complexe

ribonucléoprotéique requérant de nombreuses protéines liant l'ARN (475). Le rôle de l'EJC dans ce processus a d'ailleurs été décrit auparavant (section 1.1.1.3). Après le transit du messenger, la protéine Osk est traduite au pôle postérieur et s'avère indispensable à l'ancrage du transcrit (433). En plus d'*osk*, l'expression d'autres déterminants est régulée grâce au transport actif de leur transcrit sur les microtubules. Suite à sa transcription par les cellules nourricières, le morphogène *bicoid* (*bcd*) est localisé au pôle antérieur grâce au moteur navigant vers l'extrémité négative des microtubules, la dynéine (444). Bcd est ensuite traduit au pôle antérieur de la mouche et par conséquent un gradient au niveau de la concentration de cette protéine est créé. Ceci détermine la position de la tête et du thorax de l'animal (154). Enfin, *gurken* (*grk*) est un autre messenger maternel transporté par la dynéine et localisé près du noyau de l'œuf, en position antéro-dorsale (329). Ce gène code pour une protéine sécrétée importante pour l'établissement des axes antéro-postérieur et dorso-ventral de la drosophile (375). La localisation de ces ARNm essentiels est illustrée à la figure 4.

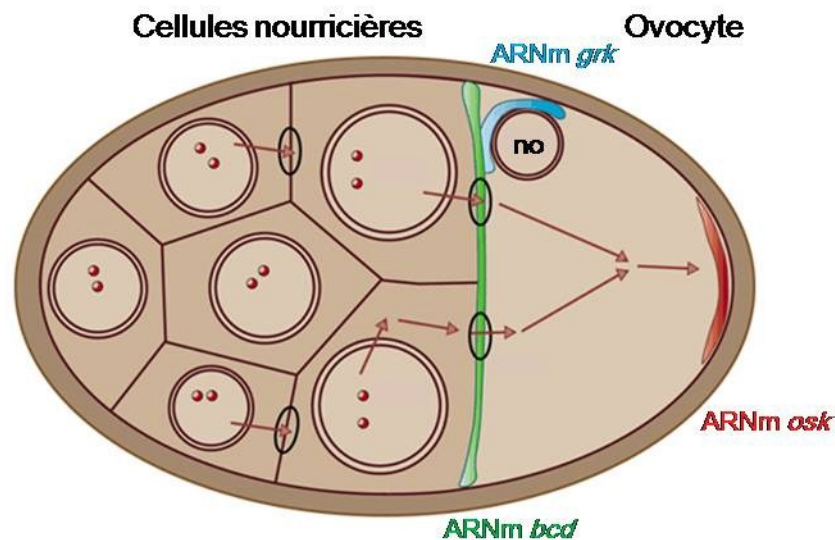


Figure 4: Localisation d'ARNm de déterminants maternels dans l'ovocyte de drosophile. *osk* (en rouge) est localisé au pôle postérieur, *bcd* (en vert) au pôle antérieur et *grk* (en bleu) est localisé près du noyau de l'ovocyte (no). Adapté de (108)

À des stades plus avancés de l'embryogenèse de la drosophile, la localisation d'ARNm est toujours un stratagème utilisé pour cibler la production de déterminants cellulaires. Par exemple, les ARNm des protéines Prospero (pros) et Inscuteable sont localisés asymétriquement dans les neuroblastes. Ceci contribue à la division de ces précurseurs neuronaux en deux cellules filles qui auront des destins différents (61, 224).

1.1.3.3 Localisation d'ARNm et division cellulaire asymétrique

La division cellulaire asymétrique n'est pas que l'apanage des métazoaires et ce phénomène a très bien été décrit chez la levure *S. cerevisiae*. La localisation du répresseur transcriptionnel Ash1 dans la cellule fille prévient son changement de type sexuel en empêchant l'expression de l'endonucléase HO (46, 465). Cette protéine clive l'ADN génomique au niveau du locus *MAT* et par recombinaison, une copie du gène déterminant le type sexuel est insérée (203). On considère donc que la division cellulaire est asymétrique puisque les deux cellules résultantes diffèrent dans leur capacité à changer de type sexuel. Encore une fois, la localisation de l'ARNm contribue à cette polarisation. Le messenger *ASH1* est localisé dans la cellule fille en anaphase par un mécanisme nécessitant le cytosquelette d'actine (317, 493), tout comme plus de 30 messagers (390). L'exemple de localisation de l'ARNm *ASH1* est probablement un des plus caractérisés puisque chacune des étapes menant au ciblage d'un ARN a été étudiée en profondeur, de la reconnaissance du transcrit jusqu'à la traduction du messenger.

On retrouve en *cis* sur *ASH1* quatre éléments structurés nécessaires au ciblage du messenger : trois d'entre eux se trouvent dans la séquence codante et le quatrième chevauche la séquence codante et la région 3' UTR (78, 189). Le facteur reconnaissant ces éléments est la protéine She2p (48, 316) et cette dernière s'associe à She3p, une autre protéine essentielle à la localisation. Le rôle principal de She3p est de faire un pont entre l'ARNm reconnu par She2p et un moteur moléculaire de type myosine, She1p/Myo4p (48, 316, 493). She1p/Myo4p permet donc le transport actif d'ARN sur le cytosquelette d'actine

jusqu'au bourgeon de la cellule fille (39). L'association entre She2p et *ASH1* doit se faire dans le noyau pour permettre l'assemblage d'un complexe silencieux au niveau traductionnel (126, 458).

Durant le transport, la traduction d'*ASH1* est inhibée de plusieurs façons. Premièrement, la présence des éléments de localisation structurés dans la séquence codante interfère avec la traduction prématurée du transcrit (77). Les protéines Khd1p et Puf6p jouent également le rôle de répresseurs traductionnels, Puf6p étant recruté sur *ASH1* dans le noyau par l'entremise de She2p (194, 233, 458). Ces protéines semblent affecter différentes étapes du processus traductionnel tout au long du transport (111, 391). Il est intéressant de constater qu'une fois le transcrit arrivé à destination, la phosphorylation de ces facteurs par des kinases localisées diminue l'affinité de ces derniers pour l'ARN, levant du même coup la répression de l'expression (111, 391). Enfin, la traduction d'*ASH1* semble être requise pour son ancrage au bourgeon (189), mais les évidences soutenant cette thèse ne permettent pas de spécifier si c'est la protéine elle-même qui supporte cette fixation, tout comme dans le cas d'*osk* (section 1.1.3.2), ou si les ribosomes recrutés lors de la traduction en sont responsables (189, 233).

1.1.3.4 Localisation d'ARNm et motilité cellulaire

Des événements de localisation d'ARNm précédant l'expression ciblée de protéines ont également été relatés dans des cellules somatiques. On retrouve des similarités entre ce phénomène et les autres décrits précédemment puisque des observations concernant le transport actif de transcrits sur les structures cytosquelettiques ont été rapportées. Ainsi, dans les cellules motiles, le messenger codant pour l'actine- β est localisé dans des espaces déjà enrichis en actine, en périphérie de la cellule. Ce phénomène faciliterait la polymérisation locale rapide et organisée des filaments d'actine, ce qui produirait une force favorisant le mouvement cellulaire (95).

Un élément présent dans le 3'UTR du transcrit de l'actine- β est suffisant pour son ciblage dans les fibroblastes d'embryon de poulet (272). Ce segment de 54 nucléotides baptisé "zipcode" est lié par la protéine ZBP1 (434), qui s'associe avec le messager dès sa transcription et l'accompagne ensuite jusqu'en périphérie cellulaire (382). Le transport s'effectue sur les filaments d'actine (489) et l'expression de l'actine- β est également réprimée par ZBP1 (228). Il est intéressant de constater que tout comme lors de la localisation d'*ASH1*, la dé-répression de la traduction se fait suite à la phosphorylation de ZBP1 par une kinase localisée, ce qui a pour conséquence de diminuer son affinité pour le "zipcode" (228). Il a d'ailleurs été montré que l'actine- β est traduite aux sites de localisation du messager (431). Ce processus de ciblage est inductible par des signaux extracellulaires, ce qui prouve que le déplacement des cellules est modulable via le transport de cet ARNm (294).

1.1.3.5 Localisation d'ARNm et plasticité synaptique

La localisation de l'ARNm de l'actine- β est également importante dans un autre type cellulaire hautement spécialisé, soit les neurones. Le ciblage de ce messager via la protéine ZBP1 dans les prolongements des neurones en développement est important pour l'avancée des cônes de croissance, sans compter que le mouvement de ceux-ci dépend d'une réorganisation du cytosquelette d'actine. Une différence notable entre ce processus de localisation et celui impliqué dans la motilité cellulaire des fibroblastes est l'utilisation des microtubules pour le transport de particules ribonucleoprotéiques (RNPs) vers les cônes (550). Également, suite à une stimulation neuronale, il y a une colocalisation entre les ARNm de l'actine- β et ZBP1. Ils se redistribuent dans les épines dendritiques qui sont le lieu de formation des synapses. L'actine- β contribue au remodelage des épines, ce qui suggère un rôle pour la localisation de son messager dans la plasticité synaptique (139, 507).

Il est maintenant accepté que la synthèse protéique soit requise pour l'établissement de la mémoire à long terme et que la localisation d'ARNm contribue au ciblage des protéines dans les synapses, qui sont autonomes dans leur gestion de l'information (482). Ce concept a émergé suite à l'observation de polyribosomes sous les épines dendritiques, ce qui suggèrerait une synthèse locale de protéines (481). Dans la plupart des cas, le ciblage semble être possible grâce à un transport actif de granules d'ARN sur les microtubules (263, 270, 473). Il est de plus suggéré que l'étape finale de localisation dans les épines dendritiques pourrait dépendre du cytosquelette d'actine et de myosines (369, 548). Bien que plusieurs centaines d'ARNm soient distribués dans les dendrites, les mécanismes détaillés permettant leur transport sont loin d'être élucidés et leur rôle dans les prolongements des neurones ne sont pas toujours définis (52).

Quelques transcrits ont cependant fait l'objet d'études, tel que l'ARNm encodant Arc/Arg3.1. Cette protéine qui interagit avec le cytosquelette est importante dans le maintien de la potentialisation à long terme, un phénomène associé à la plasticité synaptique (199). Suite à une stimulation neuronale, le messenger de Arc/Arg3.1 est transcrit et acheminé rapidement aux synapses activées (483). Quelques observations démontrent également que la protéine est nouvellement synthétisée dans les synapses stimulées, suggérant une traduction de l'ARNm localisé (53). Enfin, un élément qui permettrait le ciblage par transport actif a été identifié dans le 3'UTR du transcrit (135, 275). Le cas du ciblage de l'ARNm Arc/Arg3.1 démontre donc que la localisation et le transport peuvent être régulés par l'activité neuronale.

1.1.3.6 Localisation d'ARNm et structures cellulaires

Une accumulation d'observations récentes suggère que la localisation d'ARNm maximiserait le ciblage de protéines vers des compartiments subcellulaires tels que les organelles et le cytosquelette. Par exemple, des informations contenues en cis sur des transcrits encodant des protéines ciblées au réticulum endoplasmique rugueux (RER)

contribuent à la localisation des messagers vers ce compartiment cellulaire, indépendamment de leur traduction. Il était présumé que la présence d'un peptide signal régulait le ciblage de ce type de protéine vers le RER. Ces nouvelles données révèlent donc la coexistence de plusieurs mécanismes qui permettent ultimement la localisation de protéines (416). Des événements similaires ont été rapportés pour d'autres types d'organelles telles que les mitochondries et le noyau (127). Par ailleurs, des messagers spécifiquement associés au fuseau mitotique ont été identifiés et une fraction de ceux-ci sont associés à des polyribosomes. Ceci appuie l'hypothèse que la localisation de ces messagers puisse soutenir la synthèse ciblée de protéines et qu'elle soit impliquée dans la distribution appropriée de messagers réprimés aux cellules résultant de la division cellulaire (44). Finalement, il est particulièrement intéressant d'évoquer une étude à large échelle effectuée dans des embryons de drosophiles. L'analyse globale de la localisation subcellulaire des ARNm a révélé que 71% des messagers examinés montrent un patron de localisation qui corrèle avec la distribution et la fonction connue des protéines pour lesquelles ils codent. Ceci laisse présager que la localisation d'ARNm soit un phénomène qui, contrairement à ce qui était admis, régule une majorité de fonctions cellulaires plutôt qu'une poignée de processus biologiques spécialisés (301).

1.1.4 Traduction

Suite à leur localisation, les transcrits sont prêts à être exprimés. Les ribosomes sont les complexes RNP qui vont décoder le message véhiculé sous forme d'ARNm pour le traduire en protéines, à l'aide des ARN de transfert (ARNt) aminoacylés. Les ribosomes compétents pour la traduction sont composés des sous-unités 40S et 60S et sont distribués dans le cytoplasme des cellules. Entre autres, ils ont été observés sur le RER, le cytosquelette, les mitochondries, dans les structures d'adhésion cellulaire, ainsi qu'au niveau des axones et des prolongements dendritiques des neurones. Cette diversité au niveau de la localisation subcellulaire des ribosomes peut potentiellement soutenir la traduction locale de protéines subséquente au ciblage d'ARNm (300).

La traduction est la phase ultime qui mène à l'expression du génome sous forme de protéines. Par conséquent, sa modulation permet à la cellule de répondre rapidement à une situation et de façon potentiellement réversible, ce qui entraîne une régulation temporelle de l'expression des gènes (349). Ce contrôle est primordial puisque la dérégulation de la traduction générale peut contribuer à une panoplie de maladies, incluant le cancer et des désordres métaboliques tels que l'obésité (471).

Le processus de synthèse protéique peut s'expliquer à travers quatre principales étapes qui sont l'initiation, l'élongation, la terminaison et le recyclage du ribosome.

1.1.4.1 Initiation

L'initiation est un procédé très complexe dont le but ultime est l'assemblage du ribosome sur le codon initiateur, ce qui permet d'établir le point de départ de la synthèse protéique sur l'ARNm. Ceci requiert la présence de plusieurs facteurs d'initiation de la traduction (eIF) qui sont eux-mêmes parfois composés de nombreuses sous-unités. Les différentes étapes de l'initiation sont illustrées à la figure 5.

Ainsi, cette voie débute avec la formation du complexe ternaire, qui comprend l'ARNt-méthionine initiateur, une molécule de guanine triphosphate (GTP) et le facteur d'initiation de la traduction eIF2. Une fois cet assemblage complété, celui-ci peut s'associer avec la petite sous-unité ribosomique 40S, ce qui nécessite minimalement les facteurs eIF1, eIF1A et eIF3. Ceci génère le complexe de pré-initiation 43S, qui peut ensuite être recruté dans la portion 5'UTR d'un ARNm (251). Cet événement est possible grâce aux facteurs d'initiation eIF4E, eIF4G, eIF4A et eIF4B, les trois premiers étant reconnus sous l'appellation eIF4F. C'est le facteur eIF4E qui possède une activité de liaison de la coiffe. Le facteur eIF4G, pour sa part, sert d'échafaudage et fait un pont entre la coiffe et le ribosome via une association avec eIF4E et eIF3. Le facteur eIF4A possède une activité hélicase qui pourrait servir à détruire des structures secondaires dans l'ARNm qui nuisent

au recrutement de la petite sous-unité ribosomique. Enfin, le facteur eIF4B s'associe avec eIF4A et stimulerait son activité *in vitro*, qui est très faible en absence de ce cofacteur (180). La protéine se liant à la queue de poly-A (PABP) joue également un rôle dans l'initiation de la traduction. En effet, son association avec la plateforme eIF4G améliore grandement la traduction des messagers. Il a été suggéré que cette association mène à la circularisation des transcrits, ce qui pourrait favoriser la réinitiation des ribosomes qui viennent de finir leur ronde de traduction sur l'ARNm (180). Il a aussi été montré que l'interaction PABP-4G, en plus d'encourager la liaison entre un complexe de pré-initiation et le messager, stimule le recrutement de la grande sous-unité 60S. Conséquemment, PABP peut être considéré comme un facteur d'initiation de la traduction (247).

Le complexe de pré-initiation est alors prêt à sonder l'extrémité 5'UTR, à la recherche du codon initiateur. Les détails de cette procédure ne sont pas très bien compris, mais ceci nécessite la consommation d'adénosine triphosphate (ATP) et il a été suggéré que l'activité hélicase de eIF4A-4B-4G puisse y jouer un rôle (398). De surcroît, la protéine hélicase de type DExH DHX29 a été identifiée comme jouant un rôle primordial dans la dissociation des structures secondaires très stables contenues dans des 5'UTR plus complexes, ce qui dépend de son activité (410). La reconnaissance d'un codon méthionine situé dans un contexte favorable est ensuite induite par l'action conjointe d'eIF1 et d'eIF1A, ce qui engendre la création d'un complexe stable 48S et la dissociation subséquente d'eIF1 (328, 397). Enfin, le facteur eIF5 stimule l'hydrolyse de la molécule de GTP du complexe ternaire par la GTPase eIF2. La relâche de la molécule de phosphate résultant de l'hydrolyse rend la réaction enzymatique irréversible et contraint le ribosome à produire une protéine à partir de ce codon (8). Finalement, une seconde GTPase impliquée dans la voie de l'initiation, eIF5B, facilite le recrutement de la grande sous-unité ribosomique (399). Le ribosome est alors prêt à synthétiser une protéine.

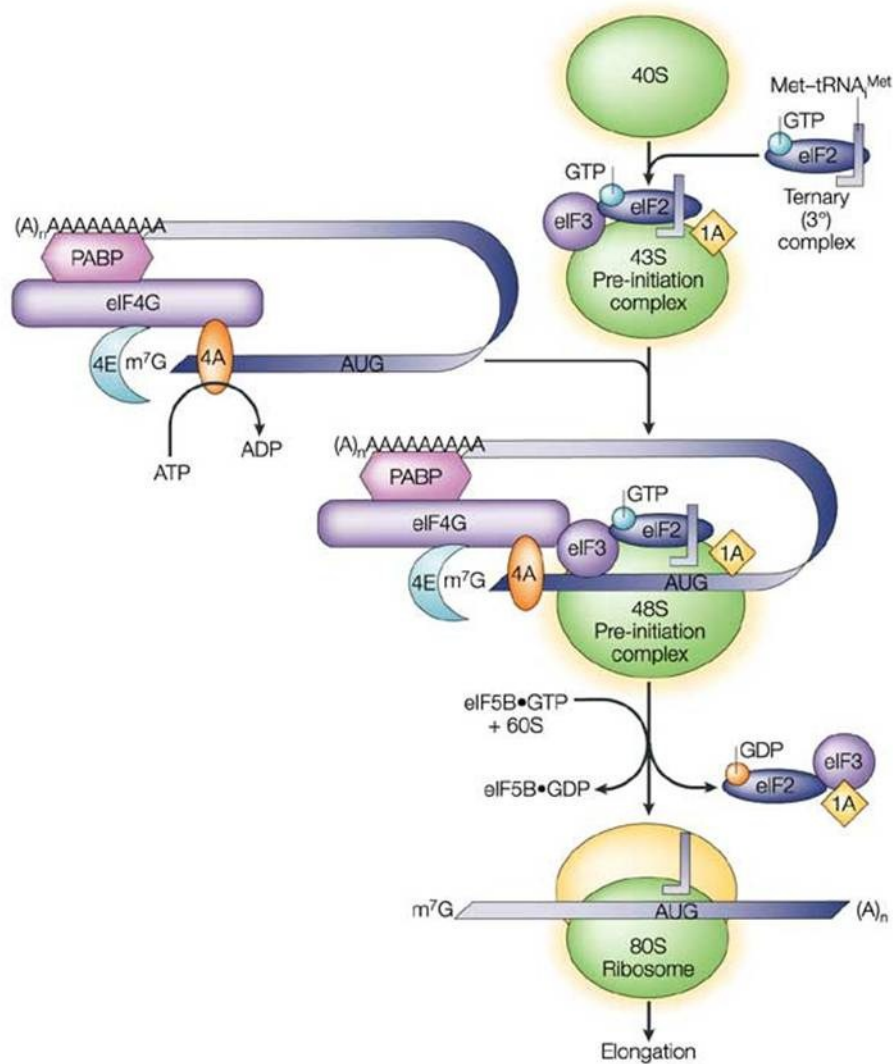


Figure 5: Initiation de la traduction chez les eucaryotes. Le complexe ternaire formé d'une molécule de GTP, d'eIF2 et de l'ARNt-méthionine initiateur s'associe à la sous-unité 40S avec eIF3 et eIF1A pour générer le complexe de pré-initiation 43S. Le complexe eIF4F (composé d'eIF4E, 4G et 4A) et PABP aident au recrutement du complexe de pré-initiation 43S en 5'UTR de l'ARNm pour assembler le complexe de pré-initiation 48S, qui va ensuite sonder le 5'UTR pour trouver le codon initiateur. Une fois ce codon identifié, l'hydrolyse de GTP par eIF2 va entraîner la dissociation de plusieurs facteurs du complexe et le facteur eIF5B va permettre la liaison de la sous-unité 60S. Tiré de (273).

1.1.4.2 Élongation

L'ARNm est ensuite déchiffré codon par codon et le ribosome catalyse la formation de liens polypeptidiques. Quelques facteurs d'élongation (eEF) sont requis pour accomplir cette tâche qui requiert encore une fois une consommation d'énergie sous forme de GTP. D'ailleurs eEF1A est un facteur à activité GTPasique qui apporte les ARNt chargés en acide aminés au ribosome, où le décodage se fait grâce à un pairage entre le transcrit et l'ARNt (251). Il faut également noter l'importance du facteur eEF2, qui hydrolyse aussi le GTP et qui fournit l'énergie nécessaire à la translocation unidirectionnelle du ribosome sur le messenger (497). L'élongation prend ensuite fin lorsque le ribosome rencontre un codon stop.

1.1.4.3 Terminaison et recyclage du ribosome

Pour que la protéine nouvellement synthétisée soit libérée, il doit y avoir hydrolyse du lien entre la chaîne d'acides aminés et le dernier ARNt qui a servi au décodage. La terminaison se limite à l'utilisation de 2 facteurs (eRF) soit eRF1 et eRF3, qui sont associés et interdépendants. eRF3 hydrolyse le GTP, et cet événement est essentiel à l'activité d'eRF1, qui consiste à reconnaître le codon stop pour permettre la relâche par hydrolyse de la chaîne polypeptidique (429).

Le recyclage des sous-unités ribosomiques les préparent à effectuer de nouveau une ronde de traduction. Très peu de choses sont connues sur le déroulement de cette étape puisque contrairement aux bactéries, les eucaryotes ne semblent pas posséder de facteur de relâche du ribosome (251). Il a été montré que les facteurs d'initiation eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF3j ont une activité empêchant l'association des sous-unités ribosomiques et sont responsables du recyclage de la machinerie de traduction après la terminaison (409).

1.1.4.4 Contrôle traductionnel

Il est maintenant évident que la traduction est un processus qui entraîne une grande consommation d'énergie et qui doit être par conséquent régulé. En étudiant les nombreux exemples décrits dans la littérature, on constate qu'il y a deux types de régulation de la traduction possibles, soit un contrôle global ou un contrôle spécifique de la traduction des ARNm. Le premier type va se faire par une modulation des facteurs généraux requis pour la traduction alors que le deuxième type implique des éléments présents en *cis* sur le transcrit, généralement situés dans les régions non-traduites. Dans les deux cas, on observe que l'initiation est majoritairement affectée par divers mécanismes, ce qui évite logiquement un gaspillage d'énergie par la cellule. Également, l'initiation est par sa complexité l'étape qui limite le taux de traduction, ce qui en fait une bonne cible pour un contrôle efficace du processus (192).

1.1.4.5 Exemples de mécanismes de contrôle traductionnel globaux

Le contrôle global de la traduction permet à la cellule de s'adapter à son environnement. De fait, lorsqu'il y a abondance de nutriments ou de facteurs de croissance, une augmentation des taux de traduction est essentielle pour soutenir la prolifération cellulaire et ainsi doubler la taille des cellules préalablement à leur division. Au contraire, dans des conditions où l'énergie et les acides aminés se font rares, la cellule doit répondre par une limitation de la traduction pour assurer sa survie (326). Cette restriction est également observée en réaction à divers stress comme les infections virales, l'hypoxie et l'exposition à des rayons ultraviolets (349).

Tous les événements qui s'enchaînent lors de l'initiation de la traduction sont des points de contrôle pouvant être ciblés et la formation du complexe ternaire ne fait pas exception. En effet, suite à une ronde d'initiation de la traduction, le facteur eIF2 est relâché sous forme inactive puisqu'il est lié à une molécule de GDP. Le facteur eIF2B, dont

l'abondance est limitée, se charge de l'échange de ce nucléotide pour une version GTP et ceci est indispensable pour la traduction. Or, lorsque la sous-unité α d'eIF2 est phosphorylée, celui-ci devient un inhibiteur compétitif d'eIF2B. Ceci bloque conséquemment la traduction générale en empêchant la formation de complexes ternaires. La cellule possède des kinases spécifiques d'eIF2 α telles PKR, PERK, HRI et GCN2 qui sont activées par divers stress et inhibent la traduction (113). D'ailleurs, la phosphorylation d'eIF2 α entraîne l'assemblage de granules de stress. Le recrutement sélectif de plusieurs ARNm réprimés dans ces structures dynamiques permettrait de protéger ces derniers de la dégradation (255).

La phosphorylation des facteurs d'initiation n'a pas que des effets négatifs sur la traduction. Cette modification post-traductionnelle favorise généralement l'assemblage du complexe eIF4F de plus d'une façon. Ainsi, les membres d'une famille de protéines liant le facteur eIF4E (4EBPs) jouent un rôle prédominant dans le contrôle traductionnel. Leur association avec eIF4E n'interfère pas avec la reconnaissance de la coiffe par ce facteur, mais empêche toutefois le recrutement du complexe d'échafaudage eIF4G. Sous forme hypophosphorylée, les 4EBPs ont une grande affinité pour eIF4E alors que leur phosphorylation abolit cette liaison, ce qui laisse le champ libre à eIF4G pour lier eIF4E (180). À titre d'exemple, la traduction dépendante de la coiffe est abolie en mitose, conséquemment à l'hypophosphorylation des 4EBPs (417).

Le rôle de la kinase mTOR dans la régulation de la traduction est digne de mention puisqu'elle transduit une panoplie de signaux de croissance en les intégrant en une réponse qui facilite l'augmentation des taux de traduction, via son activité sur le complexe de reconnaissance de la coiffe. mTOR phosphoryle les 4EBPs, ce qui les dissocie d'eIF4E et le rend disponible pour initier la traduction. Cette kinase modifie aussi eIF4G quoique le rôle de cet événement ne soit pas très bien compris. Une autre cible phosphorylée par mTOR est la kinase de S6, qui phosphoryle ensuite eIF4B et augmente son affinité pour eIF4A. Leur association améliore l'activité hélicase d'eIF4A. Enfin, la kinase de S6 est

impliquée dans la coordination de la synthèse du ribosome, ce qui soutient également l'augmentation de la traduction (326).

Somme toute, il y a très peu de mécanismes de régulation affectant les étapes de la traduction se déroulant après l'initiation qui ont été caractérisés. Néanmoins, il a été observé que la phosphorylation du facteur d'élongation eEF2 réduit les taux de traduction en empêchant le recrutement d'eEF2 au ribosome (69, 437). Puisque l'élongation est une étape où de grandes quantités de GTP sont consommées, il a été suggéré que le contrôle des taux d'élongation permettrait avantageusement à la cellule de répondre à des changements temporaires dans ses réserves d'énergie (63). Également, ce type de modulation semble être utilisé dans d'autres circonstances. Entre autres, la phosphorylation locale d'eEF2 dans les neurones en absence de stimulation synaptique inhibe la traduction nécessaire à certaines formes de plasticité (490). Finalement, il a été observé que des messagers qui co-sédimentent avec des polysomes lourds en mitose sont peu traduits, ce qui corrèle avec une augmentation de la phosphorylation d'eEF2. Ceci suggère qu'il y ait un ralentissement de l'élongation à cette étape du cycle cellulaire et évoque la possibilité que la traduction de ces transcrits ayant déjà été initiés puisse reprendre rapidement une fois que la division cellulaire est complétée (469).

Bien que tous ces mécanismes contrôlent la traduction générale dans la cellule, les messagers ne sont pas nécessairement tous affectés de façon équivalente. Dans des conditions où il y a une baisse de la traduction globale, les ARNm étant à la base moins traduits sont souvent plus touchés par des niveaux fonctionnels limités de facteurs de traduction, bien que des transcrits spécifiques tirent profit de telles situations. Ainsi, la présence de séquences ou de structures particulières dans certains messagers peuvent leur conférer un avantage ou leur nuire au niveau traductionnel (113).

1.1.4.6 Exemple de mécanismes de contrôle traductionnel spécifiques

1.1.4.6.1 Contrôle par encombrement stérique

En considérant les différentes étapes de l'initiation de la traduction, il n'est pas surprenant de constater que la présence de structures stables dans le 5'UTR d'un ARNm peut défavoriser sa traduction, soit en bloquant le recrutement du complexe de pré-initiation ou encore en empêchant le balayage du messenger qui mène à la reconnaissance du codon initiateur (281). De telles structures peuvent être reconnues spécifiquement par des protéines liant l'ARN, qui vont jouer un rôle dans le contrôle traductionnel. L'exemple le plus célèbre est sans doute celui du système IRE/IRP. En fonction des niveaux intracellulaires de fer, les protéines IRP se lient à des structures en tige-boucle appelées éléments de réponse au fer (IRE) et qui sont contenues dans le 5'UTR de plusieurs messagers impliqués dans la régulation du métabolisme du fer. Il en résulte une répression de la traduction causée par un encombrement qui rend impossible le recrutement du complexe 43S (171).

1.1.4.6.2 Sites internes d'entrée du ribosome (IRES)

Les structures complexes en 5'UTR n'ont pas toujours un effet négatif sur la traduction. En effet, certains messagers contiennent des sites internes d'entrée du ribosome (IRES) qui permettent le recrutement du ribosome et l'initiation indépendamment de la reconnaissance de la coiffe par le facteur d'initiation eIF4E. La traduction sélective des messagers contenant des IRES est ainsi possible dans des conditions de stress ou durant la mitose, soit lorsque la traduction dépendante de la coiffe est limitée par une diminution des niveaux fonctionnels d'eIF4E. De tels ARNm codent souvent pour des protéines impliquées dans la croissance cellulaire, la différenciation ou encore la régulation de l'apoptose et ils sont peu traduits lorsque la traduction dépendante de la coiffe est optimale. Encore une fois, des protéines se lient spécifiquement à certains IRES et participent au recrutement du

ribosome. Ce système permet potentiellement de moduler la traduction dépendante des IRES via la régulation de ces facteurs protéiques (214).

1.1.4.6.3 Inhibition du recrutement du complexe de pré-initiation

Compte tenu que les transcrits qui sont traduits sont circularisés (section 1.1.4.1), la reconnaissance de structures ou de séquences spécifiques présentes dans le 3'UTR de messagers par des protéines peut également influencer l'initiation de la traduction. Par exemple, chez les drosophiles femelles, la traduction de la protéine MSL-2 est réprimée par la protéine SXL qui lie à la fois le 5' et le 3'UTR du transcrit *msh-2*. Cet événement est nécessaire à la survie de la femelle afin d'éviter une surexpression des gènes de ses deux chromosomes X. En effet, Msl-2 sert à doser l'expression de gènes du chromosome X chez les mâles pour compenser le fait que ceux-ci n'ont qu'une version de ce chromosome. Lorsqu'il est lié en 3'UTR, SXL inhibe le recrutement du complexe de pré-initiation alors que sa liaison en 5'UTR empêche la recherche du codon initiateur (30).

1.1.4.6.4 Inhibition du recrutement d'eIF4F

Plusieurs mécanismes de contrôle spécialisé impliquent des éléments en *cis*, reconnus par des protéines qui vont cibler la reconnaissance de la coiffe et la formation d'eIF4F. Pendant le développement chez la drosophile, le morphogène Bcd (section 1.1.3.2) agit à titre de répresseur traductionnel, en s'associant avec le 3'UTR de *caudal*, un autre morphogène qui définit la polarité de l'embryon. Bcd lie une protéine homologue à eIF4E, qui s'associe à la coiffe mais qui ne peut interagir avec eIF4G. Le recrutement d'eIF4F est donc totalement aboli (86).

1.1.4.6.5 Mécanismes de contrôle ciblant eIF4E

Il existe aussi quelques variantes de ce mécanisme, où des 4EBP peuvent être spécifiquement recrutées par des protéines liées sur le 3'UTR de messagers particuliers et

ainsi entrer en compétition avec eIF4G pour la liaison d'eIF4E. Par exemple, durant le transport d'*osk* dans l'ovocyte de drosophile (section 1.1.3.2), la traduction du messenger transporté est réprimée par la protéine de type 4EBP Cup via sa liaison à Bruno. Bruno reconnaît pour sa part des éléments de réponse présents dans le 3'UTR du transcrit (370). De façon similaire, CYFIPI empêche la formation d'eIF4F sur certains messagers qui sont reconnus par FMRP, dans les neurones de mammifères. Cette répression est réversible puisque CYFIPI est dissocié d'eIF4E par l'activité neuronale (372). Dans ce même système, la protéine CPEB lie les éléments de polyadénylation cytoplasmique (CPE) contenus dans certains messagers localisés dans les dendrites et inhibe leur traduction en recrutant une autre 4EBP, la protéine Maskin. Ce mécanisme a toutefois été plus approfondi dans un autre contexte, soit durant le développement du xénope. CPEB s'associe à une ribonucléase de la queue de polyA, ce qui a pour effet de raccourcir la queue de ses ligands, ce qui diminue aussi la traduction puisque globalement, les messagers avec des queues de polyA plus longues sont traduits plus efficacement (185, 192). Encore une fois, il s'agit d'un système modulable puisque le recrutement d'une polyA polymérase par CPEB et la phosphorylation de Maskin sont des événements qui dé-répriment la traduction en libérant eIF4E et en favorisant la liaison d'un autre facteur d'initiation de la traduction, PABP (192).

1.1.4.6.6 Mécanismes de contrôle ciblant eIF4G

Il a été documenté que la protéine d'échafaudage eIF4G est parfois visée dans le but de contrôler l'expression des protéines. L'interféron- γ restreint l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation dans les macrophages en induisant la phosphorylation de la protéine ribosomique L13a. Cette protéine montre des fonctions extra-ribosomiques puisqu'elle est subséquemment dissociée de la grande sous-unité et lie un élément de réponse présent dans le 3'UTR des messagers de ce type de gène, en compagnie d'autres facteurs (349). Le complexe formé, appelé GAIT, empêche le recrutement du complexe de pré-initiation puisque L13a entre en compétition avec eIF3 pour la liaison à eIF4G (250). Chez la levure *S. cerevisiae*, il est suggéré qu'un des répresseurs traductionnels d'*ASH 1*,

Khd1p (section 1.1.3.3), agit de façon similaire en s'associant à la portion C-terminale d'eIF4G. Toutefois, le mécanisme par lequel l'interaction eIF4G-Khd1p inhibe la traduction n'est pas élucidé. Il est intéressant de noter que contrairement à la plupart des protéines régulant la traduction, Khd1 lie la séquence codante du messenger réprimé plutôt que les régions non-traduites (391).

1.1.4.6.7 Inhibition du recrutement de la grande sous-unité ribosomique

Il y a par ailleurs de la redondance dans le contrôle de l'expression d'*ASH1* puisqu'un autre mécanisme de répression traductionnelle cible une étape différente de l'initiation. La protéine Puf6 interagit avec eIF5B, qui assiste normalement le recrutement de la sous-unité 60S. De façon intéressante, Puf6p empêche l'assemblage du ribosome sur le codon initiateur, ce qui pourrait refléter que cette protéine interfère avec l'action d'eIF5B (111). Chez les mammifères, ZBP1 (section 1.1.3.4) bloque également l'étape de l'association des sous-unités ribosomiques sur le messenger de l'actine- β (228). Il en est de même pour les hnRNPs K et E1 qui lient le 3'UTR de l'ARNm de la 15-lipoxygénase et préviennent sa traduction (386). De plus, tout comme pour ZBP, la phosphorylation de hnRNP K par la kinase Src rend le processus réversible puisque cette modification diminue l'affinité du répresseur pour l'élément d'ARN qu'il reconnaît normalement (385). Une récapitulation de quelques mécanismes spécifiques d'inhibition de l'initiation de la traduction est présentée à la figure 6.

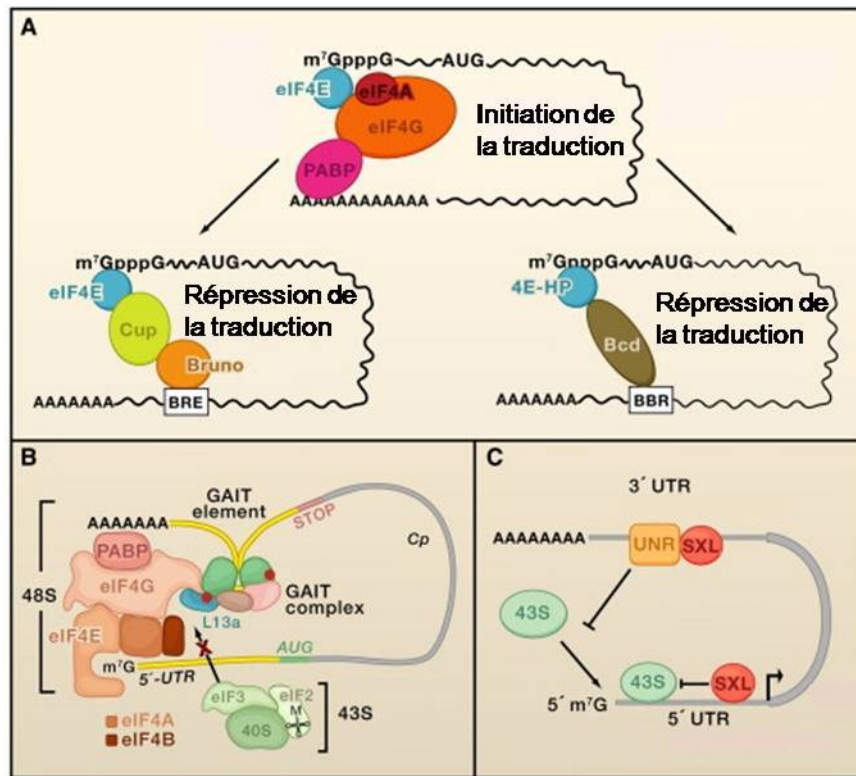


Figure 6: Exemples de mécanismes spécifiques d'inhibition de l'initiation de la traduction. A) Mécanismes d'inhibition ciblant eIF4F. Haut: L'association d'eIF4F (composé d'eIF4E, 4G et 4A) à la coiffe et son interaction avec PABP est nécessaire à l'initiation de la traduction. Bas, à gauche: L'interaction eIF4E-4G sur un messenger contenant un élément de réponse à Bruno (BRE) est inhibée par la séquestration d'eIF4E par Cup et Bruno. Bas, à droite: Le recrutement d'eIF4F sur un ARNm présentant une région de liaison par Bcd (BBR) est bloqué par un complexe formé de Bcd et de la protéine homologue à eIF4E (4E-HP). B) Inhibition du recrutement du complexe de pré-initiation 43S par le complexe GAIT sur un transcrite possédant un élément GAIT dans son 3'UTR. C) Double répression de la traduction d'un ARNm par SXL. La liaison de SXL sur le 3'UTR du messenger inhibe le recrutement du complexe de pré-initiation 43S alors que sa liaison sur le 5'UTR empêche la recherche du codon initiateur. Adapté de (471).

1.1.4.6.8 Mécanismes de contrôle post-initiation

À l'instar des mécanismes de contrôle de la traduction globale, il y a très peu de mécanismes spécifiques post-initiation qui ont été déchiffrés. Un exemple remarquable d'une modulation sélective ayant lieu durant l'élongation concerne le facteur de transcription Hac1 chez la levure. Son expression est induite par des stress au niveau du RER. La séquence codante du messenger de Hac1 contient un intron, qui peut s'apparier avec une séquence complémentaire en 5'UTR, ce qui fait en sorte que le messenger demeure silencieux, avec des ribosomes bloqués au stade de l'élongation (435). En cas de stress menant à une accumulation de protéines mal repliées, c'est l'épissage localisé de cet intron par l'endoribonucléase transmembranaire IRE1 qui va rétablir la traduction de Hac1 (15, 463).

1.1.5 Dégradation d'ARNm

L'équilibre entre la transcription et la dégradation d'un transcrit va ultimement déterminer les quantités d'ARNm disponibles pour la synthèse protéique. Ainsi, la modulation de la destruction d'un messenger contribue au réglage fin de son expression. La traduction et la dégradation d'un ARNm sont intimement liées puisque de nombreuses protéines régulatrices sont impliquées dans les deux processus (166). En outre, les structures qui favorisent la traduction, soit la coiffe et la queue de polyA protègent aussi le messenger de la dégradation. Inversement, la déadénylation d'un transcrit favorise à la fois sa répression traductionnelle et sa dégradation (185). Cela constitue généralement le premier pas dans la voie de dégradation, bien qu'il s'agisse d'une étape réversible.

1.1.5.1 Machinerie de dégradation

Les cellules eucaryotes disposent de plusieurs ribonucléases de la queue de polyA afin d'initier la déstabilisation d'un transcrit et ce répertoire varie d'une espèce à l'autre. Par

exemple, la déadénylase PAN2-PAN3 entreprend le travail en raccourcissant les queues de polyA de certains messagers dans le cytoplasme des cellules de mammifères (545). Chez la levure, cette même enzyme raccourcit plutôt les queues de polyA sur les messagers nouvellement synthétisés pour faciliter leur export du noyau (134). Par la suite, le complexe CCR4-NOT termine le travail amorcé par PAN2-PAN3 en dégradant le reste de la queue (545). Ce complexe est d'ailleurs responsable de la majorité de l'activité de déadénylation cytoplasmique de la levure (513). La ribonucléase PARN agit également sur les queues de polyA, mais n'est pas présente chez la levure et la drosophile (166). Ces ribonucléases exposent le corps de l'ARNm et facilitent l'accès à l'exosome, qui est responsable de la dégradation 3'→5' et montre également une activité endonucléase (14, 358, 442). La dégradation peut aussi s'amorcer à l'extrémité 5' d'un transcrit et dépend de l'enlèvement de la coiffe par un complexe enzymatique, soit un dimère des protéines DCP1 et DCP2 (133). Ces dernières requièrent de nombreux cofacteurs, dont le complexe LSM qui s'associe en 3' d'un ARNm déadénylé (498, 499). L'exoribonucléase 5'→3' XRN1 peut ensuite dégrader l'ARN (219). Les composants de la machinerie de dégradation sont présentés à la figure 7.

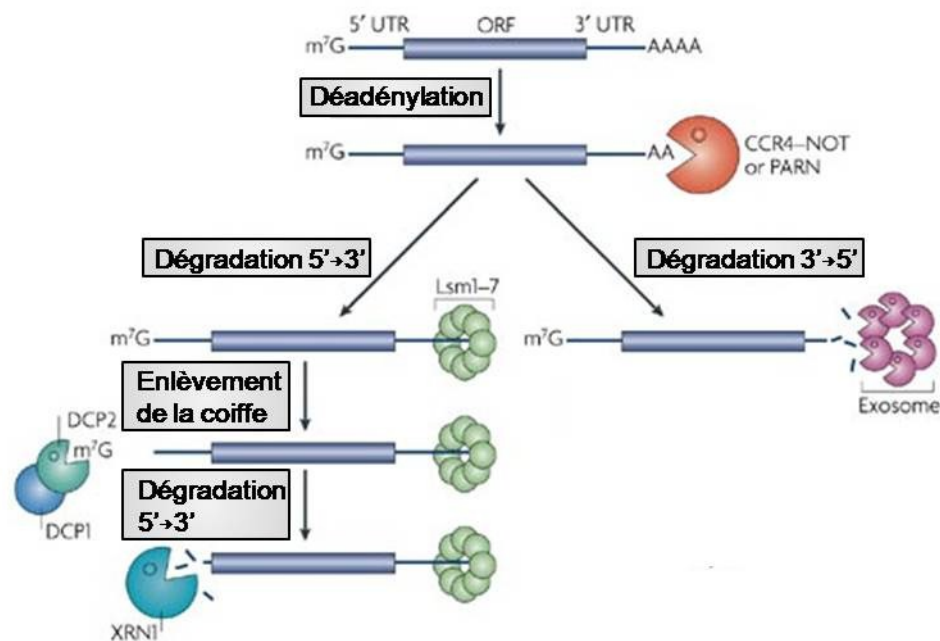


Figure 7: Voies de dégradation des ARNm de mammifères. La queue de polyA est d'abord enlevée par les ribonucléases CCR4-NOT ou PARN. Deux mécanismes permettent ensuite de compléter la dégradation de l'ARNm. L'association des protéines Lsm en 3' du messenger induit l'enlèvement de la coiffe par le dimère DCP1-2 et expose le messenger à l'action ribonucléase 5'→3' XRN1. D'autre part, l'exosome se charge de la dégradation 3'→5'. Adapté de (166).

La plupart des facteurs impliqués dans la dégradation des ARNm, à l'exception de l'exosome, sont retrouvés dans des structures granulaires dynamiques, les "processing bodies" (P-bodies). Ces particules cytoplasmiques desquelles sont exclus les ribosomes sont des sites dédiés à la dégradation des messagers et à l'entreposage de messagers dont la traduction est réprimée (141). Les P-bodies ne sont pas essentiels à la répression des messagers, mais pourraient en augmenter l'efficacité et empêcher l'accès aux transcrits à la machinerie de traduction (462).

La dégradation des ARNm ne nécessite pas toujours la répression de la traduction et d'ailleurs, l'endoribonucléase spécifique PMR1 s'attaque à des messagers sous forme de polysomes actifs en traduction (547). Son recrutement aux ribosomes est un processus régulé et requiert une phosphorylation par Src (546). Dans un même ordre d'idées, il a été suggéré que l'endoribonucléase IRE1 (section 1.1.4.6) puisse entamer la dégradation d'ARNm localisés au RER lors de stress causés par des protéines mal repliées (215).

1.1.5.2 Éléments d'instabilité

Les messagers ne sont pas tous dégradés au même rythme et la présence d'éléments en *cis* reconnus par des protéines liant l'ARN peut contribuer à la modulation de leur destruction. Par exemple, l'ARNm du proto-oncogène c-fos possède un déterminant d'instabilité dans sa région codante, sur lequel s'assemble un complexe via la protéine UNR. Ce complexe demeure inactif jusqu'à ce que survienne la traduction du messenger puisque

conséquemment au passage du ribosome, le messenger est déadénylé par CCR4, qui est recruté par le complexe. Ceci permet une restriction de l'expression de *c-fos* (75, 193). Une autre voie qui mène à la dégradation de *c-fos* implique des ARE (535).

Les ARE sont retrouvés dans plusieurs ARNm labiles qui codent entre autres pour des cytokines, des facteurs de croissance et des proto-oncogènes (19). Ces éléments sont liés spécifiquement par des protéines qui recrutent la machinerie de dégradation, même si dans certains cas les ARE peuvent recruter directement l'exosome (13). Par exemple, AUF1 recrute l'exosome, alors que KSRP interagit à la fois avec l'exosome et PARN (83, 175). TTP et BRF1 s'associent pour leur part à DCP1-DCP2 et ciblent des messagers aux P-bodies (153, 325). De façon générale, les protéines de la famille ELAV telles que HuR stabilisent les transcrits AU riches (23). Elles jouent possiblement ce rôle en liant compétitivement les sites reconnus par les protéines déstabilisatrices (286, 313). Il est toutefois important de noter qu'une étude a montré qu'HuR peut coopérer avec AUF1 pour déstabiliser l'ARNm p16^{INK4} (74). Les fonctions des facteurs liant les ARE semblent être régulées puisque leur phosphorylation en réponse à des signaux cellulaires peut modifier leur liaison à l'ARN, leur association à des partenaires effecteurs ou leur localisation subcellulaire (166). Une découverte suggère l'implication des microARN (miARN) dans la régulation des ARNm riches en AU. En effet, il a été montré que des composantes clés de la voie des ARN interférents, le miARN-16 et TTP sont impliqués dans la dégradation du messenger du TNF- α . Bien que le miARN-16 possède une séquence complémentaire avec un ARE situé dans le 3'UTR de ce messenger, ce pairage potentiel ne respecte pas les règles établies d'appariement entre un miARN et sa cible, ce qui suggère une collaboration entre TTP et le miARN dans la déstabilisation du transcrit (243).

1.1.5.3 Dégradation induite par les miARN

Chez les métazoaires, les miARN forment des hybrides imparfaits avec leurs cibles et certains d'entre eux déstabilisent les messagers auxquels ils sont associés. Par exemple, chez la drosophile, la dégradation des ARNm par les miRNP et GW182 requiert la machinerie responsable de l'enlèvement de la coiffe et la déadénylase CCR4 (32). Chez le poisson-zèbre, il a été montré que le miARN-430 est responsable de la dégradation d'ARNm maternels en soutenant leur déadénylation. La destruction de la queue de polyA en réponse à l'association avec des miARN a aussi été observée dans des cellules humaines (539). Enfin, une partie des messagers ciblés par les miRNPs s'accumulent dans les P-bodies (141, 394).

1.1.5.4 Dégradation induite par codon non-sens

En plus de constituer un pallier de régulation post-transcriptionnelle, la dégradation joue un rôle prépondérant dans le contrôle de la qualité puisque des mécanismes permettent la reconnaissance et la destruction de messagers aberrants qui pourraient être délétères pour la cellule (462). Une de ces voies bien caractérisées qui permet d'assurer la fidélité de l'expression génique est la dégradation induite par codon non-sens (NMD). Ce mécanisme prévient l'expression de messagers présentant des codons stop prématurés (PTC), ce qui générerait des protéines tronquées potentiellement nocives (76).

Le NMD existe chez tous les eucaryotes et des protéines conservées sont impliquées dans cette voie. Les facteurs essentiels au NMD sont les protéines de la famille UPF, soit UPF1, 2, 3 et 3X chez l'humain. Leur assemblage sur un messager cible ce dernier à la dégradation (97). Toutefois, le processus de reconnaissance d'un PTC semble varier d'une espèce à l'autre. Dans certains cas, il a été suggéré que la distance anormale entre le codon stop et la protéine PABP associée à la queue de polyA puisse déclencher le NMD (10, 31). Cependant, ce mécanisme est difficilement concevable pour des organismes ayant des

3'UTR plus long et plus complexes, (462). Il a aussi été proposé que la terminaison de la traduction sur un PTC soit reconnue puisqu'étant différente biochimiquement. Ceci est supporté par l'observation que les ribosomes semblent s'associer plus fortement à de tels codons, bien que ce phénomène ne soit pas bien compris (11, 462). Enfin, la présence de marqueurs en aval du codon stop qui seraient enlevés en temps normal lors du passage du ribosome pourrait identifier les messagers aberrants. D'ailleurs, chez les mammifères, la présence d'EJC en aval du codon stop est très rare dans la grande majorité des transcrits et engendre le NMD (section 1.1.1.3) (305).

Le NMD de mammifères semble survenir lors d'une ronde pionnière de la traduction, ce qui restreint la production de protéines possiblement néfastes (76). Les messagers qui sont de potentiels substrats du NMD sont liés par les facteurs nucléaires CBP80 et CBP20. Ce complexe s'associe à la coiffe des transcrits nouvellement synthétisés et peut soutenir la traduction, avant d'être remplacé par eIF4E (152, 234). Ainsi, lorsque le ribosome rencontre le PTC, les facteurs de terminaison eRF1 et eRF3 recrutent UPF1 et la kinase SMG1. Un pont peut alors se former entre ce complexe et l'EJC par l'entremise d'UPF2, qui lie à la fois UPF1 et UPF3, associé pour sa part à l'EJC (252). Par la suite, la phosphorylation d'UPF1 par SMG1 réprime d'autres rondes d'initiation sur l'ARNm puisque la forme hyperphosphorylée d'UPF1 interagit avec eIF3, ce qui bloque le recrutement de la sous-unité 60S (236). Subséquemment, les protéines SMG 5-6-7 vont contribuer à la déphosphorylation d'UPF1 et mobiliser la machinerie de dégradation (237). Un schéma récapitulatif du mécanisme de NMD chez les mammifères est présenté à la figure 8.

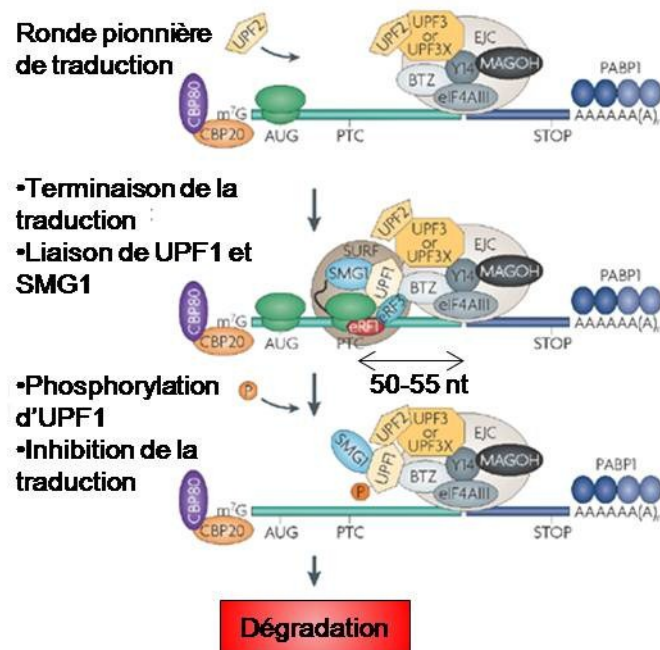


Figure 8: Modèle proposé pour le NMD de mammifères. Le complexe CBP80-20 lie la coiffe de l'ARNm et soutient la ronde pionnière de traduction. Lorsqu'il y a terminaison de la traduction sur le PTC, eRF1 et eRF3 recrutent UPF1 et SMG1, qui s'associent aussi avec l'EJC via UPF2. SMG1 phosphoryle UPF1, ce qui entraîne une inhibition de la traduction. La dégradation du messager est ensuite initiée. Adapté de (237).

Chez les levures, la drosophile et *C. elegans*, le NMD ne dépend pas de l'EJC et les mécanismes qui mènent à la reconnaissance d'un PTC ne sont pas très bien compris (462). De plus, des évidences suggèrent que le NMD peut survenir durant n'importe quelle ronde de traduction chez *S. cerevisiae* (330). Néanmoins, chez tous les eucaryotes, autant la voie de dégradation 5'→3' que la voie 3'→5' est employée pour détruire des messagers (76). Enfin, chez la drosophile et dans les cellules humaines, les substrats du NMD peuvent également être dégradés par clivage endonucléolytique, une activité imputable à SMG6 (136, 167, 227).

Les mutations dans le génome ou les erreurs du métabolisme d'ARN qui créent des PTC sont plutôt rares. Les réarrangements qui surviennent au niveau de l'ADN des gènes

qui codent pour les récepteurs des cellules T ou des immunoglobulines peuvent toutefois créer des substrats du NMD (76). La cellule exploite également ce mécanisme pour réguler l'expression de certains gènes, comme par exemple celle des protéines SR (section 1.1.1.2). Ces protéines influencent l'épissage alternatif et en agissant sur leurs propres messagers, elles génèrent des substrats du NMD par l'inclusion d'exons qui contiennent des PTC. Des régions extrêmement conservées à travers les espèces sont impliquées dans ce phénomène, excluant ainsi la possibilité qu'il soit le fruit du hasard. Ceci suggère que l'expression de ces facteurs d'épissage soit modulée par un mécanisme de rétrocontrôle négatif (290). Enfin, le messenger d'ARC (section 1.1.3.5) est une cible naturelle du NMD puisqu'il contient deux introns dans son 3'UTR. Il a été proposé que ceci permet une expression subite et limitée de la protéine ARC et laisse présager que d'autres ARNm localisés aux synapses soient soumis à une telle régulation (182).

Il est maintenant clair que la cellule eucaryote dispose de toutes les ressources nécessaires à l'expression régulée des gènes dans le temps et dans l'espace, de la naissance des transcrits jusqu'à leur disparition. Les besoins des cellules sont en constante évolution dépendamment des conditions auxquelles elles sont exposées. Elles peuvent ainsi s'adapter vu le caractère modulable de leurs outils de contrôle de l'expression post-transcriptionnelle.

1.2 Hypothèse de l'opéron post-transcriptionnel

Chez les procaryotes, le regroupement de gènes impliqués dans une même voie sous forme d'opérons d'ADN permet aux bactéries de répondre rapidement à plusieurs situations parce que cet arrangement génère des transcrits polycistroniques. Ces messagers sont synthétisés, traduits et dégradés simultanément, ce qui permet une expression concomitante des protéines pour lesquels ils codent. Toutefois, un des désavantages de ce système est qu'il empêche l'expression d'un seul des gènes de l'opéron (260). Au contraire, chez les eucaryotes, les gènes fonctionnellement reliés sont dispersés dans le génome. Puisque les protéines de ces organismes sont souvent multifonctionnelles (240), une telle organisation

génomique permet la régulation d'un gène indépendamment des autres. L'expression coordonnée de protéines impliquées dans un processus commun est tout de même primordiale pour le maintien de l'homéostasie des cellules eucaryotes. La transcription contribue significativement à cette synchronisation via la reconnaissance spécifique de promoteurs par des activateurs et des répresseurs transcriptionnels. Cependant, la cellule doit aussi orchestrer la traduction ou la dégradation d'ARNm reliés pour maintenir leur expression simultanée. C'est cette observation qui a mené Jack D Keene à émettre l'hypothèse que les RNP pourraient constituer des opérons post-transcriptionnels, à l'instar des opérons d'ADN chez les procaryotes (260).

1.2.1 Hypothèse de l'opéron post-transcriptionnel ou régulons d'ARN

L'hypothèse de l'opéron post-transcriptionnel (ou régulon d'ARN) stipule que des ARNm qui codent pour des protéines impliquées dans des voies communes ou partageant des localisations subcellulaires similaires sont régulés de façon coordonnée par des facteurs associés en *trans* (256, 260, 364). Ces facteurs peuvent être des protéines liant l'ARN ou des miRNP (259). Ils vont cibler des séquences ou des structures particulières dans les régions non-traduites des messagers, mais également dans leur séquence codante (257, 364). Ainsi, ces modulateurs peuvent servir d'adaptateurs qui recrutent diverses machineries cellulaires et déterminent le sort d'un groupe d'ARNm présents dans un RNP (259, 364).

La régulation coordonnée d'ARNm est avantageuse puisqu'elle permet à la cellule de répondre rapidement à des stimuli biologiques en remodelant des RNP composés de messagers déjà synthétisés (338). De plus, certains régulons d'ARN pourraient contenir des messagers qui codent pour des facteurs de transcription. Par conséquent, un contrôle de leur expression pourrait indirectement affecter l'expression d'une panoplie d'autres gènes (260).

Un messenger peut contenir plusieurs éléments de régulation et potentiellement faire partie de différents régulons d'ARN. De cette manière, toutes les copies d'un même transcrit

pourraient être régulées indépendamment. Cette supposition semble valable compte tenu qu'une redondance dans l'identité des ARNm liés spécifiquement par différentes protéines a été observée. Également, cette idée est compatible avec le fait que de nombreuses protéines ont évolué pour devenir multifonctionnelles. La présence de plusieurs éléments sur des messagers augmente les possibilités de réseaux de régulation de l'expression génique (260). Somme toute, c'est la combinaison des facteurs qui s'associent à un transcrit qui va déterminer le destin de ce dernier, ces facteurs pouvant coopérer ou être en compétition pour définir le contrôle subi par l'ARNm (257, 364).

1.2.2 Observations qui soutiennent l'hypothèse du régulon d'ARN

Depuis la formulation de cette hypothèse, un nombre croissant d'observations qui la soutiennent ont été rapportées. L'étude la plus spectaculaire est probablement celle de Hogan et *al* (213) dans laquelle les messagers associés à quarante protéines liant l'ARN ont été identifiés chez la levure *S. cerevisiae*. Les conclusions de cette recherche exhaustive appuient sans contredit plusieurs principes sous-jacents à l'hypothèse du régulon d'ARN et montrent l'étendue potentielle de la régulation post-transcriptionnelle. En effet, 70% du transcriptome de la levure est associé à au moins une de ces quarante protéines liant l'ARN, ce qui est énorme compte tenu qu'il a été évalué que *S. cerevisiae* possède plus de 500 protéines liant l'ARN. Aussi, plusieurs de ces protéines lient des groupes spécifiques de transcrits et les sous-groupes associés à une même protéine semblent partager des rôles physiologiques ou des localisations subcellulaires communes. De plus, des séquences spécifiques ou des structures prédites semblent être retrouvées dans plusieurs des cibles de certaines de ces protéines liant l'ARN et ce, autant dans les régions non-traduites des messagers que dans leur séquence codante. Enfin, chaque transcrit est lié en moyenne par trois de ces protéines, ce qui va de pair avec la notion de régulation combinatoire par les facteurs s'associant en *trans* aux messagers.

D'autres observations supportent l'idée que des groupes de messagers qui codent pour des protéines ayant une localisation subcellulaire commune soient régulés conjointement, en étant associés dans des mêmes RNP. En effet, il a été montré que des messagers distincts étant destinés aux mêmes structures cellulaires sont co-assemblés dans une particule de transport chez *S. cerevisiae* (288) ou dans un granule d'ARN dans les neurones de rats (163). Ces évidences illustrent donc que des messagers issus de gènes indépendants peuvent être associés physiquement dans les mêmes RNP.

Enfin, il a été noté que les populations d'ARNm associées à une protéine liant l'ARN peuvent varier en fonction de différentes perturbations cellulaires, ce qui confirme que les RNP peuvent être remodelés en fonction des besoins de la cellule (260).

1.2.3 Exemples de régulons d'ARN potentiels

L'amélioration des techniques de purification de RNP combinée à l'identification de leurs composants a permis l'étude de régulons d'ARN potentiels. Par exemple, il a été suggéré que le facteur d'initiation eIF4E joue un rôle central dans un régulon d'ARN (102). eIF4E a un potentiel oncogénique puisqu'il est surexprimé dans plusieurs cancers et son expression ectopique favorise la formation de tumeurs (363). Bien que cette protéine soit un facteur général d'initiation de la traduction, l'élévation de ses niveaux n'affecte pas la traduction globale, mais a un effet sur l'expression de messagers spécifiques (109). Ainsi, il a été montré que certains ARNm de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire sont liés par eIF4E dans le noyau et que la présence d'un élément commun dans leur 3'UTR favorise leur export dépendant de CRM1 (section 1.1.2.3) (103, 104). eIF4E se lie à la coiffe et agit de concert avec la protéine LRPPRC, qui s'associe à l'élément sensible à eIF4E présent dans le 3'UTR de ces messagers (508). Cette fonction d'eIF4E est modulable puisqu'elle est inhibée par la liaison de PML à eIF4E (92). Autrement, il a été montré que dans le cytoplasme de cellules qui subissent un stress apoptotique, une surexpression d'eIF4E promeut la survie et augmente la traduction de messagers qui possèdent des

éléments structurés en 5'UTR (293, 335). Ces études suggèrent donc qu'eIF4E contrôle un régulon d'ARN en coordonnant l'expression de gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire. De plus, ceci montre la présence de coopération entre plusieurs éléments au sein d'un régulon d'ARN.

Le système de régulation IRE/IRP possède aussi les caractéristiques d'un régulon d'ARN (section 1.1.4.6.1). La liaison des protéines IRP aux éléments de réponse contenus dans des gènes impliqués dans le maintien de l'homéostasie du fer est modulée par les niveaux intracellulaires de fer. Il est intéressant de noter que la liaison d'IRP sur un élément IRE en 5'UTR d'un messager inhibe sa traduction alors que l'association de ce facteur en 3'UTR stabilise le transcrite ciblé (207). IRP est donc un senseur qui joue un rôle décisif dans un réseau de régulation du métabolisme du fer, en modulant plus d'un palier de la régulation post-transcriptionnelle.

Les fonctions extra-ribosomiques de la protéine L13a lui confèrent également un rôle potentiel dans le contrôle d'un régulon relié à l'inflammation (section 1.1.4.6.6.). En effet, l'élément GAIT a été identifié dans de nombreux gènes pro-inflammatoires dont la traduction est réprimée en présence de l'interféron γ , qui active la phosphorylation de L13a (519). Puisque la phosphorylation de L13a est essentielle à sa fonction de répresseur traductionnel, il est intéressant de constater que les messagers des kinases qui phosphorylent L13a possèdent aussi des GAIT. Ainsi, cet axe de régulation permettrait un rétrocontrôle négatif du régulon dirigé par L13a (367).

Enfin, suite à l'observation que la dégradation de plusieurs messagers qui codent pour des régulateurs de l'immunité est synchronisée, il a été suggéré que les transcrits instables qui possèdent des ARE (section 1.1.5.2) puissent aussi faire partie d'un régulon de dégradation d'ARN (257). Puisque les protéines stabilisatrices de la famille ELAV/Hu et la protéine déstabilisatrice TTP partagent plusieurs ligands tels que des ARNm d'interleukines et de chimiokines (1, 57, 285, 485), il est plausible d'avancer qu'elles pourraient contrôler le

destin des membres d'un régulon post-transcriptionnel lors de la régulation de l'immunité (257).

1.2.4 Rôle central des protéines liant l'ARN

Ces exemples illustrent le rôle central joué par les protéines liant l'ARN puisqu'elles détiennent le pouvoir de contrôler une myriade de gènes. Il a ainsi été évalué que le protéome des eucaryotes contient de nombreuses protéines liant l'ARN (183, 364). D'ailleurs, le dérèglement de l'expression de ces protéines ou encore leur mutation est à la source de certaines maladies.

Par exemple, le syndrome de l'X fragile est une maladie caractérisée par un retard mental étant causée par l'absence d'expression de FMRP (378). Cette protéine lie de multiples ARNm et pourrait faire partie d'un ou plusieurs régulons d'ARN. FMRP est principalement connu pour son rôle dans le contrôle de la traduction (378), quoiqu'il soit aussi suggéré qu'il ait des implications dans le transport et la stabilisation de messagers (107, 116, 359). FMRP possède trois domaines consensus de liaison à l'ARN, soit deux domaines de type KH et un domaine de type RGG. Il est intéressant de noter que dépendamment des éléments d'ARN qu'il lie via ses différents domaines, FMRP peut agir à titre de répresseur (section 1.1.4.6.5) (106, 321, 372) ou d'activateur de la traduction (29, 143), sans compter qu'une association entre FMRP et la voie des miRNA a été démontrée (71, 235). Ainsi, FMRP est une protéine multifonctionnelle qui est impliquée dans divers aspects du contrôle post-transcriptionnel de l'expression génique. Certaines facettes de la maladie pourraient être expliquées par l'absence de régulation de transcrits normalement liés par FMRP dans les neurones (27, 29).

Le contrôle de l'expression des protéines liant l'ARN ou la modulation de leurs fonctions fait en sorte qu'il est possible d'influencer indirectement les membres d'un régulon d'ARN. Le contrôle de l'expression de facteurs impliqués dans l'épissage alternatif par le NMD a déjà été abordé (section 1.1.5.4). De plus, il a été montré que les protéines qui lient

les ARE peuvent lier leur propre ARNm, en plus de lier les messagers d'autres membres de cette famille pour réguler leur expression (415). Enfin, les protéines dirigeant des régulateurs d'ARN peuvent être intégratrices de signaux puisque leur modification post-traductionnelle découlant de cascades de signalisation va moduler leurs fonctions et conséquemment, l'expression de leur cibles.

1.3 Régulation post-traductionnelle des protéines liant l'ARN

La modulation de l'activité de protéines déjà existantes par des modifications post-traductionnelles réversibles est un moyen efficace pour la cellule de répondre à divers signaux. Les modifications post-traductionnelles peuvent changer la conformation des protéines, créer de nouveaux motifs de liaison ou bloquer des interactions entre des partenaires (226). Ainsi, la modification des protéines liant l'ARN peut faciliter un remodelage rapide des RNP qui va affecter le destin des messagers liés par ces facteurs. La phosphorylation est probablement la modification post-traductionnelle qui contribue le plus à la transduction du signal, d'où son implication dans tous les processus cellulaires (514).

1.3.1 Phosphorylation des protéines liant l'ARN

La phosphorylation est caractérisée par le transfert du phosphate γ d'une molécule d'ATP à certains acides aminés, généralement des sérines (Ser), des thréonines (Thr) ou des tyrosines (Tyr). Cette modification covalente des protéines est catalysée par un vaste répertoire de kinases qui reconnaissent spécifiquement leurs substrats et qui font partie intégrante des cascades de signalisation. Ce processus est réversible puisque les cellules disposent d'un assortiment de protéines phosphatases qui vont contrecarrer les effets des kinases (226). Les protéines qui lient l'ARN n'échappent pas à l'action de ces deux types d'enzymes et il est devenu évident que leur niveau de phosphorylation va influencer divers aspects de leurs fonctions régulatrices.

1.3.1.1 Modulation de la liaison d'ARN

La phosphorylation des protéines peut moduler leur liaison à l'ARN et la conséquence de cette modification va dépendre du rôle joué par la protéine dans la régulation post-transcriptionnelle. Par exemple, la phosphorylation des répresseurs traductionnels ZBP1 (228) et hnRNPK (385) par la tyrosine kinase Src va réduire leur affinité pour leurs cibles respectives, soit les messagers de la β -actine et de la 15-lipoxygénase (section 1.1.4.6.7). Conséquemment, la répression de ces transcrits sera levée. Le même phénomène a déjà été décrit pour la dé-répression de la traduction du messenger *ASH1* (section 1.1.3.3) alors que la phosphorylation des répresseurs Khd1p (391) par Yck1 et Puf6p par Ck2 (111) diminue leur affinité pour *ASH1*.

La régulation de l'association entre des messagers et des protéines par la phosphorylation de ces dernières peut avoir des répercussions variables sur l'expression de leurs cibles. En réponse à un stress oxydatif, la kinase Chk2 phosphoryle plusieurs résidus de la protéine HuR (2), qui lie des transcrits qui possèdent des ARE et les stabilise (section 1.1.5.2). Ainsi, certains ARNm sont déstabilisés suite à la modification de HuR, puisqu'ils sont dissociés de ce facteur protecteur. Étonnamment, d'autres transcrits sont stabilisés par une liaison accrue à HuR dans ces mêmes conditions, ce qui suggère que l'association de HuR à ses ligands dans une situation donnée dépend de la nature du transcrit (2). La phosphorylation du déstabilisateur KSRP (section 1.1.5.2) par p38 compromet aussi sa liaison à des transcrits possédant des ARE, ce qui entraîne leur stabilisation durant la myogenèse. Toutefois, cette phosphorylation ne semble pas empêcher KSRP de recruter la machinerie de dégradation (59).

1.3.1.2 Modulation des partenaires protéiques

Les protéines liant l'ARN s'associent à diverses machineries cellulaires et leur phosphorylation peut également moduler ce type d'interactions. Par exemple, la

phosphorylation de KSRP par la kinase AKT sur un site distinct de celui ciblé par p38 va aussi inactiver sa fonction déstabilisatrice, sans toutefois affecter sa liaison à l'ARN. Cette modification va promouvoir son association à une protéine d'échafaudage de la famille 14-3-3 et interférer avec le recrutement de l'exosome (176, 436). Ce thème est récurrent chez les protéines liant et déstabilisant les messagers qui contiennent des ARE puisque la phosphorylation de BRF1 et TTP (section 1.1.5.2) peut favoriser la liaison de protéines 14-3-3, ce qui inhibe leur activité (36, 244, 443, 484).

La phosphorylation des protéines liant l'ARN peut aussi influencer leur association avec la machinerie de traduction. Entre autres, la phosphorylation de l'endonucléase spécifique PMR1 (section 1.1.5.1) par SRC est requise pour la cibler aux polysomes actifs en traduction (546). À l'inverse, la fraction de FMRP (section 1.2.4) qui est phosphorylée par la kinase de S6 est associée à des polysomes qui semblent bloqués au niveau de l'élongation, à l'opposé de la portion non-phosphorylée de FMRP qui co-sédimente avec des polysomes actifs dans des gradients de saccharose (72, 373). De plus, il a été montré que cette même phosphorylation inhibe l'interaction entre FMRP et Dicer, quoique le lien qui unit l'absence d'interaction entre FMRP et Dicer à l'inhibition de la traduction ne soit pas très clair (82). Cette modification est conservée à travers les espèces et ne semble pas influencer l'association de FMRP à ses ARNm cibles dans les cellules de mammifères (72). Au contraire, chez la drosophile, la phosphorylation de l'orthologue de FMRP augmente son interaction avec l'ARN *in vitro* (468). Enfin, la phosphorylation d'UPF1 par SMG1 promeut sa liaison à eIF3, ce qui réprime la traduction des transcrits destinés à être dégradés par le NMD (section 1.1.5.4) (236).

Il a déjà été mentionné que les modifications post-traductionnelles peuvent réguler l'export d'ARNm (section 1.1.2.2). La déphosphorylation de protéines de type SR, qui s'associent aux transcrits nouvellement synthétisés, est nécessaire pour qu'elles interagissent avec les récepteurs d'export nucléaire et qu'elles subissent un transport nucléocytoplasmique (177, 178, 222, 223). Par la suite, leur phosphorylation cytoplasmique

les dissocie des messagers et permet leur retour au noyau. Ceci illustre que la phosphorylation peut moduler la localisation subcellulaire des protéines liant l'ARN.

1.3.1.3 Modulation de la localisation subcellulaire

Beaucoup de protéines liant l'ARN ont une distribution nucléocytoplasmique. Puisque certaines étapes de la vie d'un transcrit se déroulent dans le noyau alors que d'autres ont lieu dans le cytoplasme, le contrôle de la localisation subcellulaire des protéines liant l'ARN représente un moyen de réguler l'expression génique (68).

Par exemple, la protéine HuR est surtout nucléaire et il a été proposé que sa translocation dans le cytoplasme lui permette d'exporter les ARNm qui lui sont associés, de les stabiliser et de favoriser leur traduction (144, 145, 258, 348). Ce transport semble être régulé par de multiples phosphorylations dans une région de HuR qui contient à la fois des éléments d'export et de localisation nucléaire. Ainsi, la phosphorylation de cette région d' HuR par les isoformes α et δ de la protéine kinase C stimule l'export nucléaire de la protéine, ce qui lui permet de stabiliser les messagers de la cyclooxygénase-2 (119, 120). À l'opposé, la phosphorylation de HuR par la kinase dépendante des cyclines (Cdk) 1 contribue à sa rétention nucléaire. Ce processus requiert l'association de HuR phosphorylé à 14-3-3 θ (265). L'association des protéines 14-3-3 à la forme phosphorylée d'autres protéines qui lient les ARE semble d'ailleurs moduler la localisation de ces dernières. C'est le cas pour TTP phosphorylé qui se redistribue dans le cytoplasme subséquent à sa liaison à plusieurs isoformes de 14-3-3 (62, 244). Inversement, la phosphorylation de KSRP crée un site de liaison pour 14-3-3 ζ , qui maintient KSRP au noyau (115). Ainsi, la séquestration d'une protéine, via sa phosphorylation, à l'intérieur ou à l'extérieur du compartiment où elle exécute normalement ses fonctions est une autre façon de contrôler l'expression post-transcriptionnelle des gènes.

1.3.1.4 Modulation de la stabilité

Enfin, il y a quelques évidences qui montrent que la stabilité des protéines liant l'ARN peut être régulée par phosphorylation. La phosphorylation de TTP, en plus d'inhiber sa liaison à l'ARN par le recrutement d'une protéine de type 14-3-3, contribue à sa stabilisation en empêchant sa dégradation par le protéasome (62, 212). Également, il a été montré que la phosphorylation de HuR par Chk2 ralentit sa dégradation cytoplasmique dépendante du système ubiquitine-protéasome, qui survient en cas de choc thermique (3). La phosphorylation contribue donc à la modulation des niveaux fonctionnels des régulateurs de l'expression génique post-transcriptionnelle et ce, en combinaison avec une autre modification post-traductionnelle qui est l'ubiquitination. Ces observations ne sont pas surprenantes puisque la phosphorylation des protéines peut parfois créer des sites reconnus par des ubiquitine ligases ou à l'inverse, cette modification peut empêcher la liaison d'ubiquitine ligases à leur substrat (226).

1.3.2 Ubiquitination des protéines liant l'ARN

L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés hautement conservée qui est retrouvée chez tous les eucaryotes (261). Cette molécule est conjuguée spécifiquement à des protéines, un processus appelé ubiquitination. La modification covalente des protéines par l'ubiquitine peut changer leur conformation ou encore créer de nouvelles plateformes d'interaction (450). Ce processus module les fonctions des protéines de diverses façons et régule des événements critiques tels que la progression dans le cycle cellulaire, la réponse inflammatoire, la transcription, la réparation de l'ADN et l'endocytose. Le dérèglement de ce système est d'ailleurs associé à de nombreuses maladies, telles le cancer (209). L'ubiquitination a avant tout été identifiée comme une modification post-traductionnelle qui cible au protéasome 26S des protéines qui doivent être éliminées (209), bien que la fixation d'ubiquitine sur un substrat ne signifie pas toujours qu'il doit être dégradé par protéolyse (404).

1.3.2.1 Ubiquitine ligases et système ubiquitine-protéasome

L'ubiquitination est catalysée par l'action séquentielle d'ubiquitine ligases, qui créent un lien isopeptidique entre la glycine C-terminale d'une molécule d'ubiquitine activée et une lysine d'un substrat (209). Dans certains cas, l'ubiquitine peut être également ajoutée au groupement NH₂ du résidu présent en position N-terminale d'un substrat (90). Pour débiter le processus d'ubiquitination, l'ubiquitine doit d'abord être activée par une E1 ubiquitine-ligase. Ceci requiert la consommation d'une molécule d'ATP qui sert à la conjugaison de l'ubiquitine sur l'enzyme de type E1. Par la suite, l'ubiquitine est transférée à une E2 ubiquitine ligase qui s'associe également à une E3 ubiquitine ligase. L'enzyme de type E3 est responsable de la reconnaissance du substrat et son rôle minimal consiste à rapprocher l'enzyme E2 du substrat pour permettre sa modification. Toutefois, l'enzyme de type E3 peut aussi accepter la molécule d'ubiquitine liée à l'enzyme de type E2 et la transférer subséquemment au substrat (209). Tout comme dans le cas de la phosphorylation, cette modification spécifique est réversible puisqu'en plus de posséder une variété d'E3 ubiquitine ligases qui contribuent à la sélectivité du mécanisme, les cellules disposent de plusieurs hydrolases, les "deubiquitinating enzymes" (DUB) (226).

Les conséquences de l'ubiquitination vont varier en fonction de la façon dont les molécules d'ubiquitine sont conjuguées à une protéine. L'ajout d'une seule ubiquitine à une ou plusieurs lysines d'un substrat est un processus appelé monoubiquitination. La monoubiquitination est impliquée entre autres dans la régulation de la transcription via la modification des histones, dans l'endocytose et dans le transport des protéines (211).

Puisque l'ubiquitine possède sept lysines, des chaînes de polyubiquitine peuvent être assemblées à partir d'une ubiquitine conjuguée à une protéine. Des enzymes de type E4 ubiquitine ligase peuvent d'ailleurs participer à l'élongation des chaînes d'ubiquitine dans certains cas (276). Il a été montré que toutes les lysines de l'ubiquitine peuvent soutenir la création de chaînes de polyubiquitine (396, 542) et il est suggéré que le type de chaîne

formé détermine le signal véhiculé par la protéine modifiée (405). Par exemple, les chaînes formées à partir de la lysine 48 de l'ubiquitine semblent promouvoir la dégradation des protéines en les ciblant au protéasome (149), tout comme les chaînes formées à partir de la lysine 11 qui sont impliquées dans la dégradation associée au RER (542). Au contraire, les chaînes formées via la lysine 63 ne soutiennent pas la dégradation des protéines modifiées et semblent plutôt jouer des rôles dans d'autres processus biologiques tels la réponse immunitaire (405). De façon générale, il est admis que la présence de quatre ubiquitines ou plus dans une même chaîne est un signal de ciblage au protéasome 26S (504). Ce mégacomplexe va déplier les protéines, les dégrader et recycler les ubiquitines présentes sur celles-ci, ce qui va requérir la consommation d'ATP (405). Le système de dégradation ubiquitine-protéasome est illustré à la figure 9.

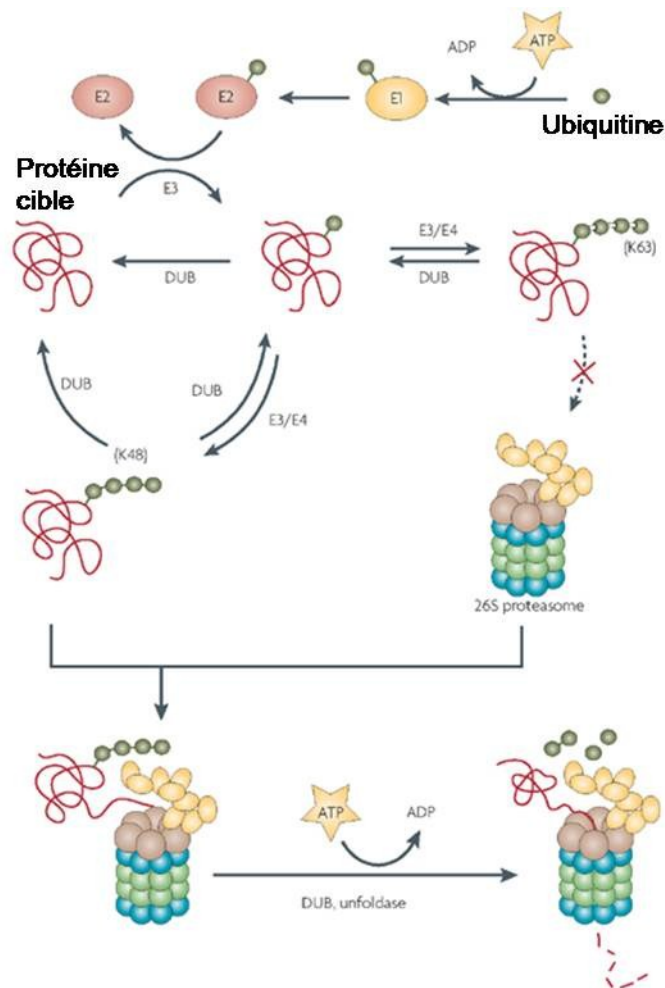


Figure 9: Représentation schématique du système ubiquitine-protéasome. L'ubiquitine est d'abord couplée à une E1 ubiquitine ligase par un mécanisme qui requiert la consommation d'une molécule d'ATP, avant d'être transférée à une ubiquitine ligase de type E2. Une E3 ubiquitine ligase participe ensuite au transfert de l'ubiquitine activée sur la protéine cible. Une chaîne peut alors être formée par l'action d'ubiquitine ligases de type E3 ou E4. Des chaînes formées à partir de la lysine 48 de l'ubiquitine (K48) vont cibler la protéine modifiée la la dégradation par le protéasome alors que des chaînes formées à partir de la lysine 63 (K63) n'ont pas cette fonction. Le protéasome va recycler les ubiquitines et déplier les protéines cibles avant de les dégrader par un processus nécessitant de l'ATP. L'ubiquitination est un processus réversible grâce à l'action des DUB. Adapté de (492).

1.3.2.2 Modulation de la stabilité des protéines liant l'ARN

La principale fonction du système ubiquitine-protéasome est de dégrader sélectivement des protéines dont la cellule n'a plus besoin. Il y a d'ailleurs quelques études qui ont évalué le rôle de ce système dans la régulation des protéines liant l'ARN. Ainsi, il a déjà été mentionné que la protéine stabilisatrice HuR est dégradée par le protéasome en réponse à un choc thermique (section 1.3.1.4). La diminution de l'expression de HuR semble importante pour la survie des cellules après ce stress puisque l'expression d'un mutant non-dégradable d'HuR diminue la viabilité des cellules. Il est donc suggéré que la déstabilisation de messagers normalement liés par HuR puisse contribuer à l'adaptation des cellules et à leur récupération dans des conditions difficiles (3). La dégradation via le protéasome d'une autre protéine liant les ARE a aussi été observée. En effet, la protéine déstabilisatrice AUF1 peut aussi être ubiquitinée et dégradée, conjointement à un messenger rapporteur contenant un ARE. Suite à cette observation inusitée, il a été suggéré que les cibles d'AUF1 soient dégradées de concert avec ce dernier, par un mécanisme qui n'est pas encore élucidé (291, 292).

D'autre part, il a été montré que l'activité neuronale chez la drosophile entraîne la dégradation par le protéasome de la protéine Armitage, une hélicase d'ARN impliquée dans la voie des miARN. Il a été proposé que ceci soit important pour l'établissement de la mémoire à long terme en permettant la traduction locale d'ARNm dont l'expression était auparavant réprimée par l'action des miRNP (16). Dans un autre contexte, soit durant la maturation de l'ovocyte du xénope, il a été observé que la protéine CPEB impliquée dans le contrôle traductionnel d'ARNm est aussi une cible du système ubiquitine-protéasome (section 1.1.4.6.5). Ainsi, l'activation de CPEB par sa phosphorylation à des stades précoces du développement va promouvoir la polyadénylation et la traduction de certains messagers qui arborent un CPE. Ultérieurement, la dégradation partielle de CPEB va être requise afin de permettre l'expression d'une autre catégorie de cibles de CPEB, qui contiennent plus d'un CPE. Cet événement est essentiel à la progression dans d'autres stades

de maturation de l'œuf (351, 427). CPEB peut également réprimer la traduction et il a été proposé qu'un contrôle fin de ses niveaux soit nécessaire pour assurer l'expression de ses cibles qui contiennent plus d'un CPE (351). L'E3 ubiquitine ligase $SCF^{\beta\text{-TCRP}}$ est responsable de la reconnaissance et de l'ubiquitination d'une forme de CPEB phosphorylée par Cdk1 et Plk1, ce qui va sans doute mener à sa dégradation par le protéasome 26S (454).

1.3.2.3 Autres rôles de l'ubiquitination des protéines liant l'ARN

L'ubiquitination ne sert pas toujours de signal conduisant les protéines à la dégradation et cette modification pourrait d'ailleurs être impliquée dans d'autres aspects de la modulation des protéines liant l'ARN. Le rôle des ubiquitines ligases dans l'export des messagers chez la levure a déjà été évoqué (section 1.1.2.2) et ceci laisse présager que l'ubiquitination pourrait contrôler la localisation subcellulaire des protéines liant l'ARN (132, 200, 201, 374, 432). Enfin, il est intéressant de souligner que l'ubiquitination de HuR en cas de choc thermique se produit dans un de ses domaines liant l'ARN. Il a donc été proposé qu'en plus de permettre la dégradation des protéines liant l'ARN, leur modification pourrait interférer avec leur fonction de liaison d'ARN. Cette hypothèse doit toutefois être testée (3).

Il est maintenant concevable que l'expression et les fonctions des protéines liant l'ARN peuvent être contrôlées de diverses manières. Vraisemblablement, toutes les étapes menant à leur expression peuvent être ciblées, soit la transcription, la traduction et la dégradation de leur ARNm, sans compter que leurs fonctions peuvent être modulées par des modifications post-traductionnelles. À de nombreux égards, les régulateurs qui jouent un rôle prépondérant dans la transcription ou dans la modification des protéines peuvent aussi être contrôlés par des mécanismes s'exerçant à tous les niveaux. Ces liens entre tous les types de modulateurs de l'expression génique illustrent la relation d'interdépendance entre les différentes classes de régulation et par le fait même, l'extrême complexité des réseaux de contrôle. La coordination de l'expression génique dépend donc de nombreux

intervenants qui doivent assurer l'efficacité et le bon déroulement des processus biologiques indispensables au maintien de l'homéostasie des cellules. Le cycle de division cellulaire est un bon exemple de processus où l'expression combinée de régulateurs et des gènes sous leur gouverne est primordiale.

1.4 Régulation de l'expression génique et cycle cellulaire

Chez les levures, la prolifération cellulaire générée par des cycles de division relève principalement de l'abondance de nutriments alors que chez les eucaryotes pluricellulaires, l'engagement dans un cycle de division cellulaire dépend plutôt de la présence de signaux mitogènes (96, 245). Ce processus est essentiel au développement des pluricellulaires et demeure capital une fois qu'ils ont atteint leur maturité afin de renouveler les cellules perdues au cours de leur vie.

1.4.1 Aperçu du cycle de division cellulaire

Le cycle de division cellulaire consiste en la réplication du génome d'une cellule qui se divise ensuite en deux cellules-filles, où les chromosomes dédoublés sont ségrégués équitablement. La croissance cellulaire est intimement liée au cycle cellulaire puisque les cellules doivent doubler leur contenu avant de compléter une division afin de maintenir l'homéostasie de leur taille au fil des cycles cellulaires successifs (245). Le cycle cellulaire se subdivise en deux temps soit l'interphase, où a lieu la réplication de l'ADN et la mitose, durant laquelle les chromosomes dupliqués sont séparés dans les deux cellules résultant de la division.

L'interphase se partage en trois phases, soit les phases G_1 , S et G_2 . La phase G_1 est un intervalle pendant laquelle les cellules se préparent à la synthèse d'ADN. En début de phase G_1 , des complexes pré-réplicatifs sont assemblés sur l'ADN aux endroits où se trouvent les origines de réplication (118). Puisqu'elles doivent éventuellement synthétiser de nombreuses macromolécules comme des nucléotides, des acides aminés et des lipides, le

métabolisme des cellules est très actif (516). Ces dernières doivent aussi parvenir à une certaine taille avant de pouvoir entreprendre un cycle de division et la néosynthèse de ribosomes contribue substantiellement à l'atteinte de ce seuil (500, 525). Une fois cet objectif réalisé, si les cellules sont dans des conditions favorables, elles s'engagent irréversiblement dans un cycle de division cellulaire en passant par une étape appelée point de restriction chez les métazoaires (392) et point de départ chez la levure (206). La transcription de nombreux gènes sous le contrôle des facteurs E2F chez les métazoaires et des complexes SBF et MBF chez la levure *S. cerevisiae* est alors activée. Ceci mène à l'expression de protéines requises pour la transition G1/S et pour la réplication de l'ADN (159, 480).

La phase S correspond à la phase de synthèse d'ADN, où une copie conforme du matériel génétique de la cellule est générée. La réplication s'initie sur de nombreuses origines conséquemment au recrutement de l'ADN polymérase par les complexes pré-réplicatifs formés en G₁ (34). De plus, la duplication des centrioles est un événement qui se produit parallèlement à la réplication de l'ADN. En association avec un nuage de protéines, ces organites forment le centrosome et sont responsables de l'organisation du réseau de microtubules formé en mitose (156).

La cellule doit avoir copié tout son ADN avant de pouvoir progresser vers la phase suivante, soit la phase G₂. Elle se prépare alors à procéder à la division cellulaire et la fidélité de réplication de l'ADN est vérifiée (439). Vers la fin de la phase G₂, les chromosomes commencent à se condenser et la cellule peut alors entrer dans la phase subséquente, soit la phase M.

Durant la phase M ou mitose, les cellules vont compléter leur division. La mitose est décrite comme une phase se subdivisant en six étapes qui ont été définies en fonction des changements morphologiques observés pendant la progression vers la division cellulaire (7). Ainsi, la prophase est la première étape à survenir tout juste après la phase G₂. Elle est caractérisée par l'achèvement de la condensation des chromosomes entreprise

préalablement (408). Elle se termine par la fragmentation de l'enveloppe nucléaire, qui marque la transition vers la prométaphase (7). Il est à noter que ce phénomène n'est pas observé chez tous les eucaryotes puisque chez les levures, la structure du noyau n'est jamais rompue et chez *C. elegans*, l'enveloppe nucléaire ne se brise que partiellement (408). Pendant la prométaphase, un réseau de microtubules portant le nom de fuseau mitotique est assemblé à partir des deux centrosomes séparés et les chromosomes condensés commencent à s'y attacher via un complexe protéique formé au niveau de leur centromère, soit le kinétochore. L'association des chromosomes à chacun des pôles du fuseau entraîne peu à peu leur positionnement sur la plaque métaphasique. Une fois leur alignement complété, les chromosomes se trouvent à équidistance des pôles du fuseau et cet état se nomme métaphase. S'ensuit l'anaphase, où les chromosomes sont disjoints. Subséquemment, les chromatides sœurs migrent chacune de leur côté en direction des pôles opposés du fuseau mitotique. Une fois que les chromatides sont arrivées à destination, le fuseau mitotique est démantelé et l'enveloppe nucléaire se reforme autour des deux séries de chromosomes. Cette étape s'appelle télophase (7). Enfin, la division est complétée durant la cytokinèse. Un anneau d'actine et de myosine est mis en place entre les futures cellules-filles et celles-ci deviennent indépendantes après la contraction de cet anneau, ce qui permet la séparation des deux cellules par clivage (196). Le cycle recommence alors puisque les cellules-filles générées par la division se retrouvent en début de phase G_1 .

Dans les tissus d'organismes pluricellulaires adultes, la plupart des cellules arrêtent de proliférer et demeurent dans un état de quiescence, aussi appelé phase G_0 . Cet état réversible pendant lequel les cellules quittent le cycle de division cellulaire est causé par l'absence de signaux mitogènes ou par des signaux antimitogéniques spécifiques (334). Les différentes étapes du cycle cellulaire sont schématisées à la figure 10.

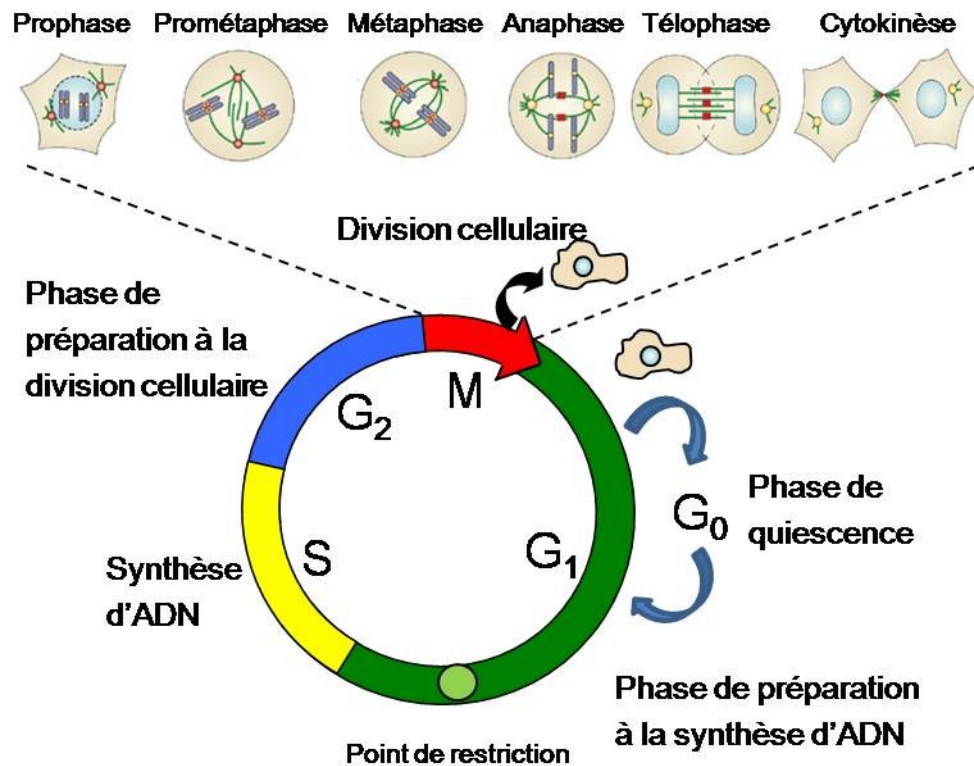


Figure 10: Représentation schématique du cycle cellulaire de mammifères. Les chromosomes sont colorés en violet, les microtubules en vert, les centromères en orangé et les noyaux en bleu clair. Les six étapes de la mitose présentées sont une adaptation de (22).

1.4.2 Mécanismes de régulation du cycle cellulaire

La progression dans le cycle cellulaire est un processus hautement régulé. Les événements se déroulant durant le cycle doivent être parfaitement orchestrés afin que les différentes phases se succèdent dans le bon ordre, sans accumulation d'erreurs qui pourraient altérer le matériel génétique des cellules et causer des maladies telles le cancer. D'ailleurs, la cellule doit satisfaire de nombreuses conditions en passant par divers points de contrôle qui s'assurent de la qualité du matériel génétique avant que la progression dans le cycle soit permise. L'action de multiples régulateurs est donc requise pour coordonner l'expression et la disponibilité des protéines impliquées dans toutes les étapes importantes

du cycle comme le passage du point de restriction, la réplication de l'ADN, la condensation des chromosomes, la séparation des chromatides sœurs et la cytokinèse.

1.4.2.1 Cyclines et kinases dépendantes des cyclines

Les protéines kinases dépendantes des cyclines ou Cdk jouent un rôle fondamental dans la régulation du cycle de division cellulaire et sont indispensables à la progression dans le cycle cellulaire, de la décision de la cellule d'entrer dans le cycle jusqu'à la transition métaphase/anaphase (195). Elles sont responsables de l'activation de facteurs de transcription qui régulent l'expression des gènes requis pour les différentes étapes du cycle cellulaire. Elles vont aussi faciliter l'initiation efficace de la réplication de l'ADN et la coordination des événements en début de mitose (43).

Les Cdk sont fonctionnelles suite à la formation d'un hétérodimère entre une Cdk qui détient une activité catalytique et une unité régulatrice cycline. Leur activité est modulable de plusieurs façons (334). En effet, la portion kinase est beaucoup plus abondante que la portion régulatrice cycline et ce déséquilibre limite l'activation de l'enzyme. Les cyclines sont exprimées de façon transitoire, ce qui est imputable au contrôle transcriptionnel de leur expression et à leur dégradation ciblée par le système ubiquitine-protéasome. Leur localisation subcellulaire peut également être sujette à régulation ce qui amène un autre niveau de contrôle de leur fonction activatrice (43). Le complexe cycline-Cdk peut aussi être ciblé par différents régulateurs. Par exemple, son activité est contrôlée par phosphorylation et il peut être inactivé par son interaction avec des inhibiteurs (334). Compte tenu de toutes ces possibilités de régulation, il a été suggéré que des boucles de rétrocontrôle positives conduisent à l'activation concrète des Cdk. Ainsi, des évidences montrent que l'activité des Cdk peut favoriser l'expression de leur cycline attirée et contribuer à l'inactivation de leurs inhibiteurs (470).

Chez les levures, une seule Cdk est responsable de mener à bien le cycle cellulaire et elle va s'associer momentanément à différentes cyclines au cours du cycle. Chez les

animaux, plusieurs Cdk vont entrer en scène à différents moments du cycle cellulaire, en association avec une variété de cyclines (43).

La synthèse des cyclines de type D est initiée en présence de signaux mitogènes chez les métazoaires, ce qui mène à la formation des complexes Cdk4-Cycline D et Cdk6-Cycline D. Leurs principales cibles sont les inhibiteurs du facteur de transcription E2F, qui se dissocient partiellement d'E2F suite à leur phosphorylation. Par conséquent, une activation incomplète d'E2F s'ensuit et conduit tout de même à la transcription de la Cycline E. Cette cycline s'associe à Cdk2 et poursuit le travail entrepris précédemment en phosphorylant de nouveau les inhibiteurs d'E2F pour les inactiver complètement. Cet événement entraîne le passage du point de restriction et le travail du complexe Cdk2-Cycline E ne s'arrête pas là puisqu'il contribue aussi à l'initiation de la synthèse d'ADN à la transition G₁/S (334).

Il est alors primordial que la Cycline E soit dégradée par le système ubiquitine-protéasome afin d'éviter la ré-initiation de la synthèse de l'ADN (231). Celle-ci est remplacée par la Cycline A, qui s'associe à Cdk2. Le dimère Cdk2-Cycline A contribue à la phosphorylation en phase S de plusieurs substrats tels que des facteurs de transcription, des protéines impliquées dans la réplication et la réparation de l'ADN, ainsi que des membres de complexes qui vérifient l'intégrité de l'ADN après sa duplication. Vers la fin de la phase S, la cycline A lie aussi Cdk1 et les complexes Cdk2-Cycline A et Cdk1-Cycline A cohabitent, se partageant certains substrats (333).

Le rôle des complexes Cdk1-Cycline A en phase G₂ ne sont pas très clairs (543). Il a toutefois été proposé que ces derniers permettent l'activation de la transcription de la Cycline B, une cycline aux rôles mitotiques qui commence à s'accumuler vers la fin de la phase G₂ (311). La Cycline B néosynthétisée s'assemble avec Cdk1 en fin de G₂, mais ce complexe demeure inactif conséquemment à son inhibition par sa phosphorylation (366).

Ainsi, les dimères Cdk1-Cycline A sont actifs jusqu'à ce que la Cycline A soit détruite via le système ubiquitine-protéasome en prométaphase (110). Ils ont tout de même quelques rôles connus en prophase, soit dans l'initiation de la condensation des chromosomes et dans la destruction de l'enveloppe nucléaire (158, 188). La prophase est également la période où le complexe Cdk1-Cycline B devient actif, en partie grâce à la phosphorylation de Cdk1 et d'autre part via la déphosphorylation de certains de ses résidus inhibant son activité (311). Ceci déclenche de nombreux événements de la mitose puisque cette kinase essentielle cible une multitude de substrats et régule notamment la condensation des chromosomes, la rupture de l'enveloppe nucléaire et l'assemblage du fuseau mitotique (333, 488). Son inactivation est finalement provoquée par la protéolyse ciblée de la cycline B en métaphase, toujours par le système ubiquitine protéasome (91, 184). La cessation de toute activité de la part des Cdk combinée à la déphosphorylation de leurs substrats sont des prérequis essentiels à la progression des cellules dans les étapes finales du cycle de division cellulaire (418, 488). Le maintien de l'inhibition de l'activité des Cdk dans les cellules-filles qui passent en phase G_1 est de plus nécessaire pour l'assemblage de complexes pré-réplicatifs sur les origines de répllication de leur ADN (118). Le cycle d'activation des Cdk, qui conduit à l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire et qui en régit les différentes phases, peut ensuite recommencer en présence de conditions stimulant la prolifération cellulaire. Ce cycle est résumé à la figure 11.

La périodicité de l'activation des Cdk est attribuable à l'expression transitoire de leurs unités régulatrices et de leurs inhibiteurs. Il est suggéré par plusieurs études que ceci relève de deux processus, soit la transcription régulée de ces gènes modulateurs et la dégradation ciblée des protéines pour lesquels ils codent par le système ubiquitine-protéasome. Ainsi, la reconnaissance de substrats par des ubiquitines ligases de type E3 est indispensable à la progression dans le cycle cellulaire. Leur action est nécessaire non seulement pour contrôler l'expression de régulateurs des Cdk, mais également pour coordonner des événements se déroulant en sortie de mitose et en début de phase G_1 alors

que l'activité des Cdk est au plus bas. Deux E3 ubiquitine ligases de type RING-finger, le complexe SKP1-CUL1-protéine F-box (SCF) et le complexe promoteur d'anaphase/cyclosome (APC/C), sont chargées de l'ubiquitination de nombreux régulateurs du cycle cellulaire.

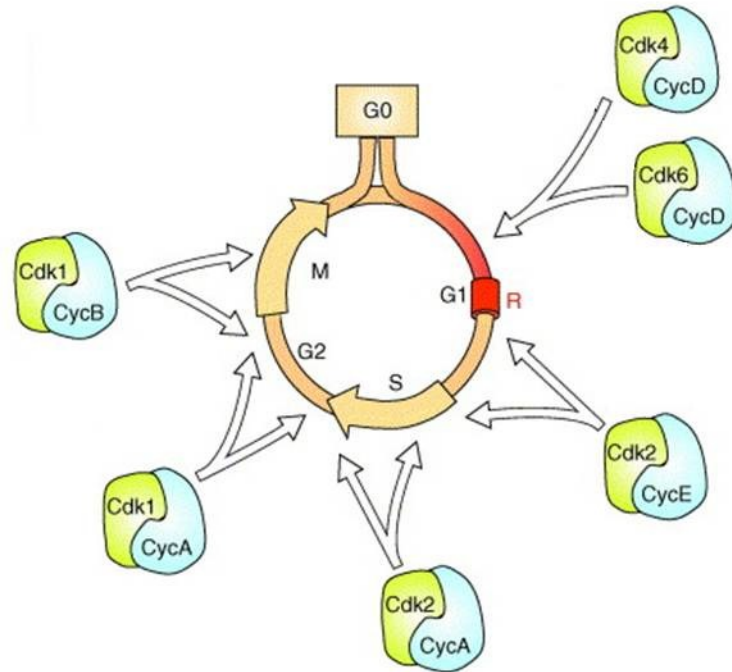


Figure 11: Périodes d'activité des différentes Cdk au cours du cycle cellulaire de mammifères. Les sous-unités régulatrices cyclines sont représentées en bleu pâle et les sous-unités catalytiques Cdk sont en vert. Le point de restriction est montré en rouge. Adapté de (333).

1.4.2.2 Ubiquitination par le complexe SCF

Une des particularités des E3 ubiquitine ligase de la famille RING-finger est leur caractère modulaire. Par exemple, les ubiquitine ligases SCF partagent un cœur catalytique commun composé de trois sous-unités, soit SKP1, CUL1 et RING. Des protéines réceptrices F-box variables s'associent à cet élément central et sont responsables de la

reconnaissance du substrat. Dans presque tous les cas explorés à ce jour, la modification des substrats par phosphorylation est un signal nécessaire à leur reconnaissance par les protéines F-box (402). Puisque le protéome humain compte environ 70 protéines F-box, les ubiquitine ligases SCF sont très versatiles et ciblent potentiellement un grand nombre de substrats.

Trois protéines F-box interviennent spécialement dans le contrôle du cycle cellulaire via des complexes SCF actifs de la fin de la phase G_1 jusqu'au début de la mitose (371). SKP2 est l'une de celle-ci et sa principale cible est $p27^{Kip1}$, un inhibiteur des Cdk. SCF^{SKP2} est donc un complexe promoteur de croissance. SCF^{SKP2} peut également compter parmi ses substrats d'autres inhibiteurs des Cdk, mais aussi les Cyclines A, D et E ainsi que des facteurs de transcription comme E2F et Myc. C'est toutefois son rôle dans la destruction de $p27^{Kip1}$ qui prédomine, conférant par conséquent un potentiel oncogénique à SKP2 (371). Au contraire, la protéine de type F-box FBW7 peut être considérée comme supprimeuse de tumeurs parce que SCF^{FBW7} cible des oncoprotéines telles que la Cycline E et des facteurs de transcription tels que Jun (371). Enfin, une dernière protéine F-box a été reconnue pour son implication dans la régulation de la progression dans le cycle cellulaire, soit β -TRCP. $SCF^{\beta-TRCP}$ est responsable de la destruction de nombreuses protéines, dont des inhibiteurs de CDK1 et des inhibiteurs de l'APC/C. Il a donc un rôle prépondérant dans le contrôle de l'entrée en mitose (371).

1.4.2.3 Ubiquitination par l'APC/C

À l'image des complexes SCF, l'APC/C est composé de plusieurs sous-unités qui forment le cœur de l'enzyme. L'APC/C comprend 12-13 protéines dépendamment des espèces et il n'est fonctionnel qu'en présence d'un cofacteur, soit Cdc20 ou Cdh1. Ces derniers activent l'APC/C, en plus de contribuer à la reconnaissance du substrat (400, 503). À l'opposé des complexes SCF, où seule la protéine réceptrice F-box participe au recrutement du substrat, l'APC/C contacte ses cibles directement et ne dépend pas

strictement de ses co-activateurs pour effectuer cette tâche (347). Chez la levure *S. cerevisiae*, l'APC/C catalyse la formation de chaînes de polyubiquitine à partir de la lysine 48 de l'ubiquitine (430). Chez l'humain, la lysine 11 est préférentiellement utilisée, bien que des chaînes générées à partir des lysines 48 et 63 sont aussi observées (242). Ces variations sont attribuables aux différentes E2 ubiquitine ligases qui peuvent s'associer à l'APC/C (242).

L'APC/C et ses coactivateurs interagissent avec des substrats possédant des éléments de reconnaissance spécifiques, les plus communs étant les boîtes de Dégradation (D box, consensus RXXLXXXN) et les boîtes Lysine/Acide glutamique/Asparagine (KEN box, consensus KEN) (503). À l'origine, la boîte KEN a été identifiée comme un motif ciblé exclusivement par l'APC/C^{Cdh1} (403) quoiqu'il est maintenant évident que l'APC/C^{Cdc20} peut se lier dans certains cas à des protéines arborant des séquences KEN (503). Contrairement à ce qui a été établi pour la reconnaissance de cibles par le complexe SCF, il semble que la phosphorylation de quelques substrats de l'APC/C les protège de l'action de cette ubiquitine ligase. Toutefois, l'étendue de ce phénomène n'est pas déterminée puisque cet effet stabilisateur conféré par la phosphorylation n'a été montré que pour quelques ligands de l'APC/C (216, 400, 428, 503). Enfin, l'activation de l'APC/C ne mène pas à la régulation simultanée de tous ses substrats puisqu'un ordre précis dans leur dégradation est observé (310). Ces différences sont attribuables à des variations cinétiques dans l'ubiquitination des cibles de l'APC/C, certaines protéines étant polyubiquitinées suite à un seul événement d'association avec l'enzyme, alors que d'autres doivent interagir plusieurs fois avec l'enzyme avant que soient assemblées des chaînes d'ubiquitine (422).

L'APC/C est indispensable pour l'accomplissement de plusieurs événements se produisant en phase M. Ses fonctions essentielles consistent en la destruction des cyclines mitotiques et la promotion de la séparation des chromatides sœurs. Il facilite également la sortie de mitose et a des rôles dans les phases G₁ et G₀ (400).

Ainsi, l'APC/C^{Cdc20} initie la dégradation de la Cycline A dès la prométaphase. Par la suite, cette enzyme promeut l'anaphase en ubiquitinant la Cycline B et la Sécurine, d'où le nom de l'APC/C. En effet, la destruction de la Sécurine conduit à l'activation de la protéase séparase. Puisque cette dernière clive les complexes de cohésine qui maintiennent les chromatides sœurs ensemble, la ségrégation des chromosomes vers les pôles opposés du fuseau mitotique peut alors commencer (400).

Dès l'instant où tombe l'activité des Cdk conséquemment à la dégradation de la Cycline B, l'APC/C^{Cdh1} entre en scène. Cette E3 ubiquitine ligase participe à la dégradation d'un large éventail de substrats dont certains sont aussi reconnus par l'APC/C^{Cdc20}, alors que d'autres lui sont exclusifs (400). Cdc20 est d'ailleurs une des premières protéines ciblées à la dégradation par l'APC/C^{Cdh1} (413). Parmi les substrats mitotiques de l'APC/C^{Cdh1}, on retrouve aussi les kinases de la famille Aurora et Polo-like, qui sont impliquées dans plusieurs événements précoces de la mitose tels que l'assemblage du fuseau mitotique et l'attachement des chromosomes à ce fuseau (22, 70, 150, 310, 315, 460). En toute fin de mitose, des composants du fuseau mitotique et des régulateurs de la cytokinèse sont ubiquitinés par l'APC/C^{Cdh1} (407). L'enzyme demeure active jusqu'en fin de phase G₁, où elle participe à l'assemblage des complexes de pré-réplication sur l'ADN en contribuant à la destruction d'inhibiteurs de ce processus (118). Également, l'APC/C^{Cdh1} est important pour le maintien de la phase G₀ puisqu'il empêche l'entrée prématurée des cellules quiescentes dans le cycle de division cellulaire (536). Il prévient aussi le passage trop hâtif des cellules de la phase G₁ vers la phase S en contrôlant entre autres la dégradation de la protéine F-box SKP2 (24, 527). Puisque que SCF^{SKP2} cible des inhibiteurs de Cdk et promeut la prolifération cellulaire, il est clair que l'activité de l'APC/C^{Cdh1} en phase G₁ contribue à maintenir l'activité des Cdk à de bas niveaux et régule conséquemment l'entrée des cellules dans le cycle de division cellulaire (25). Finalement, de nombreux mécanismes permettent d'inactiver l'APC/C^{Cdh1} alors que les cellules s'engagent dans la phase S.

L'APC/C est un régulateur majeur du cycle cellulaire dont l'activité doit être contrôlée pour permettre la coordination de nombreux événements. Il a été observé que l'enzyme est soluble dans le cytoplasme, en plus d'être enrichie sur le fuseau mitotique et sur les centrosomes. Cette distribution subcellulaire est cohérente avec les fonctions mitotiques de l'APC/C et suggère qu'il puisse être activé localement pour cibler des protéines à la dégradation (400). D'ailleurs, de nombreux mécanismes de contrôle du cycle cellulaire visent principalement les coactivateurs Cdc20 et Cdh1, sans lesquels l'APC/C n'est pas fonctionnel.

Les niveaux protéiques de Cdc20 varient durant le cycle cellulaire et son expression débute en phase S par l'activation de sa transcription (146, 413). Cependant, son association avec l'APC/C n'est possible qu'en mitose, lorsque plusieurs sous-unités de l'APC/C sont phosphorylées par les kinases mitotiques Cdk1 et Polo-like1 (400). De plus, il a été suggéré que l'activité de l'APC/C^{Cdc20} puisse être inhibée par la protéine Emi1, un pseudosubstrat de l'APC/C (356). La dégradation d'Emi1 par SCF ^{β -TRCP} en prophase précède de peu l'ubiquitination de la Cycline A par l'APC/C^{Cdc20} (339). La destruction d'Emi1 pourrait donc contribuer à l'activation temporaire de l'APC/C durant la prométaphase, bien que cette protéolyse ne semble pas absolument essentielle à la mise en fonction de l'APC/C (114).

L'APC/C^{Cdc20} est de nouveau inhibé en prométaphase par un système de contrôle, le "Spindle Assembly Checkpoint" (SAC) (368). Un des effecteurs potentiel de ce point de contrôle est un complexe nommé "Mitotic checkpoint complex" (MCC), qui est composé des protéines MAD2, BubR1, Bub3 et Cdc20 (487). L'inclusion de Cdc20 dans le complexe a pour effet de bloquer l'activation de l'APC/C, ce qui va mettre un frein à la progression des cellules dans la mitose. Le mécanisme est fonctionnel jusqu'à ce que tous les chromosomes soient attachés au fuseau mitotique. Ceci empêche les cellules d'entrer prématurément en anaphase, ce qui aurait des conséquences catastrophiques puisque les cellules filles issues de la division obtiendraient un nombre inapproprié de chromosomes (368). L'inactivation du SAC survient uniquement lorsque tous les chromosomes sont

correctement associés au fuseau mitotique. Cet événement permet à Cdc20 d'accomplir ses fonctions essentielles en anaphase, avant qu'il ne soit dégradé par l'APC/C^{Cdh1} (368, 413). Ainsi, de nombreux mécanismes participent au contrôle de Cdc20, en restreignant son activité qui ne se manifeste que sur une courte période en mitose.

La régulation de Cdh1 est aussi très élaborée, bien que des processus différents contrôlent Cdh1 et Cdc20. Par exemple, les niveaux du messager de Cdh1 sont constants tout au long du cycle cellulaire, contrairement à ceux de l'ARNm de Cdc20 (413). Également, l'activité des Cdk régule l'association entre Cdh1 et l'APC/C, mais d'une toute autre façon. Alors que la phosphorylation de l'APC/C favorise son association à Cdc20, la phosphorylation de Cdh1 inhibe son interaction avec l'APC/C. D'ailleurs, l'atténuation de l'activité des Cdk engendrée par la destruction de la Cycline B via l'APC/C^{Cdc20} et la déphosphorylation de Cdh1 sont des événements qui marquent une transition dans l'activation de l'APC/C. En effet, ceci rend Cdh1 fonctionnel, qui peut donc s'associer à l'APC/C pour cibler Cdc20 à la dégradation par le protéasome (400).

L'APC/C^{Cdh1} accomplit ses différentes tâches jusqu'en fin de la phase G₁, où plusieurs mécanismes participent à son inactivation. Entre autres, l'APC/C^{Cdh1} contribue au déclin de sa propre activité en visant l'E2 ubiquitine ligase qui lui est associée, soit UBCH10. Ce changement de cap mène à l'expression de la Cycline A qui interagit avec Cdk2 et phosphoryle Cdh1 pour l'inhiber (421). Le passage du point de restriction entraîne aussi l'expression des cibles d'E2F, dont l'inhibiteur de l'APC/C Emi1 fait partie. Ce dernier contribue donc à limiter l'activité de l'APC/C^{Cdh1} en interphase (114, 220). Enfin, une réduction des niveaux protéiques de Cdh1 est observée dans les phases G₁ et S (282, 413). Il est suggéré que cette diminution soit attribuable à la protéolyse de Cdh1, qui serait ciblé au protéasome par le complexe SCF et par l'APC/C^{Cdh1} (37, 314). L'expression des cyclines mitotiques résultant de l'inactivation globale de l'APC/C favorise donc la progression des cellules dans le cycle de division cellulaire.

L'analyse du fonctionnement des E3 ubiquitine ligases qui contrôlent la progression dans le cycle cellulaire fait ressortir tous les liens qui unissent l'APC/C et les complexes SCF. L'APC/C peut réguler l'activité de SCF en ciblant à la dégradation une de ses protéines réceptrices, soit SKP2. SCF module pour sa part les fonctions de l'APC/C en ubiquitinant son coactivateur Cdh1 et son inhibiteur Emi1. Les fenêtres d'activité de ces E3 ubiquitine ligases ainsi que certaines de leurs cibles sont illustrées à la figure 12.

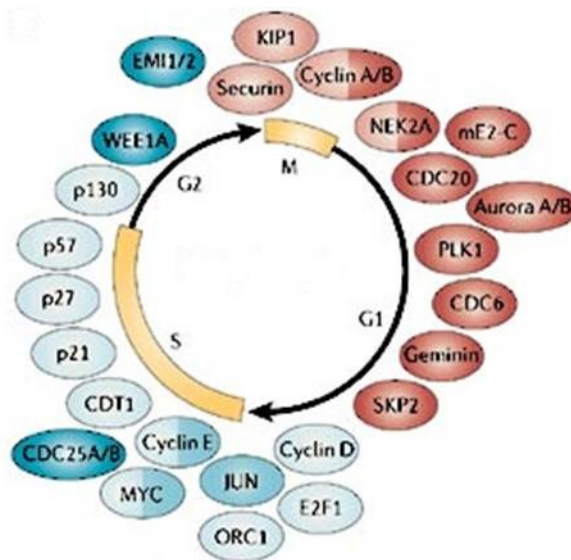


Figure 12: Périodes d'activité des E3 ubiquitines ligases SCF et APC/C au cours du cycle cellulaire. Les principales cibles de ces ubiquitines ligases ainsi que les phases du cycle cellulaires durant lesquelles elles sont dégradées sont représentées. Les substrats de l'APC/C sont indiqués en teintes de rouge, soit rouge pâle pour l'APC/C^{Cdc20} et rouge foncé pour l'APC/C^{Cdh1}. Les substrats du complexe SCF sont présentés en teintes de bleu, soit bleu pâle pour SCF^{SKP2}, bleu intermédiaire pour SCF^{FBW7} et bleu foncé pour SCF^{β-TRCP}. Adapté de (371).

Les multiples événements de phosphorylation et de dégradation ciblée assurent la coordination des processus menant à la duplication du matériel génétique d'une cellule et à sa ségrégation équitable dans des cellules-filles. La progression unidirectionnelle de la

cellule dans les phases du cycle cellulaire est possible grâce à des réseaux complexes de contrôle dans lesquels les Cdk, les complexes SCF, l'APC/C ainsi que leurs différents activateurs et inhibiteurs jouent des rôles primordiaux (195, 318, 411, 425). Plusieurs études ont aussi mis en lumière le rôle des facteurs de transcription dans le cycle cellulaire. Ils soutiennent la division par l'activation de la transcription de gènes requis pour compléter les phases successives du cycle cellulaire. Cependant, il n'est pas très clair si la régulation post-transcriptionnelle est aussi impliquée dans la prolifération contrôlée des cellules puisque le sujet a été très peu approfondi. Quelques indices nous laissent toutefois entrevoir la possibilité que la régulation post-transcriptionnelle puisse participer au contrôle fin de l'expression de régulateurs du cycle cellulaire et de gènes exprimés transitoirement au cours du cycle.

1.4.3 Régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique et cycle cellulaire

Au cours de la réplication de l'ADN, de nombreuses histones doivent être produites pour s'associer aux chromosomes nouvellement synthétisés. Par conséquent, la transcription des histones est fortement activée tout juste avant l'entrée des cellules en phase S (343). Chez les métazoaires, les messagers produits par la transcription des gènes qui codent pour les histones sont particuliers puisqu'ils sont les seuls transcrits cellulaires à ne pas être polyadénylés (342). Ces ARNm se terminent plutôt par une structure en tige-boucle spécifiquement reconnue par la protéine SLBP (28, 524). Cette dernière influence le destin des messagers des histones en les rendant compétents à l'export nucléaire et en favorisant leur traduction durant la synthèse d'ADN. Elle recrute également la machinerie de dégradation d'ARN en fin de phase S, alors que la production d'histones doit cesser (343). D'ailleurs, la protéine SLBP est phosphorylée par le complexe Cdk1-Cycline A alors que s'achève la synthèse de l'ADN. Cette modification en fait un substrat du système ubiquitine-protéasome et sa dégradation contribue à interrompre la néosynthèse des histones (279). Ainsi, la régulation post-transcriptionnelle contribue de façon significative à l'expression

transitoire des histones au moment où ils sont requis en grande quantité, alors que les cellules créent une réplique de leur génome.

Quelques évidences indiquent que des effecteurs majeurs du cycle cellulaire sont ciblés par des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle. Il a été observé que les messagers codant pour les différentes cyclines ne sont stables que sur une courte période de temps, soit lorsque ces dernières sont nécessaires pour assurer la progression dans le cycle cellulaire. Ainsi, des déterminants de stabilité ont été identifiés dans le 3'UTR des transcrits des cyclines. Il en est de même pour des ARNm codant pour des inhibiteurs de Cdk et pour d'autres régulateurs centraux du cycle cellulaire (17). Également, il a été montré que la traduction de certains de ces messagers peut être modulée car ils possèdent des éléments particuliers dans leur portion 5'UTR, notamment des IRES (17).

Des observations similaires ont été rapportées pour des transcrits de proto-oncogènes. L'exemple du messenger codant pour le facteur de transcription c-Fos a été décrit précédemment (section 1.1.5.2). La stabilité de *c-fos* est contrôlée par au moins deux mécanismes, le premier impliquant la reconnaissance d'un déterminant d'instabilité présent dans sa région codante, l'autre étant dirigé par un ARE retrouvé dans son 3'UTR (461). Les facteurs de transcription c-Jun et c-Myc sont également des proto-oncogènes dont l'expression est contrôlée de façon post-transcriptionnelle. L'instabilité de leurs messagers est conférée par des ARE. De plus, *c-myc* possède un déterminant d'instabilité dans sa région codante et un IRES dans son 5'UTR (17).

La modification de l'expression de proto-oncogènes et de régulateurs du cycle cellulaire peut créer de l'instabilité génomique et favoriser l'accumulation de mutations. Ceci peut ultimement mener à la prolifération non-contrôlée des cellules, une caractéristique du cancer. En considérant que l'abondance des effecteurs centraux du cycle cellulaire puisse être influencée par les modulateurs de la régulation post-transcriptionnelle, il n'est pas surprenant d'observer des irrégularités au niveau de l'expression de ces derniers lorsque la comparaison entre des cellules saines et des cellules transformées est effectuée.

Par exemple, les niveaux de la plupart des miARN sont diminués dans les cellules tumorales (320). Dans ce sens, il a été proposé que certains miARN jouent des rôles de suppresseurs de tumeurs en ciblant des proto-oncogènes tels que *c-myc* et *RAS* (455). Au contraire, quelques miRNA sont surexprimés dans des cas de cancer, suggérant qu'ils sont des proto-oncogènes. D'ailleurs, il a été montré que l'expression ectopique du miR155 chez des souris pouvait provoquer la leucémie (100). Enfin, l'altération de l'expression de quelques protéines liant l'ARN a été reliée au cancer (17). Le potentiel oncogénique du facteur d'initiation de la traduction eIF4E a déjà été abordé (section 1.2.3) (363). Il est suggéré que les niveaux excessifs d'eIF4E observé dans certains types de cancer favorisent l'expression de gènes directement impliqués dans la prolifération cellulaire, tels que la Cycline D1 et c-Myc (103, 104). De plus, il est intéressant de noter dans des tumeurs caractérisées par une surexpression d'eIF4E, il y a aussi une augmentation des niveaux de la protéine HuR. HuR lie et stabilise des messagers possédant des ARE (section 1.1.5.2), comme celui d'eIF4E et de la Cycline D1 (286, 509). Ceci suggère donc qu'eIF4E et HuR collaborent dans un réseau de régulation post-transcriptionnel qui module la prolifération cellulaire (509). Un résumé de ces différents exemples de régulation post-transcriptionnelle de gènes importants pour la progression dans le cycle de division cellulaire ou pour la prolifération cellulaire est présenté dans le tableau I.

Puisque tous les niveaux de régulation, soit transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel sont mis à contribution pour augmenter la précision de l'expression génique dans diverses situations, il est possible de supposer que la régulation post-transcriptionnelle joue des rôles dans le cycle de division cellulaire et dans la croissance des cellules. La présence d'éléments régulateurs dans les messagers codant pour des protéines nécessaires à la prolifération cellulaire et le dérèglement de l'expression des miARN ou des protéines liant l'ARN dans certains cancers sont des observations qui soutiennent cette hypothèse. Cependant, les fonctions précises des modulateurs post-transcriptionnels dans le contrôle du cycle de division cellulaire demeurent plutôt méconnues à ce jour.

Tableau I : Exemples de régulation post-transcriptionnelle de gènes jouant des rôles dans la progression dans le cycle de division cellulaire et dans la prolifération cellulaire.

Gène(s)	Éléments d'ARN et localisation	Protéine liant l'ARN impliquée	Type de régulation	Références
Histones H2A, H2B, H3 et H4	Tige boucle, 3'UTR	SLBP	Traduction et déstabilisation	(342, 524)
Cycline D ₁	Élément de sensibilité à eIF4E, 3'UTR	LRPPRC	Export nucléaire	(104, 508)
Cycline D ₁	ARE, 3'UTR	AUF1	Déstabilisation	(309)
Cycline D ₃	Élément riche en pyrimidine, 3'UTR	?	Déstabilisation	(164)
Cyclines A et B	ARE, 3'UTR	HuR	Stabilisation	(521)
p21	ARE, 3'UTR	HuR et poly(C)-BP	Stabilisation	(179, 522)
ADN méthyltransferase 1	ARE, 3'UTR	Auf1	Déstabilisation	(510)
C-fos	"Coding region determinant"	UNR	Déstabilisation	(193, 511)
C-jun	ARE, 3'UTR	CUGBP	Déstabilisation et répression de la traduction	(387)
C-myc	IRES, 5'UTR	hnRNPC	Traduction	(266)
C-myc	"Coding region determinant"	CDRBP	Stabilisation et répression de la traduction	(306)

1.5 La protéine Staufen, un régulateur post-transcriptionnel de l'expression génique

L'identification des régulateurs post-transcriptionnels de l'expression génique est un domaine de recherche qui suscite un grand intérêt, compte tenu du rôle potentiel de ces derniers dans le contrôle de nombreux processus physiologiques. Dans ce sens, plusieurs études ont mené à la découverte de protéines liant l'ARN et à la définition de motifs de liaison à l'ARN. Par exemple, la caractérisation de la protéine Staufen a permis la description du domaine consensus de liaison à l'ARN double-brin ("double-stranded RNA binding domain" ou dsRBD) (477). Staufen fait donc partie de la famille des protéines à dsRBD, qui comprend une panoplie de protéines impliquées dans diverses voies telles que la défense antivirale, l'ARN interférence et le développement (505). Staufen est pour sa part impliqué dans plusieurs aspects de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique. Cette protéine a tout d'abord été étudiée chez la drosophile, où elle a été découverte grâce à un criblage génétique qui avait pour objectif d'identifier des gènes maternels importants pour le développement de la mouche. Ainsi, l'absence de Staufen est sans conséquence pour la mère, mais se traduit par de nombreux défauts embryonnaires chez sa progéniture, qui meurt avant d'atteindre le stade adulte (446, 447).

1.5.1 Rôles de Staufen chez la drosophile

Des recherches subséquentes ont mené à une meilleure compréhension des fonctions de Staufen durant l'embryogenèse de la drosophile. Staufen joue un rôle de premier plan dans l'établissement de l'axe antéro-postérieur et dans la détermination de la lignée germinale. En effet, il est essentiel à la localisation des ARNm maternels *osk* et *bcd* à différentes étapes de l'ovogenèse (section 1.1.3.2), en plus d'être nécessaire à la dérépression de la traduction d'*osk* lorsque ce dernier arrive à destination (355, 476, 478). Ainsi, Staufen co-localise avec le messager d'*osk* durant les événements finaux de son

transport au pôle postérieur (476). De plus, la suppression de l'activité de liaison à l'ARN de l'un des dsRBD de Staufen par sa mutation abolit la localisation des ARNm *osk* et *bcd*, ce qui suggère fortement que Staufen soit directement impliqué dans le transport de ces transcrits en les liant spécifiquement (420). D'ailleurs, Staufen s'associe au 3'UTR de *bcd* et participe aux dernières étapes de sa localisation, probablement en contribuant au transport microtubule-dépendant du transcrit et à son ancrage une fois qu'il parvient au pôle antérieur de l'oeuf (147, 529).

Plus tard durant l'embryogénèse, Staufen est fortement exprimé dans le système nerveux en développement (476). Il contribue alors à la détermination du destin de cellules issues de la division des neuroblastes par la ségrégation asymétrique de l'ARNm *pros* (section 1.1.3.2), potentiellement en liant le 3'UTR de ce messenger (61, 307). La cellule-fille qui acquiert l'ARNm *pros* et la protéine Pros devient ensuite une cellule-mère ganglionnaire. Ce processus dépend de l'interaction entre Staufen et la protéine Miranda, ainsi que du cytosquelette d'actine (155, 346, 445, 456). Ces différentes observations montrent que Staufen est impliqué dans la régulation post-transcriptionnelle chez la drosophile par sa contribution à la localisation et à la traduction d'ARNm, des fonctions qui dépendent de sa capacité à lier l'ARN.

1.5.2 Les protéines Staufen chez les mammifères

Afin d'améliorer les connaissances sur le transport des ARNm chez les mammifères, des recherches ont été entreprises pour identifier des orthologues de la protéine Staufen de drosophile. Ces efforts ont conduit à la découverte de deux gènes qui possèdent un grand niveau d'homologie avec la protéine de drosophile, soit Staufen1 (Stau1) et Staufen2 (Stau2), (64, 112). Cette duplication du gène est observée chez tous les mammifères ainsi que chez d'autres vertébrés, tels que le xénope (9) et le poisson zèbre (419).

1.5.2.1 Comparaison des protéines Staufen des mammifères et de la drosophile

L'analyse de la séquence protéique de Staufen de drosophile a permis d'établir que ce dernier possède 5 dsRBD consensus (477). Du nombre, seuls les dsRBD 1,3 et 4 ont la capacité de lier l'ARN *in vitro*, le dsRBD 3 étant celui qui effectue cette tâche avec le plus d'efficacité (355, 477). La comparaison de Staufen de drosophile avec ses homologues de mammifères indique que ceux-ci ont conservé 4 des 5 dsRBD présents originellement. En effet, la protéine Stau1 possède des dsRBD similaires aux dsRBD 2 à 5 de Staufen, alors que Stau2 a plutôt hérité des dsRBD qui correspondent aux dsRBD 1 à 4 de la protéine de drosophile (130, 340, 495, 531). De plus, une région semblable au domaine de liaison à la tubuline de MAP1B, une protéine associée aux microtubules, est observée dans la plupart des séquences mammifères alors qu'elle est absente dans le gène de la drosophile. Ce domaine potentiel de liaison à la tubuline ("Tubulin binding domain" ou TBD) se trouve entre les dsRBD4 et 5 de Stau1, ainsi qu'en aval du dsRBD4 de Stau2, ce qui montre que la position relative des domaines des protéines Stau de mammifères est conservée (130, 531).

1.5.2.2 Description des différents isoformes de Stau1 et Stau2

Des événements d'épissage alternatif génèrent plusieurs transcrits qui codent pour les protéines Staufen de mammifères et contribuent à l'expression de divers isoformes. Par exemple, 5 messagers distincts codant pour la protéine Stau1 humaine ont été décrits. Trois d'entre eux ne diffèrent que dans leur portion 5'UTR. Ils mènent tous à la synthèse d'une protéine identique ayant une masse moléculaire prédite de 55 kiloDaltons (kDa), reconnue sous le nom de Stau1⁵⁵ (531). Un autre transcrit est caractérisé par l'inclusion d'un exon possédant un codon d'initiation fonctionnel. Ce codon de départ se retrouve en amont de celui utilisé pour la synthèse de Stau1⁵⁵ et ceci entraîne donc la production de Stau1⁶³, une protéine de 63 kDa qui ne diffère de Stau1⁵⁵ qu'au niveau d'une extension de son extrémité N-terminale (531). Enfin, un dernier ARNm qui code pour Stau1 est le fruit d'un épissage alternatif et permet l'expression d'une protéine pratiquement identique à Stau1⁵⁵, soit Stau1¹.

Cet isoforme a la particularité de posséder une insertion de 6 acides aminés dans son dsRBD3 (60, 142). Des isoformes similaires ont d'ailleurs été décrits chez la souris (129) et le rat (361).

La situation est plutôt semblable pour Stau2, alors que 4 isoformes sont produits suite à l'expression de messagers issus d'un épissage alternatif. Les protéines observées diffèrent légèrement au niveau de leurs extrémités N et C-terminales et ont des masses moléculaires respectives prédites de 52, 56, 59 et 62 kDa. Ils sont conséquemment nommés Stau2⁵², Stau2⁵⁶, Stau2⁵⁹ et Stau2⁶² (130, 360). Cette diversification au niveau de l'expression des protéines Staufen chez les mammifères laisse présager que les isoformes produits aient des propriétés distinctes, ce qui permet potentiellement une spécialisation des différentes protéines Staufen. Une récapitulation des divers isoformes décrits et leur comparaison avec la protéine Staufen de drosophile est représentée schématiquement à la figure 13.

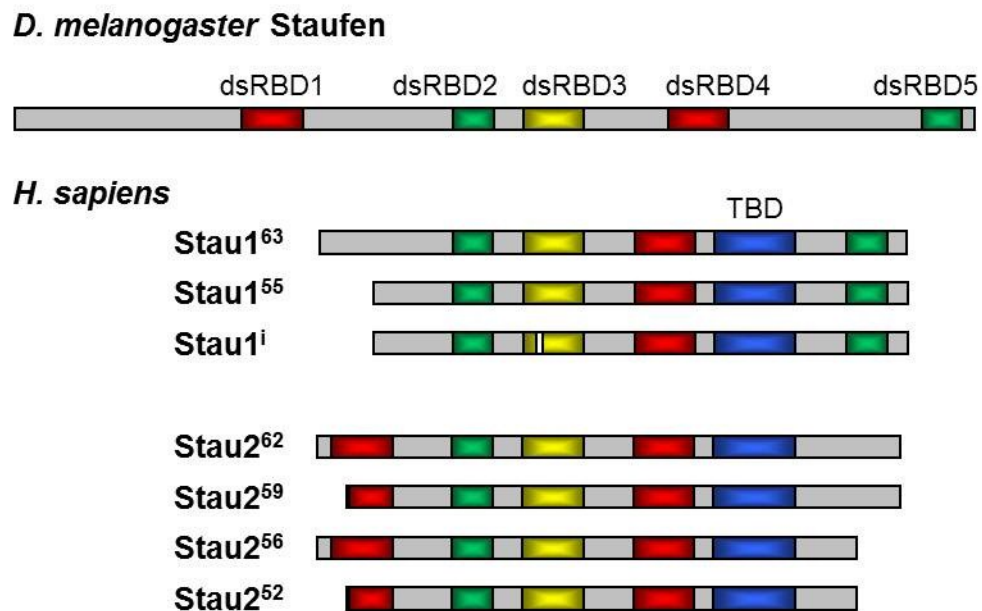


Figure 13 : Représentation schématique de l'organisation des domaines fonctionnels des différents isoformes des protéines Stau humaines en relation avec la protéine Staufen de

drosophile. Les dsRBDs liant fortement l'ARN double-brin *in vitro* sont en jaune, les dsRBDs liant faiblement l'ARN double-brin *in vitro* sont en rouge et les dsRBDs incomplets ne présentant aucune activité de liaison à l'ARN double-brin *in vitro* sont en vert. Les domaines de liaison à la tubuline sont en bleu. La position approximative de l'insertion de 6 acides aminés retrouvée dans le dsRBD3 de l'isoforme Stau1¹ est indiquée par un trait blanc.

1.5.3 Le dsRBD, un domaine essentiel aux fonctions de Staufen

Tel que rapporté auparavant, l'étude la protéine Staufen a mené à la description du domaine consensus de liaison à l'ARN double brin, le dsRBD. C'est en comparant la séquence de Staufen à celle de la protéine Xlrpba, alors reconnue pour lier l'ARN double brin, qu'une région conservée d'un peu moins de 70 acides aminés a été identifiée. Il s'est avéré que ce motif ait effectivement la capacité de lier l'ARN double brin et qu'il soit retrouvé dans plusieurs autres protéines liant également l'ARN double brin (477). Depuis sa description, le dsRBD a été retrouvé dans plus d'une centaine de séquences protéiques (148).

1.5.3.1 Caractéristiques des dsRBD

Des études de résonance magnétique nucléaire sur le dsRBD3 de Staufen et le dsRBD de la RNase III ont permis d'élucider la structure du dsRBD, qui adopte un repliement α - β - β - β - α (67, 262). Subséquemment, l'analyse de structures d'un dsRBD en complexe avec une molécule d'ARN double-brin obtenues par cristallographie et par résonance magnétique nucléaire a montré que le dsRBD contacte principalement le squelette ribose-phosphate de l'ARN, du côté des sillons mineurs et majeurs de l'hélice d'ARN (42, 420, 438, 538). Cette observation peut sans doute expliquer pourquoi le dsRBD lie n'importe quel ARN double-brin *in vitro* mais ne révèle pas comment les protéines à dsRBD reconnaissent des substrats spécifiques *in vivo* (420). La structure du dsRBD 3 de

Staufen de drosophile, en complexe avec une molécule d'ARN double brin, est représentée à la figure 14.

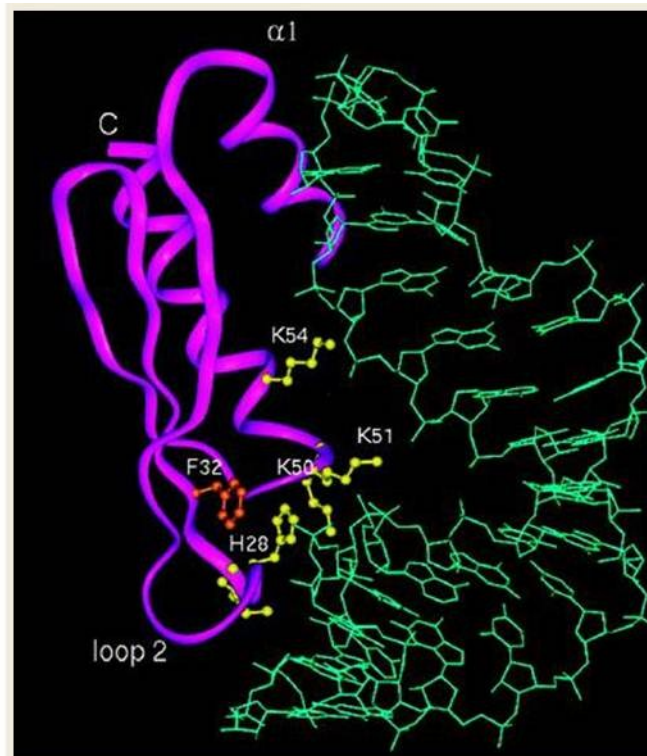


Figure 14 : Structure du dsRBD3 de Staufen de drosophile en complexe avec une tige-boucle d'ARN déterminée par RMN à haute résolution. Le domaine est représenté en mauve et la molécule d'ARN est en vert. La boucle 2 (loop 2), qui se trouve entre les deux premiers feuillets β du domaine, interagit avec le sillon mineur de l'hélice d'ARN. La boucle 4, qui se situe entre le troisième feuillet β et la deuxième hélice α du domaine s'associe avec le squelette phosphodiester du sillon majeur. La première hélice α ($\alpha 1$) du domaine établit des contacts avec la boucle simple brin de la molécule d'ARN. Les acides aminés essentiels à l'activité de liaison d'ARN du dsRBD sont présentés plus en détails sur l'image (en jaune et rouge). Adapté de (420)

Pour répondre à ce questionnement, plusieurs hypothèses ont été émises. Par exemple, il a été proposé que les différents dsRBD reconnaissent des structures spécifiques

plutôt que des séquences prédéfinies (73, 124, 148, 505). Il a également été suggéré que la modularité des protéines liant l'ARN double brin puisse expliquer leur spécificité. En effet, à l'exception des protéines de la famille de la RNase III, la plupart des protéines à dsRBD possèdent plus d'une copie de ce motif (73, 148). Dans cet ordre d'idées, certaines protéines possèdent aussi d'autres types de domaines de reconnaissance d'ARN comme l'ARN hélicase A ("RNA helicase A" ou RHA), qui contient deux dsRBD en plus d'un domaine de type RGG et d'une région riche en proline importante pour la liaison spécifique d'un ARN viral (225, 551). Enfin, la possibilité que les protéines à dsRBD puissent recruter d'autres protéines liant l'ARN pour améliorer leur sélectivité a été évoquée (440, 505).

Les dsRBD ne sont pas tous égaux dans leur aptitude à lier l'ARN puisque certains montrent une plus grande affinité pour l'ARN que d'autres. Il a été proposé que les dsRBD ayant une capacité réduite à lier l'ARN double brin puissent collaborer avec d'autres dsRBD pour stabiliser leur interaction avec l'ARN, ou contribuer à la spécificité de liaison des protéines à un substrat d'ARN (73, 148, 440). De plus, une variante du dsRBD a été décrite, soit un dsRBD tronqué où seule la portion C-terminale du domaine semble avoir été conservée (477). Ils sont observés dans plusieurs protéines possédant d'autres dsRBD fonctionnels et il a été proposé qu'il s'agisse de plateformes d'interactions protéine-protéine (440, 505). D'ailleurs, il semble que certains de ces motifs incomplets servent d'échafaudage pour l'homodimérisation ou l'hétérodimérisation de protéines à dsRBD, tout comme les dsRBD complets (73, 124, 440).

1.5.3.2 Activité des dsRBD de Stau1

À ce jour, Staufen est la protéine dans laquelle on a identifié le plus grand nombre de copies du dsRBD, soit de 4 à 5 dépendamment des espèces. Par exemple, Stau1 chez les mammifères contient 4 dsRBD et leur apport respectif à la fonction de la protéine est variable.

Tout comme chez la mouche, le dsRBD3 de Stau1 (qui correspond au dsRBD3 de la protéine Staufen de drosophile) semble être le principal domaine responsable de la liaison à l'ARN double brin, tel que montré par des expériences de liaison d'ARN *in vitro* (131, 322, 341, 355, 531). Le dsRBD 4 a aussi la propriété de lier l'ARN *in vitro*, quoique sa contribution semble beaucoup moins importante que celle du dsRBD3 (322, 531). D'ailleurs, la mutation ponctuelle du dsRBD3 afin de le rendre non-fonctionnel pour la liaison à l'ARN est suffisante pour empêcher Staufen d'accomplir ses fonctions reliées à la reconnaissance d'ARNm *in vivo*, autant chez la drosophile que chez les mammifères (131, 420). Ceci suggère donc que le dsRBD3 soit le déterminant principal de la liaison à l'ARN et que sa fonction soit conservée à travers les espèces. Il est de plus intéressant de noter que l'insertion de 6 acides aminés dans le dsRBD3 de l'isoforme Stauⁱ abolit sa capacité à lier l'ARN (129, 361), ce qui n'est pas surprenant compte tenu qu'il est prédit par modélisation que cette insertion induise des changements conformationnels majeurs dans le domaine (129). Dans la mesure où les isoformes Stau1⁵⁵ et Stauⁱ se retrouvent dans les mêmes complexes et que la surexpression de Stauⁱ diminue la quantité d'ARN associée à Stau1⁵⁵, il a été proposé que Stauⁱ régule la quantité d'ARN présent dans les complexes dont Stau1 fait partie.

Enfin, Stau1 possède 2 dsRBD incomplets, qui n'affichent que la portion C-terminale du consensus établi pour ce domaine. Il s'agit des dsRBD correspondants au dsRBD2 et 5 de la protéine Staufen de drosophile et ils ne montrent aucune activité de liaison à l'ARN *in vitro* (531). Leur contribution aux fonctions de la protéine n'est pas très claire, bien qu'il ait été suggéré que le dsRBD2 régule la multimérisation de pr55^{Gag}, le précurseur des protéines structurales du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) (80).

1.5.3.3 Liaison d'ARN par Stau1

Stau1 est sans contredit une protéine qui lie l'ARN. Même si les règles qui déterminent la reconnaissance spécifique d'ARN par les protéines qui arborent des dsRBD ne soient pas bien définies, quelques évidences suggèrent que Stau1 lie sélectivement certains ARNm.

Une première étude dont l'un des objectifs était d'identifier des messagers associés à Stau1⁵⁵ *in vivo* a mené à l'obtention d'une liste comprenant un peu plus d'une vingtaine de transcrits (268). La caractérisation approfondie de l'un d'entre eux, soit le messenger codant pour le facteur d'ADP-ribosylation 1 (Arf1) a permis de définir un site de liaison de Stau1 (SBS, pour "Staufen binding site") (268). La modélisation de cet élément de 230 nucléotides retrouvé dans le 3'UTR de l'ARNm *arf1* révèle que la séquence peut potentiellement adopter une structure secondaire complexe (268, 269). L'une des ses particularités est la présence d'une tige continue d'ARN double-brin de 19 paires de bases, conservée chez l'humain, la souris et le rat (269). Ainsi, des mutations qui perturbent la formation de la tige diminuent considérablement l'association de Stau1 au messenger. De plus, l'introduction de mutations complémentaires de chaque côté de la tige, qui ont pour effet de conserver l'intégrité de la structure mais de changer l'identité des nucléotides, ne restaure pas complètement l'association de Stau1 au SBS. Ceci suggère qu'il puisse y avoir une certaine sélectivité de séquence dans l'événement reconnaissance d'ARN par Stau1 *in vivo* ou encore que la séquence contribue à la formation d'une structure spécifique liée par Stau1 (269).

Cette tige est également coiffée par une structure complexe de 100 nucléotides qui semble importante pour la reconnaissance de l'ARN par Stau1 puisque sa délétion entraîne une perte de liaison de l'élément par la protéine de 50%. Enfin, la prédiction des structures secondaires du site de liaison de Stau1 dans les autres messagers qui y sont associés n'a pas révélé la présence de tiges double-brin aussi longues. Toutes ces observations illustrent la

difficulté de définir les déterminants d'ARN nécessaires à la reconnaissance d'un transcrit par Stau1 (269).

Une étude subséquente a permis de dresser la liste d'un plus grand nombre de messagers retrouvés dans les mêmes complexes que Stau1. Ainsi, cette protéine s'associe à près de 7% du transcriptome de la lignée cellulaire humaine HEK293T, ce qui représente pas moins de 1384 messagers (157). Ceci rend très difficile l'identification d'un élément SBS commun, sans compter que cette expérience n'indique pas si Stau1 lie directement ces transcrits. Ces travaux se sont aussi intéressés à l'identification des transcrits associés à Stau2, qui furent comparés à ceux obtenus pour Stau1. Malgré le fait que les dsRBD3 des deux protéines sont identiques à 77%, une grande partie des populations d'ARN auxquelles ils s'associent sont distinctes. Par exemple, environ 60% des transcrits dans les complexes Stau1 ne se retrouvent pas avec Stau2 (157). Ceci n'est pas surprenant car il a été montré que les deux protéines n'interagissent pas ensemble et définissent des complexes ribonucléoprotéiques différents (130, 501). Tout cela montre que même s'il y a une certaine redondance entre ces protéines similaires au niveau de leur domaine principal de liaison à l'ARN, il y a tout de même des divergences qui illustrent le concept de sélectivité de chacun des dsRBD.

L'analyse des catégories fonctionnelles auxquelles appartiennent les protéines codées par ces messagers est très intéressante. Elle indique que les ARNm associés à Stau1 codent principalement pour des protéines impliquées dans le métabolisme cellulaire, le transport et la localisation, la transcription, la régulation de processus cellulaires et l'activité catalytique de la cellule. Il est donc plausible que Stau1 puisse contrôler des régulons d'ARN qui regroupent des messagers de gènes fonctionnellement reliés (157).

1.5.4 Localisation subcellulaire de Stau1

Pour tenter de mieux évaluer les rôles biologiques potentiels de Stau1, il est pertinent de s'attarder à son profil d'expression et à sa distribution subcellulaire. Ainsi,

plusieurs études montrent le caractère ubiquiste de Stau1, compte tenu que son expression a été détectée dans la plupart des tissus testés ainsi que dans diverses lignées cellulaires de mammifères (129, 340, 531). Stau1 est observé majoritairement dans le cytoplasme, bien qu'une très petite proportion de la protéine puisse être détectée dans le nucléole suite à sa surexpression (298, 340). Ceci laisse croire que Stau1 a la capacité de transiter par le noyau.

1.5.4.1 Transit nucléocytoplasmique de Stau1

Stau1 possède un signal de localisation nucléaire positionné à l'extrémité C-terminale de son dsRBD3 et des essais d'import nucléaire chez la levure ont montré qu'il est fonctionnel (341). Toutefois, la protéine n'est pratiquement pas observée dans le noyau, ce qui suggère que Stau1 ne passe que transitoirement par le noyau et/ou qu'il soit retenu la plupart du temps dans le cytoplasme. La caractérisation des déterminants qui contrôlent la localisation de Stau1 a conduit à l'observation que la mutation ponctuelle de son dsRBD3, qui affecte potentiellement sa structure, permet d'apercevoir Stau1 dans le noyau et dans le nucléole. Ainsi, l'import nucléaire de Stau1, son export et/ou sa rétention cytoplasmique sont régis par le même domaine, ce qui suggère que ces événements puissent être modulés (341). D'autres observations supportent l'hypothèse que Stau1 puisse transiter par le noyau. Par exemple, des études visant à identifier les partenaires protéiques de Stau1 par spectrométrie de masse suite à sa purification ont révélé que ce dernier est retrouvé en association avec certaines protéines connues pour être majoritairement nucléaires, telles que RHA et la nucléoline (54, 518). Également, Stau1 s'associe au composant d'ARN de la télomérase, soit l'enzyme responsable de la maintenance des télomères aux extrémités des chromosomes (18, 298). La fonction de cette interaction reste nébuleuse, mais l'hypothèse que Stau1 puisse participer à la formation du complexe enzymatique a été émise (298). Aussi, la présence nucléaire de Stau1 laisse supposer qu'il pourrait être impliqué dans l'assemblage de complexes ribonucléoprotéiques au sein de cette organelle (341).

1.5.4.2 Association de Stau1 aux membranes et au cytosquelette

La grande majorité de Stau1 se retrouvant dans le cytoplasme a une distribution subcellulaire bien spécifique. Plusieurs travaux dont le but était de comprendre le rôle de Stau1 dans le système nerveux ont montré que la protéine est située dans le corps cellulaire et les dendrites des neurones, en étant exclue des axones (130, 264, 361). Autant dans les neurones que dans les fibroblastes, Stau1 est abondamment retrouvé au niveau périnucléaire et colocalise de façon importante avec des composants du RER. Ceci suggère une association entre la protéine et ce compartiment cellulaire (264, 340, 381, 531). Une évidence biochimique soutient cette observation puisqu'une petite quantité de Stau1 co-sédimente avec les membranes lors d'essais de fractionnement cellulaire (79).

Également, des expériences de microscopie dans les neurones ont montré un enrichissement de Stau1 sur le réseau de microtubules (264, 361). Il a aussi été proposé qu'il y ait une association entre Stau1 et le cytosquelette dans les fibroblastes (129, 130). D'ailleurs, de nombreux composants du cytosquelette copurifient avec Stau1 lorsque les complexes ribonucléoprotéiques dans lesquels il est présent sont isolés. On retrouve entre autres les protéines de base qui forment le cytosquelette, soit l'actine, la tubuline et l'interneuxine, mais aussi des protéines qui y sont associées comme tau (54, 518). On remarque aussi la présence de moteurs moléculaires qui voyagent sur ces structures comme la kinésine, la dynéine et la myosine (54, 381, 518). Enfin, parmi la liste des interactants de Stau1 se trouvent aussi des régulateurs du cytosquelette tels qu'IQGAP1, cdc42 et rac1 (518). Il est pertinent de rappeler que Stau1 possède un domaine potentiel de liaison à la tubuline (section 1.5.2.1) et qu'il semble fonctionnel puisqu'il lie la tubuline *in vitro* (531). Ceci suggère donc que ce domaine pourrait intervenir directement dans l'association de la protéine aux microtubules *in vivo*.

1.5.4.3 Stau1 est un composant de complexes ribonucléoprotéiques

En plus d'avoir un patron de localisation tubulovésiculaire, Stau1 a une distribution granulaire. En tant que protéine qui lie l'ARN, Stau1 fait partie de plusieurs complexes ribonucléoprotéiques présents dans divers types cellulaires. De nombreuses observations témoignent de l'association entre Stau1 et le ribosome. Par exemple, cette protéine co-fractionne avec les polysomes, tel que montré par des expériences de sédimentation sur gradient de saccharose (131, 322, 340, 501, 502). De plus, Stau1 co-précipite avec des composants du ribosome et vice-versa (322), sans compter que de nombreuses protéines ribosomiques ont été identifiées par spectrométrie de masse dans la quête d'interactants de Stau1 (54, 518). Des analyses plus poussées ont montré que la protéine co-sédimente avec chacune des deux sous-unités du ribosome (322). Compte tenu que Stau1 lie l'ARN, il est possible qu'il interagisse indirectement avec ces méga-complexes via des messagers en cours de traduction, bien qu'il ne faille pas oublier que le ribosome est lui-même composé en grande partie d'ARN qui pourrait être lié par Stau1. Toutefois, même si la cartographie des déterminants impliqués dans l'association entre Stau1 et le ribosome a montré que la liaison d'ARN par le dsRBD3 contribue à l'interaction, elle a aussi révélé l'identité d'une région minimale qui interagit avec le ribosome indépendamment d'une activité de liaison à l'ARN, soit une combinaison du dsRBD4 et du TBD (322).

Dans les neurones, Stau1 est principalement localisé dans le corps cellulaire, mais on l'observe aussi dans des granules qui contiennent de l'ARN et qui sont distribués dans les dendrites (264, 278, 299, 517). Certains de ces granules dendritiques contiennent des amas très denses de ribosomes qui ne semblent pas compétents pour effectuer de la traduction. Des messagers et des ribosomes semble être toutefois relâchés de complexes enrichis en Stau1 suite à une dépolarisation des neurones induite par un traitement au KCl. Ces granules neuronaux pourraient donc constituer un site d'entreposage de transcrits qui peuvent être libérés lorsqu'ils doivent être traduits, en réponse à une activité synaptique (283). Stau1 est aussi retrouvé dans des complexes ribonucléoprotéiques plus légers qui

s'apparentent à des particules de transport d'ARNm tel que montré par microscopie et par des expériences de fractionnement cellulaire (248, 278, 332). Ces particules contenant Stau1 sont des structures dynamiques qui peuvent entrer aléatoirement en contact avec des P-bodies, soit des complexes associés à la dégradation d'ARN (section 1.1.5.1). Il a d'ailleurs été proposé que les P-bodies servent à entreposer temporairement des ARNm localisés (549). Une étude subséquente a confirmé que Stau1 ne se retrouve pas dans le P-bodies chez les mammifères (502). Néanmoins, cette observation provenant des neurones de mammifères diffère de ce qui a été décrit dans les neurones de drosophile, alors que Staufen co-localise abondamment avec les P-bodies (21). Ceci suggère que les rôles potentiels joués par la protéine divergent quelque peu dans ces deux organismes.

Enfin, il a été montré que Stau1 est présent dans les granules de stress (section 1.1.4.5) lorsque des cellules sont exposées à des conditions oxydatives, bien que la protéine ne soit pas nécessaire à la formation de ce type de granules (501, 502). Il est plutôt proposé que Stau1 se retrouve dans ces structures par défaut, conséquemment à la destruction des polysomes, en association avec des ARNm ou les petites sous-unités du ribosome qui se retrouvent ainsi dans les granules de stress (502).

En conclusion, même si Stau1 est exprimé dans la plupart des types cellulaires, il montre une localisation subcellulaire bien précise, qui concorde tout à fait avec les rôles de la protéine dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique qui ont été élucidés à ce jour. Ils seront exposés dans les paragraphes qui suivent.

1.5.5 Fonctions de Stau1 dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique

Plusieurs des membres de la famille des protéines à dsRBD arborent des domaines catalytiques qui peuvent leur conférer des fonctions spécifiques. Par exemple, les protéines Droscha et Dicer possèdent un domaine ribonucléase de type RNase III. Ce sont des

endoribonucléases essentielles à la biogénèse des miARN (38, 230, 303). Un domaine hélicase est de plus retrouvé dans Dicer. RHA, une autre protéine à dsRBD impliquée dans la régulation de différentes étapes de l'expression génique telles que la transcription, l'épissage et la traduction présente aussi un domaine hélicase (205, 552). La protéine PKR, qui prend part à la défense antivirale et qui peut contrôler l'initiation de la traduction, contient pour sa part un domaine ser/thr kinase (section 1.1.4.5) (190, 352, 395). Il en est de même pour les enzymes ADAR, qui possèdent un domaine de désamination d'adénosine (267). Ces dernières peuvent entre autres altérer les fonctions de protéines cellulaires via leur activité d'édition d'ARNm, ce qui modifie le message codé par des transcrits (376).

Staufen fait partie d'une autre classe de protéines à dsRBD qui ne montrent aucune activité enzymatique intrinsèque (148). Ceci n'empêche pas les différents homologues de Staufen d'être impliqués dans plusieurs phénomènes de régulation post-transcriptionnelle tels que le transport des messagers, leur traduction, leur dégradation et leur épissage alternatif.

1.5.5.1 Stau1 est impliqué dans le transport d'ARNm

À l'origine, Stau1 a été cloné dans l'intention de mieux comprendre le transport d'ARN chez les mammifères (112). À l'époque, ce phénomène avait surtout été mis en évidence dans les neurones où des messagers sont transportés sur de grandes distances le long des dendrites et des axones. Ce processus est d'une grande importance puisqu'il contribue à l'établissement de la mémoire à long terme et au développement des cellules neuronales (section 1.1.3.5). Le rôle prépondérant de Staufen dans le transport des ARNm *bcd* et *osk* chez la drosophile (section 1.5.1) faisait alors de son homologue de mammifère un candidat potentiellement impliqué dans le transport de transcrits dans les neurones. Les premières observations ont montré que Stau1 fait partie de granules d'ARN transportés activement via les microtubules dans les dendrites, ce qui a conforté l'idée qu'il joue un rôle

dans le transport de messagers (264, 278). De plus, l'identification de moteurs moléculaires en tant que partenaires protéiques de Stau1 soutenait cette hypothèse (54, 518).

C'est toutefois une étude subséquente qui est venue confirmer cette fonction, alors que Stau1 a été identifié dans l'analyse protéomique d'une particule de transport purifiée sur la base de la présence de la kinésine KIF5. Il a ainsi été montré qu'une diminution importante des niveaux de Stau1 dans les neurones par l'utilisation de petits ARN interférents réduit sensiblement la localisation dendritique distale d'un ARNm rapporteur arborant le 3'UTR du messenger *CaMKII α* (248). La localisation aux synapses du messenger *CaMKII α* via son 3'UTR a été largement étudiée puisqu'elle semble importante pour la plasticité synaptique et l'établissement de différents types de mémoire (357). Ceci vient donc confirmer que Stau1 joue un rôle dans le transport d'ARNm, tout comme son orthologue de drosophile. Cette fonction semble dépendre de la capacité de Stau1 à lier l'ARN puisque les neurones provenant d'une souris transgénique n'exprimant qu'une forme de la protéine sans dsRBD3 montrent une diminution significative de particules d'ARNm localisées dans la portion distale des dendrites (517).

1.5.5.2 Stau1 dé-réprime la traduction de messagers

Le ciblage d'ARNm représente un mécanisme ingénieux employé par divers organismes pour contrôler la production de protéines d'un point de vue spatial. La traduction des messagers ainsi dirigés doit être réprimée tout au long du processus de transport dans le but d'éviter l'expression ectopique de protéines avant que les transcrits aient rejoint leur destination (section 1.1.3.1). Conséquemment, des processus de dé-répression de la traduction doivent être en place lorsque la cellule intègre des signaux lui indiquant qu'elle doit activer la synthèse protéique localisée.

L'existence d'un tel mécanisme a été mise en lumière chez la drosophile, dans le cadre d'une recherche portant sur la compréhension de la contribution des différents dsRBD

de Staufen à sa fonction au cours de l'ovogenèse. Différents mutants dans lesquels un des 5 dsRBD de Staufen était absent ont été employés pour tenter de rétablir la localisation d'*osk* au pôle postérieur de l'ovocyte dans une mouche transgénique n'exprimant pas Staufen. Cet essai fonctionnel a permis de montrer que lorsqu'une protéine tronquée dépourvue du dsRBD5 est exprimée pour restaurer la fonction de Staufen, le messenger est correctement ciblé mais la synthèse d'Osk n'est jamais activée. Ceci suggère fortement que Staufen joue un rôle dans la dé-répression de la traduction de messagers localisés (355), bien que le signal qui régule l'activation de cette fonction de Staufen soit méconnu.

La présence de Stau1 dans des complexes ribonucléoprotéiques contenant des ribosomes ainsi que sa co-sédimentation avec des polysomes actifs en traduction (section 1.5.4.3) laissent croire que Stau1 puisse remplir le même rôle chez les mammifères que son homologue de drosophile. Cette hypothèse a donc été testée à l'aide de messagers rapporteurs qui ne sont pas efficacement traduits car ils contiennent des structures stables à leur extrémité 5'UTR. Il en est ainsi puisque de telles structures peuvent empêcher la reconnaissance de la coiffe par le facteur d'initiation eIF4F ou bloquer le recrutement du complexe de pré-initiation (section 1.1.4.6.1). La séquence TAR du VIH-1 qui adopte une structure en tige-boucle a ainsi été employée puisque son efficacité à inhiber la traduction d'un messenger rapporteur avait déjà été observée (122). La séquence SBS d'*arf1* a aussi été testée dans ce même contexte. La capacité de Stau1 à dé-réprimer la traduction a été explorée à l'aide de ce système et il s'est avéré que lorsque la protéine est surexprimée, cela favorise l'expression des rapporteurs sans affecter la traduction générale. De plus, la capacité de Stau1 à lier ces structures double-brin est importante pour obtenir cet effet, ce qui implique que Stau1 puisse réguler la traduction de messagers réprimés en s'y associant spécifiquement. Le mécanisme par lequel Stau1 dé-réprime la traduction n'est pas élucidé mais il a été proposé qu'il puisse recruter une hélicase pour détruire les structures inhibitrices en 5' ou encore qu'il recrute directement le ribosome (131).

Cette fonction de Stau1 a été étudiée à l'aide d'un système artificiel et on peut se questionner sur son implication réelle dans la cellule. Des expériences préliminaires ont permis d'identifier des transcrits associés de façon plus importante aux polysomes lourds lorsque Stau1 est surexprimé, ce qui pourrait signifier que leur traduction est facilitée par la protéine (S. Dugré-Brisson, K. Boulay et L. DesGroseillers, données non-publiées). Ces données suggèrent que Stau1 puisse réguler la traduction de messagers endogènes, bien que cela doive être confirmé.

Deux observations appuient tout de même l'hypothèse que Stau1 soit un régulateur de la traduction de messagers auxquels il s'associe. À ce sujet, Stau1 a été identifié en tant que partenaire d'une protéine liant l'ARNm de c-Myc, soit ZBP-1. Dans cette étude, il a été proposé que la traduction de c-Myc soit favorisée par Stau1 car la déplétion de ce dernier par des petits ARN interférents a conduit à une diminution de l'expression de c-Myc sans affecter les niveaux de son messager (528). Cette information est très intéressante compte tenu qu'il est connu que c-myc possède un 5'UTR très structuré qui contient un IRES (section 1.4.3) (17) Il est plausible que Stau1 puisse s'y associer et favoriser sa traduction, bien que cela devra être vérifié. Enfin, des études plus poussées dont le but était de comprendre pourquoi Stau1 est retrouvé dans les granules de stress ont montré que la surexpression de la protéine empêche la formation de ces structures alors que sa déplétion la favorise. Dans des conditions oxydatives, la grande majorité de Stau1 n'est pas recrutée dans les granules de stress et demeure en association avec des polysomes. Ceci empêche l'entrée des messagers sous cette forme dans les granules de stress, ce qui suggère que Stau1 joue un rôle de stabilisateur de polysomes. Il a aussi été proposé que cette fonction de Stau1 puisse aider à la récupération des cellules suite à un stress en aidant à la dissolution des granules de stress (502).

Ces travaux montrent plus ou moins directement que Stau1 favorise la traduction de messagers auxquels il peut s'associer par un mécanisme qui demeure méconnu. Stau1 ne module pas la traduction générale et semble plutôt cibler des transcrits qui sont réprimés au

niveau traductionnel afin de contribuer à leur expression. Cette activité est possiblement régulée, mais les signaux qui la contrôlent ne sont pas encore déterminés.

1.5.5.3 Stau1 est le médiateur d'une nouvelle voie de dégradation d'ARNm

Stau1 a été identifié dans un essai de double hybride chez la levure ayant pour but de trouver les partenaires protéiques d'UPF1, un des facteurs promouvant le NMD (section 1.1.5.4) (268). Ceci a alors révélé une fonction de Stau1 totalement insoupçonnée. En effet, il a été montré que la liaison de Stau1 sur le SBS d'*arf1* qui se situe en aval du codon stop du messager constitue une plate-forme pour le recrutement d'UPF1 (268). Cette interaction impliquant le TBD de Stau1 mène à la dégradation des messagers qui sont associés à la protéine (186, 268, 269). Stau1 est donc le médiateur d'une nouvelle voie de dégradation d'ARNm, nommée "Staufen mediated decay" (SMD).

Le NMD et le SMD nécessitent le recrutement d'UPF1 en 3'UTR d'un transcrit pour entraîner sa déstabilisation et dépendent tous les deux de la traduction du messager en question (268). Les deux processus se distinguent toutefois à plusieurs égards. Alors que le NMD représente une voie de contrôle de la qualité permettant le ciblage de messagers possédant un codon stop prématuré à la dégradation, le SMD constitue plutôt un mécanisme spécialisé de dégradation qui dépend de la liaison de Stau1 à des ARNm spécifiques (237). Aussi, le SMD ne requiert pas la présence de jonctions exon-exon, ni celle des autres facteurs essentiels au NMD, soit UPF2 et UPF3 (268).

Un criblage visant à identifier les ARNm sujets au SMD a été effectué via l'étude des niveaux stationnaires des transcrits présents dans des lysats cellulaires avec des micropuces d'ADN, dans des conditions où l'expression de Stau1 était diminuée ou non par des petits ARN interférents. L'analyse des résultats a permis de montrer une augmentation des niveaux de 1,1% de messagers du transcriptome des cellules HEK293T conséquemment à la déplétion de Stau1, ce qui suggère que ces transcrits sont des cibles endogènes du SMD (269). Cette hypothèse a d'ailleurs été testée et le statut de certains des

substrats potentiels du SMD a été confirmé puisqu'ils remplissent plusieurs conditions. Ainsi, ils sont stabilisés par la déplétion de Stau1 ou d'UPF1. Dans ce sens, la diminution des niveaux de Stau1 ou d'UPF1 augmente la demi-vie de transcrits rapporteurs qui possèdent le 3'UTR de ces messagers. Enfin, leur 3'UTR est lié par Stau1 (269). Il est donc possible que la liste des transcrits qui semblent soumis au SMD fassent partie d'un régulon de dégradation défini par la liaison de Stau1, bien qu'à première vue, les gènes identifiés ne semblent pas nécessairement reliés au niveau de leur fonction (237). Parmi les cibles identifiées on peut noter la présence de l'ARNm du facteur de transcription c-Jun, un proto-oncogène activé en réponse à des signaux mitogéniques (section 1.4.2.2) (269).

Quelques évidences suggèrent que le SMD soit un processus régulé. Entre autres, il a été montré que l'efficacité du SMD augmente lors de la différenciation de la lignée cellulaire myoblastique C2C12 en myotubes, alors que l'efficacité du NMD diminue (186, 269). D'ailleurs, le NMD et le SMD sont des voies qui entrent en compétition pour le recrutement d'UPF1 puisque Stau1 et UPF2 se lient au même endroit sur la protéine et que la diminution de l'expression de l'un de ces médiateurs améliore le processus dans lequel l'autre est impliqué (186). Ainsi, ces mécanismes pourraient être en partie modulés par l'abondance cellulaire des protéines qui y participent (186).

1.5.5.4 Stau1 semble influencer l'épissage alternatif et pourrait de plus favoriser l'export nucléaire

Alors que toutes les fonctions décrites pour Stau1 jusqu'à présent se déroulent dans le cytoplasme, des travaux réalisés par le groupe du Dr Jasmin ont dévoilé que dans le contexte de la dystrophie musculaire myotonique de type 1 ("myotonic dystrophy type 1" ou DM1), Stau1 pourrait aussi exécuter des tâches nucléaires (423). La DM1 est causée par l'expression d'un ARNm codant pour la protéine kinase dystrophia myotonica ("dystrophia myotonica protein kinase" ou DMPK) qui contient un nombre anormalement élevé de répétitions des ribonucléonucléotides CUG dans sa portion 3'UTR. Les transcrits qui

arborent ces répétitions forment des agrégats dans le noyau des cellules qui les expriment et il a été proposé que ces corps nucléaires séquestrent des protéines liant l'ARN qui jouent des rôles importants dans la régulation post-transcriptionnelle. Ceci aurait pour conséquence d'empêcher l'export et la traduction du messenger de la DMPK, en plus d'occasionner des anomalies au niveau de l'expression d'autres gènes (302).

À ce sujet, il est connu que l'épissage alternatif du transcrite codant pour le récepteur de l'insuline ("insulin receptor" ou IR) est aberrant dans des cellules de patients affectés par la DM1 (441). Ainsi, l'équipe du Dr Jasmin a montré que la surexpression de Stau1 dans des cellules présentant un phénotype de DM1 restaure le patron normal d'épissage alternatif d'un minigène composé de quelques exons et introns de l'IR. Ce résultat suggère fortement que Stau1 participe au contrôle de l'épissage du pré-messenger de l'IR. Même si le mécanisme par lequel Stau1 influence cet événement demeure incompris, il est tout de même intéressant de souligner que Stau1 s'associe avec la forme pré-ARNm du minigène de l'IR utilisé (423).

Cette étude a également révélé que le 3'UTR du transcrite de la DMPK est lié directement par Stau1. D'ailleurs, la surexpression de Stau1 dans des cellules transfectées avec un gène rapporteur fusionné au 3'UTR d'une version de DMPK présentant un nombre élevé de répétitions CUG augmente l'expression du gène rapporteur. Cette activité semble dépendre de la capacité de Stau1 à transiter par le noyau puisque la surexpression d'une forme de Stau1 mutée au niveau du NLS ne stimule presque plus l'expression du rapporteur. Ces données laissent donc présager que Stau1 pourrait en quelque sorte participer à l'export nucléaire de l'ARNm de la DMPK, ce qui permettrait ensuite sa traduction (423).

Toutes ces observations tendent à démontrer que Stau1 est multifonctionnel, à l'image de nombreuses protéines liant l'ARN. Il est intéressant de constater que l'influence que Stau1 exerce sur les transcrits dépend en partie de son site de liaison. Par exemple, sa liaison au 5'UTR d'un messenger peut dé-réprimer sa traduction alors qu'une association à

son 3'UTR semble promouvoir sa dégradation (131, 268). Aussi, Stau1 semble influencer la localisation dendritique distale d'un rapporteur possédant le signal de localisation du transcrit de la CamKII α , qui se trouve dans son 3'UTR (248). Il est donc possible que Stau1 transporte des ARNm en s'associant à leur 3'UTR, bien que ce ne soit pas clairement établi. Les différentes fonctions moléculaires de Stau1 sont résumées à la figure 15.

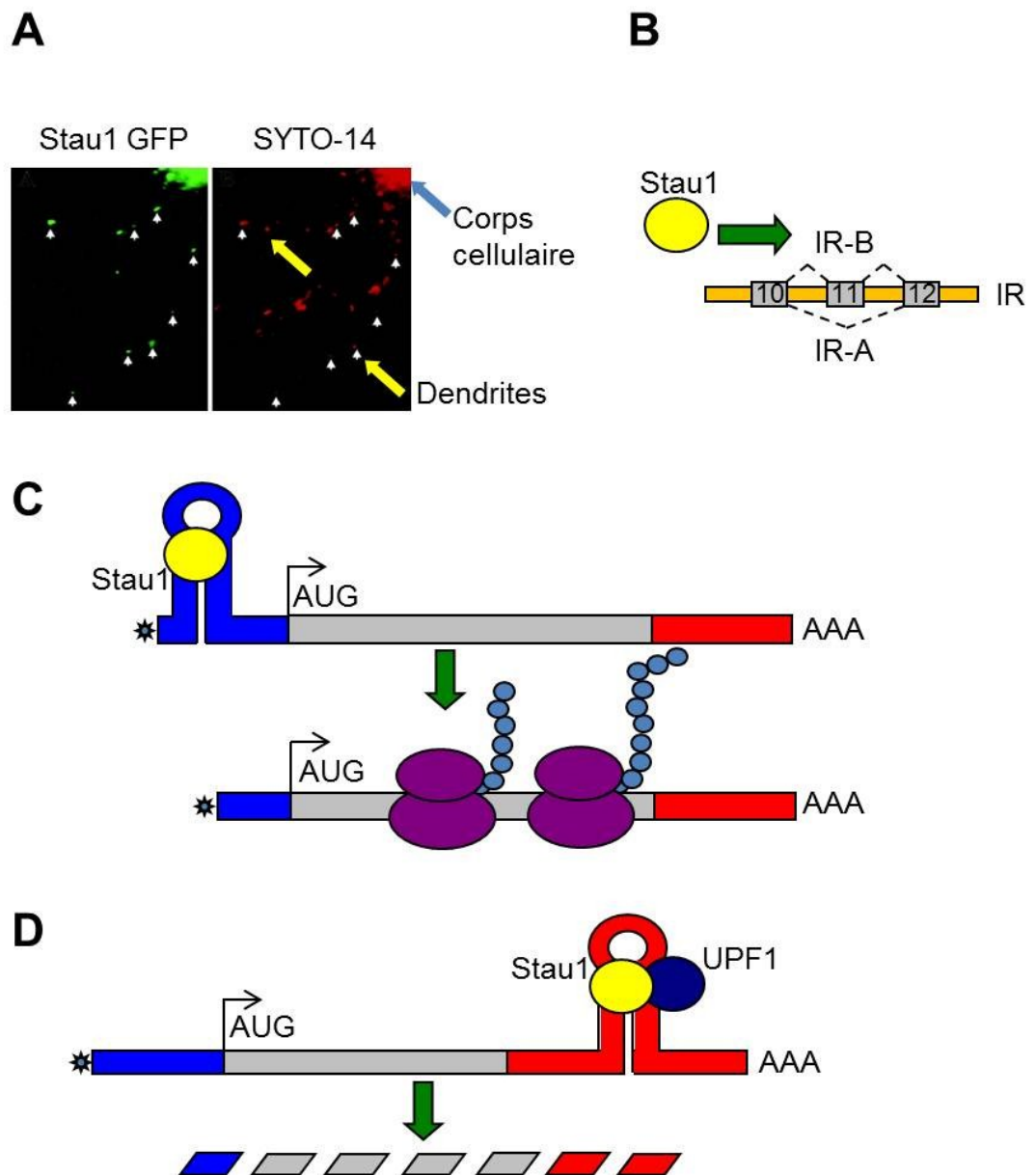


Figure 15: Aperçu des différentes fonctions de Stau1 dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique. A) Stau1 est important pour le transport d'ARNm dans les neurones. Dans les dendrites, des granules contenant Stau1-GFP co-localisent avec de l'ARN marqué au SYTO-14. Adapté de (278). B) Stau1 joue un rôle dans le contrôle de l'épissage alternatif. Stau1 favorise l'inclusion de l'exon 11 dans l'ARNm épissé du récepteur de l'insuline (IR). Adapté de (423). C) Stau1 stimule la traduction. La liaison de Stau1 à une structure inhibant la traduction dans le 5'UTR d'un transcriteur rapporteur augmente son expression. D) Stau1 est le médiateur d'une voie de dégradation d'ARNm. La liaison de Stau1 en 3'UTR d'un messager et le recrutement d'UPF1 par la protéine provoque la déstabilisation de l'ARNm.

1.5.6 Rôles physiologiques de Stau1

Des recherches portant sur les rôles physiologiques de Stau1 commencent à émerger et dans certains cas, ces rôles ont été mis en relation avec les fonctions moléculaires de la protéine.

1.5.6.1 Stau1 et la différenciation cellulaire

Tout comme chez la drosophile, où Staufen participe à la ségrégation asymétrique de l'ARNm du déterminant *prospero*, Stau1 joue des rôles dans la différenciation cellulaire chez les mammifères. Il a ainsi été proposé que Stau1 soit impliqué dans la différenciation de cellules embryonnaires souches de souris puisque sa sous-expression obtenue à l'aide de petits ARN interférents fait en sorte que certains marqueurs de différenciation sont moins exprimés. Le mécanisme à l'origine de cet effet est toutefois inconnu et Stau1 ne semble pas être distribué asymétriquement dans ces cellules, ce qui aurait pu favoriser la localisation différentielle de messagers de déterminants (170). De plus, il a été montré que l'expression de Stau1 augmente lors de la différenciation de myoblastes C2C12 en myotubes (33, 269). Cette élévation des niveaux de Stau1 soutient une amélioration de

l'efficacité du SMD, qui pourrait d'ailleurs contribuer au processus de différenciation (186, 269). Cette observation est difficile à réconcilier avec celle d'un autre groupe, qui a montré que la diminution des niveaux endogènes de Stau1 par petits ARN interférents dans des myoblastes favorise l'activité du promoteur de la myogénine. Il a été proposé que ceci pourrait constituer un événement suffisant pour promouvoir la formation de myotubes différenciés en absence de signaux stimulant la différenciation (544). Toutefois, cette expérience n'a pas pu être répétée par le groupe ayant généré les données sur le SMD, il est donc impossible de déterminer clairement le rôle de Stau1 dans la différenciation musculaire, compte tenu des incohérences entre les deux études (186).

1.5.6.2 Fonction de Stau1 dans l'établissement de la mémoire

Stau1 semble aussi jouer des rôles dans l'établissement de la mémoire puisqu'il est important pour le maintien de la connectivité des synapses et la plasticité synaptique à long-terme. Sa déplétion entraîne des changements morphologiques importants au niveau des épines dendritiques, qui sont des unités fonctionnelles qui intègrent les signaux synaptiques (299, 517). Il a été proposé que ce phénomène soit attribuable à la capacité de Stau1 à transporter et/ou faciliter la traduction de messagers, bien que cela n'ait pas été testé concrètement (299). Dans la même veine, il a été montré que l'absence de Staufen engendre des problèmes dans la formation de la mémoire chez la drosophile (128). Cependant, la caractérisation d'une souris transgénique n'exprimant qu'une forme de Stau1 ne possédant pas de dsRBD3 remet quelque peu en question l'idée que la protéine soit impliquée dans l'établissement de la mémoire. En effet, ces souris ne présentent pas réellement de problèmes de développement, de fertilité et de santé, mais montrent des déficits au niveau de leur activité locomotrice (517). Il faut toutefois préciser qu'il ne s'agit pas d'une réelle invalidation du gène, ce qui pourrait expliquer l'absence de problèmes notables au niveau de la mémoire à long terme. Il est aussi possible qu'il y ait de la compensation dans ces souris par d'autres protéines liant l'ARN. Par exemple, Stau2 est retrouvé dans des

complexes distincts de Stau1, mais leurs activités pourraient s'entrecouper compte tenu qu'ils partagent certains substrats d'ARNm (130, 157, 501).

1.5.6.3 Rôle de Stau1 dans la réplication du VIH-1

L'infection au VIH-1 est à la source du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) et le virus est un parasite qui profite de la machinerie cellulaire de son hôte. D'ailleurs, certains composants de ce virus recrutent Stau1, qui est ensuite incorporé dans les virus néosynthétisés (365). Il a été montré que Stau1 interagit avec le précurseur des protéines de structures pr55^{Gag} via son dsRBD3 et qu'il est associé avec l'ARN génomique viral (81, 365). La présence de Stau1 contribue d'ailleurs à la génération de particules virales infectieuses (81). Il semble moduler l'assemblage du virus par le contrôle de la multimérisation de pr55^{Gag}, une activité régulée par son dsRBD2 (79, 80). Stau1 influence donc la réplication du virus et son caractère infectieux en participant à sa production, en association avec le précurseur structural et l'ARN génomique du VIH-1.

1.6 Hypothèses de recherche

Il est maintenant clair que Stau1 est une protéine multifonctionnelle qui lie des ARNm spécifiques et qui est impliquée dans le contrôle de plusieurs étapes de leur existence soit leur épissage alternatif, leur transport, leur traduction et leur dégradation. Stau1 est donc un régulateur post-transcriptionnel ayant le potentiel de coordonner l'expression de gènes appartenant à un ou plusieurs régulons d'ARN, en recrutant différentes machineries cellulaires au moment opportun. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'expression et/ou les fonctions de Stau1 soient régulées afin qu'il agisse de façon adéquate sur ses ARNm cibles.

Bien que l'expression de Stau1 ait été observée dans tous les tissus et toutes les lignées cellulaires testés, des variations au niveau de son abondance ont été détectées entre autres durant la différenciation des myoblastes en myotubes. Ceci appuie donc l'idée que

l'expression de Stau1 puisse être contrôlée. L'identification des ARNm qui y sont associés a montré qu'une grande proportion de ceux-ci code pour des protéines impliquées dans le métabolisme cellulaire, en plus de révéler que quelques autres codent pour des régulateurs clés du cycle cellulaire. Nous avons donc supposé que Stau1 puisse jouer des rôles lors de la progression dans le cycle cellulaire en influençant le destin de tels transcrits. Ainsi, nous avons voulu étudier son expression tout au long de ce processus et élucider les mécanismes qui la régissent dans le cas où elle varie.

Enfin, il a été montré que les protéines liant l'ARN peuvent être contrôlées par des modifications post-traductionnelles, la plus étudiée d'entre elles étant la phosphorylation. Même si nous ne disposons d'aucune évidence établissant que Stau1 soit phosphorylé, son interaction directe avec la protéine phosphatase-1 (PP1) (362) et la démonstration que les homologues de Staufen chez le xénope (XStau1 et XStau2) sont phosphorylés (9) suggèrent que tel est le cas. Nous présumons donc que Stau1 soit une phosphoprotéine et que ce type de modification post-traductionnelle module ses fonctions régulatrices. En effet, l'action des kinases peut potentiellement changer son affinité pour l'ARN, influencer sa localisation subcellulaire, modifier sa stabilité ou contrôler son association à des partenaires participant à l'accomplissement de ses rôles tels que le ribosome et UPF1. Par conséquent, nous avons voulu explorer ces différentes possibilités.

2. Résultats

2.1 Article 1: Cell cycle-dependent expression of Stau1 is controlled by the anaphase promoting complex/cyclosome

2.1.1 Mise en contexte

À l'instant où nous avons entrepris les travaux présentés dans cet article, nous venions de prendre connaissance de l'identité des ARNm associés à Stau1 dans des cellules HEK293T. Un examen plus approfondi de nos données par la classification des messagers dans des catégories fonctionnelles nous a permis de remarquer que plusieurs des transcrits se trouvant dans des complexes avec Stau1 codent pour des protéines impliquées dans le métabolisme cellulaire et dans la régulation de processus cellulaires. En particulier, nous avons constaté la présence d'ARNm codants pour d'importants régulateurs du cycle de division cellulaire tels que les facteurs de transcription E2F2 et Jun, ainsi que la Cycline D3. Nous avons donc présumé que Stau1 pourrait prendre part aux processus qui régissent la progression dans le cycle cellulaire en contrôlant l'expression post-transcriptionnelle de ces gènes. Nous avons de plus supposé que l'expression ou les fonctions de Stau1 pourraient être elles-mêmes sujettes à une modulation en fonction du cycle cellulaire. Nous avons donc souhaité tester cette dernière hypothèse. Dans l'étude qui suit, nous avons montré que l'expression de Stau1 varie durant le cycle cellulaire et nous avons ainsi identifié un mécanisme qui entraînerait la dégradation de Stau1 en sortie de mitose.

Cette étude est en préparation pour resoumission dans la revue *Molecular and Cellular Biology*.

Notes :

Contribution(s) des auteurs :

W. Viranaicken* : Synchronisations cellulaires, analyses par FACS, essais d'inhibition du protéasome, essais de formation de colonies, courbes de croissance, essais de co-expression

Stau1-Cdc20/Cdh1, expériences d'ARN interférence et essais avec le dominant négatif de Cdh1.

K. Boulay* : Synchronisations cellulaires, analyses par FACS, essais d'inhibition du protéasome, essais d'ubiquitination, co-immunoprécipitations, construction d'expressions de Stau1, essais de formation de colonies, courbes de croissance, essais de co-expression Stau1-Cdc20/Cdh1 et écriture du manuscrit.

V. Trépanier : Isolation d'ARN et RT-qPCR.

C. Fréchina : Construction d'expressions de Cdc20 et Cdh1, assistance technique.

L. DesGroseillers : Supervision générale et écriture du manuscrit.

* Contribution égale des deux premiers auteurs, tel qu'indiqué sur la première page du manuscrit.

Cell cycle-dependent expression of Stauf1 is controlled by the anaphase promoting complex/cyclosome

*Wildriss Viranaicken¹, Karine Boulay¹, Véronique Trépanier, Céline Fréchina and Luc DesGroseillers**

Département de Biochimie, Faculté de médecine, Université de Montréal, 2900 Edouard
Montpetit Montréal, QC 3HT 1J4, Canada

Running title : Stau1 degradation by APC/C^{Cdh1}

¹ These authors contributed equally to this work.

* To whom correspondence should be addressed:

Word count: Materials and Methods:	1,025
Paper:	4,240

2.1.2 Abstract

Staufen1 (Stau1) is an RNA-binding protein involved in mRNA transport, translation and decay. A large proportion of Stau1-bound mRNAs code for proteins involved in cell metabolism and regulation of cell processes. However, it is currently unknown how the functions of Stau1 and hence the expression of its associated mRNAs are modulated. Here, we report that Stau1 abundance fluctuates through the cell cycle: it peaks at the onset of mitosis and decreases as cells complete division. Stau1 down-regulation in mitosis exit is mediated by the anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C) co-activator Cdh1 and depends on a destruction (D)-box motif present in the C-terminal half of the protein. The further evidence that Stau1 is a substrate of the ubiquitin-proteasome system supports the idea that it is a target of the E3 ubiquitin ligase APC/C^{Cdh1}. The importance of controlling Stau1 levels during the cell cycle was underscored by the observation that its overexpression delays mitotic exit and impairs cell proliferation. Altogether, our results point out for the first time to the possibility that the APC/C, via Stau1 degradation, participates in the post-transcriptional regulation of gene expression and suggest that this process may be required for normal cell cycle progression.

2.1.3 Introduction

Cell division is a highly regulated process that requires the expression of many critical proteins such as proto-oncogenes and cell cycle regulators (55, 56). Targeted degradation of these regulators via the ubiquitin-proteasome system (UPS) is a general mechanism to control their function and largely contributes to the unidirectionality of the cell cycle (50). The anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C) and SKP1-Cul1-Fbox (SCF) complex are two major E3 ubiquitin ligases involved in the specificity of this process. Indeed, they play central roles from anaphase to the late G₁ phase and from the end of G₁ phase to early mitosis, respectively (41). APC/C activity is regulated through the cell cycle by its association with either of two activator subunits, Cdc20 and Cdh1. While Cdc20 activates APC/C during the metaphase to anaphase transition, Cdh1 maintains its activation from anaphase until the end of G₁ phase (44). Cdc20 and Cdh1 selectively recruit APC/C substrates bearing sequence recognition motifs: APC/C^{Cdc20} targets protein with destruction boxes (D-box) whereas APC/C^{Cdh1} recognizes substrates containing D-box and/or KEN-box consensus sequences (8, 22, 46).

Although controlled protein degradation provides an efficient way to modulate protein levels, it is clear that transcriptional and post-transcriptional mechanisms are also required to regulate gene expression with acute precision and properly link protein synthesis to cell needs (27, 40). Post-transcriptional gene regulation is achieved through cis-acting elements on mRNAs that are recognized by one or more trans-acting proteins to form messenger ribonucleoprotein (mRNP) complexes. The differential composition of mRNPs then influences mRNA splicing, transport, localization, translational and decay in response to changing environmental cues. It was proposed that RNA-binding proteins and non-coding RNAs tag and group functionally related mRNAs into RNA regulons to coordinate their post-transcriptional expression and ensure that proteins involved in a specific pathway are synthesized at the right time (27). This process has several advantages:

it allows a tight control of the expression of related genes in response to cell stimuli and permits the amplification of a physiological signal via translation of mRNAs coding for relevant proteins. Post-transcriptional regulation of several individual mRNAs begins to be characterized and their interaction with specific RNA-binding proteins and/or miRNAs described (9). However, a global view of the post-transcriptional mechanisms involved in coordinating the expression of mRNAs coding for proteins that are part of a common process and most importantly the relevance of these mechanisms for cell cycle progression are not yet understood.

In mammals, Staufen1 (Stau1) is a double-stranded RNA-binding protein that is ubiquitously expressed and alternative splicing of its mRNA generates protein isoforms of 55 and 63 kDa (38, 60). We and others have shown that Stau1 is a key factor for the post-transcriptional regulation of gene expression (14, 25, 28, 29). Its role in mRNA transport has been clearly established in many species. In mammalian neurons, Stau1-containing mRNPs are actively transported in dendrites in a microtubule-dependent way (25, 28). Stau1 down-regulation impairs dendritic delivery of mRNA-containing mRNPs (25, 57), reduces spine morphogenesis and prevents long-term synaptic plasticity (33), a cellular mechanism for long term memory. In addition to transport, Stau1 is involved in other post-transcriptional mechanisms that control gene expression. Interestingly, the site of Stau1 binding on mRNAs determines the nature of these processes. For example, Stau1 enhances translation (but not decay) of reporter transcripts when bound to their 5'UTR (14) and elicits the decay of mRNAs when bound to their 3'UTR (29, 30). These functions are likely very important for cell physiology as compelling data indicate that Stau1 is involved in cell differentiation (4, 21, 30, 62) and dendritic spine morphogenesis (33, 57). These results show that Stau1 is a multifunctional protein.

Genome-wide analyses revealed that Stau1-bound mRNAs code for proteins with heterogeneous functions mainly related to cell metabolism and regulation of cell processes (18). Therefore, Stau1 may play an important role during cell cycle progression by

controlling the fate of these mRNAs. Thus, Stau1 modulation by cell cycle effectors may dictate the post-transcriptional expression of Stau1-bound transcripts and therefore may contribute to cell proliferation. In this manuscript, we show that Stau1 expression decreases via Cdh1- and UPS-dependent mechanisms. Moreover, our results suggest that Stau1 down-regulation in late mitosis promotes normal mitotic progression and facilitates cell proliferation.

2.1.4 Materials and methods

Plasmids, antibodies and reagents

Plasmids coding for HA-Cdh1 and HA-Cdc20 were obtained from Dr Michele Pagano (3), GFP-Ubiquitin from Dr Michel Bouvier (43), shRNA against Cdh1 and Cdc20 from Dr Reuven Agami (7). Plasmids coding for Stau1⁵⁵-HA₃ (14) and Stau155-FLAG (10) were previously described. FLAG-YFP, FLAG-Cdh1 and FLAG-Cdc20 were generated by PCR amplification of pCMV-YFP-topaz (Packard Bioscience/ PerkinElmer LifeSciences), HA-Cdh1 and HA-Cdc20 and the resulting fragments were cloned in pFLAG-CMV6a (Sigma). The dominant negative version of FLAG-Cdh1 was constructed as before (26) using the FLAG-Cdh1 vector. Mutation of the Stau1 D-box sequence to generate Stau155^{Dmut}-HA₃ was done by PCR-based site-directed mutagenesis using Stau1⁵⁵-HA₃ as a template. In this plasmid, the D-box consensus sequence R³⁷⁵XXL³⁷⁸ was changed for A³⁷⁵XXA³⁷⁸.

Antibodies against Cyclin A (CY-A1), β -Actin (Ac-74), FLAG (M2), HA (rabbit polyclonal) were purchased from Sigma; against Cdh1 (DH-01) from Neomarkers; against Cdc20 (sc-5296) from Santa Cruz Biotechnology; against MPM2 from Abcam; against GFP from Roche Applied Science and against glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) from Research Diagnostics, inc. Monoclonal antibodies against Stau1 (14), Tubulin (60) and HA (60) were previously described.

Cell culture and synchronization

The human cell lines HEK293T and U2OS were cultured in Dulbecco modified Eagle's medium (Invitrogen) supplemented with 10% cosmic calf serum (HyClone) or fetal bovine serum (Wisent), 100 μ g/ml streptomycin and 100 units/ml penicillin (Wisent)

(hereafter referred to as complete DMEM). HCT116 cells were maintained in McCoy's medium (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 µg/ml streptomycin and 100 units/ml penicillin. Cell lines were cultured at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere. When required, MG132 (20 µM or as indicated) was added to the medium 8 h before harvesting the cells.

HCT116 and HEK293T were synchronized at the G₁/S boundary by a double thymidine block. Briefly, cells were treated with 2 mM thymidine for 16 h and released for 8 h in fresh medium before the second block was performed for another 16 h with 2 mM thymidine. Cells were then washed three times in phosphate buffer saline (PBS) and either collected (hours after treatment = 0) or released in fresh medium for different time periods. When indicated, mitotic cells were recovered from shake-off 9 h post-release of the double thymidine block (hours after treatment = 0) and re-plated for different time periods. For synchronization in prometaphase, exponentially growing HCT116 and HEK293T cells were treated with 100 ng/ml of nocodazole for 14 h and then washed three times in PBS. Mitotic cells were recovered by shake-off (hours after release = 0) and re-plated in fresh medium for different time periods.

DNA transfection

For transient expression, cells were transfected with lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). For stable expression, cells were transfected as above and selected with 3 µg/mL puromycin for 2 days. For colony assays and growth curves experiments, cells were then plated in puromycin-free medium.

Flow cytometry analysis

Cell cycle distribution was determined by Fluorescence activated cell sorting (FACS). Cells were trypsinized and fixed in 70% ethanol at -20°C for at least 16 h. Cells were resuspended in PBS containing 40 µg/ml propidium iodide and 100 µg/ml RNase A. After incubation for 1 h at 37°C cells were characterized. Data was acquired using a BD LSRII apparatus and analyzed using the Modfit software. For each experiment 10⁴ cells were analyzed.

Colony assay

Cells were selected with puromycin as described above. At time 0 after selection, cells were plated at the same density in puromycin-free medium for 14 days. At day 14, cells were washed two times with PBS and coloured with 0.5% crystal violet in 50% methanol for 10 min. After extensive washes in water, plates were dried and scanned. Colony formation was determined by measuring absorbance at 570 nm using a spectrophotometer after dissolving colonies from dried plates in a solution containing 0.1 M sodium citrate (pH 4.2) and 20% methanol.

Western blot analysis and immunoprecipitation

Cells were lysed in denaturing buffer containing 8 M urea, 1% CHAPS, 2 mM EDTA. After 5 min incubation, cell extracts were clarified by centrifugation at 15,000g for 10 min at room temperature. Protein concentration was determined using the Bradford assay (Bio-Rad Laboratories). 20 to 40 µg of cell extracts were analyzed by Western blotting. Western blot signals were quantified with the Quantity One (Bio-Rad Laboratories) software.

For immunoprecipitation of FLAG-tagged proteins, transfected HEK293T cells were washed 3 times in PBS and lysed in non-denaturing lysis buffer (50 mM Tris-Cl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1% triton X-100, 2 mM sodium fluoride, Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail [Roche Applied Science]) 24h post-transfection. Lysates were cleared by centrifugation at 15 000g for 15 minutes. Immunoprecipitation of FLAG-tagged proteins was performed with anti-FLAG M2 affinity gel (Sigma-Aldrich) and the immune complexes were eluted with the FLAG peptide (Sigma-Aldrich) as previously described (10). For the analysis of Stau1⁵⁵-HA₃ ubiquitination by immunoprecipitation, transfected cells were lysed as described above, except that cells were treated with 20 μM MG132 for 8 h and 10mM N-ethylmaleimide was added to the non-denaturing lysis buffer. Cleared lysates were incubated with mouse monoclonal anti-HA antibody (12CA5) for 2 h at 4°C and then with protein A-sepharose beads for an additional 2 h at 4°C. Immune complexes were washed 3 times with the lysis buffer and eluted from the resin by heating at 95°C for 5 minutes in 1X protein loading buffer. Protein expression before immunoprecipitation and immunoprecipitated complexes-associated proteins were analysed by SDS-PAGE and Western blotting.

RNA isolation and RT-qPCR

RNA was isolated from cell extracts using the TRIZOL Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's procedure. RNA was resuspended in 50 μL water and digested with DNase using the TURBO DNA-free kit (Ambion). Reverse transcription reactions were done with 4 μL of RNA, the MuLV RT enzyme and oligo d(T) from the GeneAmp RNA PCR kit (Applied Biosystems), according to the manufacturer's procedure. Resulting cDNAs were qPCR amplified using the LightCycler 480 SYBR Green I Master kit (Roche) and the LightCycler 480 instrument (Roche). Sequences of the primer pairs used for the qPCR amplification were: sense, 5'-TTTGTGACCAAGGTTTCGGTTGGG-3' and antisense, 5'-TGGGCTTGTCTGTGGCTTGACTAT-3' for endogenous Stau1; sense, 5'-TATCAATTGCTCCTCTCAGCCACC-3' and antisense, 5'-

GGCCCTTGTCATCGTCATCCTTGTAATCAA-3' for Stau155-FLAG; sense, 5'-
CATGTTTCGTCATGGGTGTGAACCA-3' and antisense, 5'-
AGTGATGGCATGGACTGTGGTCAT-3' for GAPDH.

2.1.5 Results

Amounts of Stau1 protein vary during the cell cycle

To test the hypothesis that Stau1 expression is regulated in a cell cycle-dependent manner, the levels of Stau1 protein were studied in different phases of the cell cycle using synchronized cells. HCT116 cells were arrested at the G₁/S transition or in prometaphase by a double thymidine or a nocodazole block, respectively. Cells were then released from the drug-induced arrest to allow their progression through the cell cycle and were harvested at the indicated time points (Fig. 1A). Western blotting was used to evaluate the protein levels of Stau1 as well as those of Cyclin A, which is expressed from late G₁ to prometaphase, and MPM2, a marker of early mitosis. Analysis of Stau1 levels during the double thymidine block experiment revealed a slight increase of its expression eight hours post-release when cells reached mitosis as determined by the appearance of the MPM2 signal. Consistently, the amount of Stau1 was higher in cells blocked in prometaphase by nocodazole than in asynchronous cells or in thymidine-arrested cells. Interestingly, Stau1 protein level was down-regulated after the release of the cells from the nocodazole block to permit their transition in the G₁ phase. To determine whether the fluctuation of Stau1 expression through the cell cycle can be observed in other cell lines, synchronization experiments were reproduced in the human HEK293T cell line (Fig. 1B). Results similar to those described for HCT116 cells were obtained: Stau1 expression peaked in prometaphase (Noc) and then declined in G₁ after the release from the nocodazole block (Noc + 4h) to return to levels resembling those of asynchronous cells (As) or cells arrested at the G₁/S transition (Thy). FACS analyses confirmed the synchronization of the cells in each condition (Fig. 1B). These results indicate that Stau1 expression is cell cycle-dependent and is down-regulated when cells enter the G₁ phase.

To rule out the possibility that Stau1 accumulation in early mitosis and its subsequent decline are a non-physiological consequence of the nocodazole treatment, an

alternative strategy was used to enrich the cultures with mitotic cells. HCT116 cells were arrested at the G₁/S transition by a double thymidine block before being released to let them progress in the cell cycle. Nine hours post-release, a shake-off was performed to isolate round mitotic cells. Mitotic cells were then re-plated for the indicated periods of time. Samples collected at different time points were analyzed by FACS and Western blotting (Fig. 2A) to evaluate the degree of cell synchronization and protein expression. Consistent with observations shown in Figure 1, Stau1 expression was slightly higher in cells recovered from the shake-off (0h shake-off). These cells contained a significant amount of mitotic cells as indicated by the increased expression of MPM2. Stau1 protein level then decreased as soon as one hour after the shake-off and remained low for the next hours. Stau1 down-regulation paralleled a reduction in the percentage of cells in the G₂/M phases.

To determine whether the decline in Stau1 protein is regulated at the level of mRNA or protein, their amounts were quantified by Western blotting and quantitative RT-PCR (RT-qPCR), respectively. Different time points after the release of HCT116 cells from a nocodazole block were analysed (Fig.2B). As expected, Stau1 protein expression significantly decreased upon release from the nocodazole-induced arrest. In contrast, the steady-state level of Stau1 mRNA was not significantly different indicating that Stau1 down-regulation during M/G₁ transition is a consequence of reduced translation and/or increased degradation of the protein.

Stau1 is degraded by the ubiquitin-proteasome system

As the destruction of many proteins during mitosis exit is dependent on the UPS (50), asynchronous HEK293T cells were treated with the proteasome inhibitor MG132 to determine if Stau1 is degraded by this pathway. In the presence of the drug, the amount of endogenous Stau1 augmented suggesting that the pharmacological treatment protected it from proteolysis (Fig. 3A). To support this result, expression of Stau1⁵⁵-HA₃ was analysed

in HEK293T cells grown in increasing concentrations of MG132 (Fig. 3B). The protein was greatly stabilized, even when the cells were treated with low doses of MG132 (5 μ M). Furthermore, Stau1⁵⁵-HA₃ expression was increased in a dose-dependent way. These observations strongly suggest that Stau1 is degraded by the proteasome.

Proteins to be destroyed by the proteasome are usually tagged by the covalent addition of poly-ubiquitin chains (50). Therefore, as a further evidence for Stau1 degradation by this system, we tested if Stau1 can be modified by ubiquitin. To address this issue, HEK293T cells were co-transfected with plasmids coding for Stau1⁵⁵-HA₃ and GFP-Ubiquitin and cell extracts were analysed by western blotting. In addition to Stau1⁵⁵-HA₃, several slow migrating bands were detected with the anti-HA antibody. These bands were not visible when Stau1⁵⁵-HA₃ was co-transfected with the empty vector (Fig. 3C, left), suggesting that the bands with reduced mobility correspond to ubiquitinated Stau1. Therefore, Stau1⁵⁵-HA₃ was immunoprecipitated with anti-HA antibody and co-purified proteins were analyzed by western blotting using anti-HA and anti-GFP antibodies (Fig. 3C, right). GFP-Ubiquitin was specifically found in the Stau1⁵⁵-HA₃ immunoprecipitated extract and migrated as a smear, most likely because other ubiquitinated proteins were present in the immune complex. Altogether our data indicate that Stau1 is a substrate of the UPS.

The control of Stau1 expression during mitosis exit is mediated by Cdh1

The expression profile of Stau1 and the observation that it can be degraded by the UPS suggest that it is a target of APC/C, an essential E3-ubiquitin ligase known to trigger the ubiquitination of proteins to be destroyed during mitosis and the G₀/G₁ phases (41). The temporal activation of APC/C is regulated by its association with the protein activators Cdc20 and Cdh1, which have limited availability (17). Therefore, to determine whether APC/C^{Cdc20} and/or APC/C^{Cdh1} are involved in Stau1 destabilization, Stau1⁵⁵-FLAG was

overexpressed along with HA-tagged Cdh1 and Cdc20 to increase APC/C activity in asynchronous HEK293T cells. Figure 4A clearly shows that enforced expression of Cdh1 and to a lesser extent of Cdc20 reduced Stau1⁵⁵-FLAG protein amounts. In contrast, Stau1⁵⁵-FLAG mRNA levels were not decreased, showing that Cdh1- and Cdc20-dependent Stau1 down-regulation occurs at the protein level.

Since overexpression of the APC/C protein activators reduced Stau1 levels, impairment of Cdh1 and Cdc20 functions should stabilize Stau1. To test this hypothesis, HEK293T cells were depleted of Cdh1 and Cdc20 by RNA interference following transfection of shRNA-expressing vectors that target Cdh1 and Cdc20 as described before (7). Western blot analysis revealed a near 4-fold enrichment of endogenous Stau1 expression in Cdh1-knocked-down cells as compared to control cells whereas inhibition of Cdc20 only slightly increased Stau1 level (Fig.4B). FACS experiments revealed that the degree of depletion of Cdh1 and Cdc20 was not sufficient to alter the cell cycle (data not shown).

This result indicates that Cdh1 is a major regulator of Stau1 stability. To further support the role of Cdh1 in the modulation of Stau1 protein levels during mitosis exit, APC/C^{Cdh1} activity was abolished using a dominant-negative form of Cdh1. Transfected HEK293T cells were synchronized in prometaphase with nocodazole and analyzed three hours post-release from the block after the cells had entered the G₁ phase. In cells transfected with the empty vector, endogenous Stau1 expression decreased after the release from the nocodazole-induced arrest (Fig.4C), as observed above. In contrast, when the cells overexpressed the dominant-negative FLAG-Cdh1, the amount of Stau1 in G₁ phase remained similar to that in prometaphase. Expression of the mutant did not prevent cells to efficiently complete mitosis as judged by the loss of MPM2 immunoreactivity three hours post-release. The observation that inhibition of APC/C^{Cdh1} precludes Stau1 destruction confirms the involvement of Cdh1 in the Stau1 cell cycle-dependent down-regulation.

Because Cdh1 contributes to substrate recognition and recruitment to APC/C, we tested whether Stau1 can associate with Cdh1 using co-immunoprecipitation. HEK293T cells were co-transfected with Stau1⁵⁵-HA₃ and either FLAG-Cdh1, FLAG-GFP or the empty vector. FLAG-tagged proteins were purified and co-immunoprecipitated proteins were analyzed by western blotting. Stau1⁵⁵-HA₃ was detected in Cdh1 immune complex (Fig. 4D) whereas it was absent in control conditions, showing a specific interaction between Stau1 and Cdh1. Altogether, these results support the notion that Stau1 is a substrate of APC/C^{Cdh1} in mitotic exit.

A D-box motif is necessary for Cdh1-mediated Stau1 degradation

APC/C^{Cdh1} usually recognizes substrates containing D-box and/or KEN-box consensus sequences. A search for these motifs was conducted and revealed the presence of a highly conserved D-box in the C-terminal half of Stau1 (Fig. 5A). To test its functionality, the consensus sequence was mutated to generate Stau1^{55-Dmut}-HA₃ (Fig. 5A). Then, HEK293T cells were co-transfected with plasmids coding for the wild type or the mutant protein and either FLAG-Cdc20 or FLAG-Cdh1 as described above (Fig 4A). In contrast to Stau1⁵⁵-HA₃, Stau1^{55-Dmut}-HA₃ was resistant to Cdh1-dependent destabilization (Fig. 5B) indicating that the identified D-box is required for Stau1 degradation by Cdh1.

Stau1 overexpression delays mitosis exit

To understand the biological relevance of APC/C^{Cdh1}-mediated Stau1 decline in mitosis exit, the impact of the overexpression of wild type (WT-HA₃) or Cdh1-resistant (Dmut-HA₃) Stau1⁵⁵-HA₃ on cell cycle progression was assessed by FACS. Transient expression of these proteins in HEK293 cells increased the percentage of cells in G₂/M in comparison to that of control cells (vector) (Fig. 6A), suggesting that deregulated

expression of Stau1 alters cell cycle progression during these phases. Interestingly, the proportion of cells in G₂/M was higher following the expression of Dmut-HA₃ than that of WT-HA₃, suggesting that inhibition of Cdh1-mediated destabilization of Stau1 impairs mitosis. To test this possibility, we evaluated the timing of mitosis exit. Stau1^{55-Dmut}-HA₃-expressing HEK293T cells were synchronized in prometaphase with a nocodazole block and then released from the block to allow their passage in G₁. At different time points after release, the percentage of mitotic cells (% of cells in G₂/M) was determined by FACS (Fig. 6B) and the presence of mitotic cells was confirmed by the detection of MPM2 by Western blot analysis of cell extracts (Fig. 6C). Both experiments revealed that, when compared to control cells, Stau1^{55-Dmut}-HA₃-expressing cells showed extended mitosis characterized by a delay in the loss of G₂/M population (Fig. 6B) and persistent MPM2 immunoreactivity (Fig. 6C). Nevertheless, four hours post-release, cells had exited mitosis, excluding the possibility that the mutant had caused a complete mitotic arrest. These results reveal that the lack of Cdh1-mediated down-regulation of Stau1 expression during mitosis delays cell division.

Expression of Stau155-HA3 interferes with cell proliferation

Since overexpression of Cdh1-sensitive Stau1 (WT-HA₃) modified the distribution of cells in the different phases of the cell cycle (Fig. 6A), the consequence of increasing Stau1 level on cell proliferation was next investigated. HEK293T cells were transfected with a plasmid coding for Stau1⁵⁵-HA₃ or the empty vector as control. Stau1⁵⁵-HA₃ expression was kept below that of the endogenous Stau1 (Fig. 7A). Cells were then selected with puromycin to remove untransfected cells and promote stable expression of the protein. Surviving cells were seeded at the same density and allowed to grow for four days to monitor cell proliferation by daily counting of the cells (Fig. 7B). In comparison to control cells, Stau1⁵⁵-HA₃-expressing cells clearly exhibited a slower proliferative rate. This striking difference between the two populations of cells was also observed under the

microscope at day four (Fig. 7C). Then, the long term effect of Stau1⁵⁵-HA₃ expression was studied in HEK293T and U2OS cells using a colony formation assay (Fig. 7D). When observed after fourteen days in culture, fewer colonies were formed by cells that overexpressed Stau1⁵⁵-HA₃ than by control cells supporting the idea that deregulation of Stau1 protein levels is deleterious for cell proliferation. Quantification of the crystal violet stain incorporated into cells confirmed this result (Fig. 7E). Interestingly, a clear decrease in Stau1⁵⁵-HA₃ expression was observed in HEK293T cells that remained at day 14 as compared to that at day 0 (Fig. 7F). These data reveal that only cells that have reduced amount of Stau1⁵⁵-HA₃ were able to grow and/or survive for fourteen days and, inversely, that cell proliferation is facilitated by low expression of Stau1. The loss of Stau1⁵⁵-HA₃ over time may also explain why the effect of Stau1⁵⁵-HA₃ overexpression in the colony assay is weaker than the one in the proliferation assay. All of these observations suggest that a tight control of Stau1 protein levels is required to maintain the proliferative property of cells and that APC/C^{Cdh1} contributes to this process in mitosis exit.

2.1.6 Discussion

The periodic expression of cell cycle regulatory proteins is a consequence of their controlled synthesis coupled to their targeted proteolysis. It is well established that transcription factors and ubiquitin ligases play predominant roles in this event (50, 55, 56). Although post-transcriptional regulation contributes to the fine tuning of gene expression (27), the involvement of RNA-binding proteins in the control of cell cycle progression is less appreciated. In this paper, we show that the levels of the multifunctional RNA-binding protein Stau1 oscillate during the cell cycle and describe a novel mechanism by which Cdh1, a co-activator of APC/C, controls Stau1 abundance during mitosis exit. The relevance of this phenomenon during the cell cycle is illustrated by the observation that deregulated Stau1 expression delays mitosis exit and considerably impairs cell proliferation. These results raise the interesting possibilities that Stau1 is an important post-transcriptional regulator of genes involved in cell cycle progression and that APC/C^{Cdh1} controls the fate of relevant mRNAs via the modulation of Stau1 expression.

The APC/C co-activator Cdh1 is a major regulator of Stau1 stability

As expected from the pattern of Stau1 cell cycle-dependent decay that mirrors the period of activity of APC/C, we show that Cdh1 is required for Stau1 degradation. Cdh1 overexpression leads to a decrease of Stau1 abundance whereas its depletion results in a stabilisation of endogenous Stau1 (Fig. 4). Moreover, expression of a dominant-negative form of Cdh1 prevents Stau1 down-regulation during mitosis exit and G₁ confirming that Cdh1 is a critical player in the control of Stau1 expression through the cell cycle. It is likely that Cdh1 directly acts on Stau1 since a functional D-box motif was identified in the C-terminus of Stau1 (Fig. 5), a degron commonly found in APC/C substrates and an association between Stau1 and Cdh1 was shown (Fig. 4). All these results, combined with

the observation that Stau1 is degraded by the UPS (Fig. 3), strongly support the idea that Stau1 is a target of the E3 ubiquitin ligase APC/C^{Cdh1}.

In addition to its roles during mitosis, APC/C^{Cdh1} is important for the maintenance of G₀-G₁ phases, possibly through the destabilization of mitotic cyclins as well as cell cycle regulators controlling G₁/S transition (2, 3, 16, 42, 53, 59). It is thus surprising that, in contrast to several APC/C targets, only a partial degradation of Stau1 was observed following mitosis exit even if APC/C^{Cdh1} activity persists in early G₁. This partial down-regulation of Stau1 was also observed in a high throughput analysis that reported a twofold reduction of Stau1 protein level in G₁ cells as compared to that in prometaphase-arrested cells (13). These results suggest that a subpopulation of Stau1 is protected from Cdh1-dependent destabilization. Since phosphorylation of some of the APC/C^{Cdh1} substrates was shown to prevent their degradation (20, 36, 37, 51), a similar mechanism may limit the accessibility of APC/C to Stau1. Alternatively, a differential subcellular distribution of a fraction of Stau1 could prevent its decay. Although Stau1 has the capacity to transit in the nucleus (39), it is mainly cytoplasmic (38, 60) whereas APC/C^{Cdh1} is assumed to function in the nucleus during G₁ (63). Since Stau1 is a multifunctional protein, its partial and/or spatial degradation may contribute to shut-down one or some of its functions no longer required or deleterious for cell cycle progression while allowing it to execute other tasks important for different cell processes.

Biological relevance of Stau1 regulation for cell cycle progression

Although the extent of Stau1 degradation seems relatively modest, it is highly significant since expression of a Cdh1-resistant form of Stau1 causes the accumulation of cells in G₂/M as a consequence of delayed mitosis exit (Fig. 6). Similar effects were described following overexpression of other APC/C^{Cdh1} substrates like the Polo-like kinase 1 (Plk1) and the mitotic spindle-associated proteins TMAP/CKAP2 and NuSAP (24, 34,

35, 52). In these cases, impaired cytokinesis and structural defects in the mitotic spindle were shown to be the major factors for mitosis exit delay or cell cycle arrest. As Stau1 expression peaks in G₂/early mitosis (Figs. 1-2), its major functions may be related to the control of early events of cell division and its inactivation may be necessary to ensure proper timing of mitosis exit, as observed for several cell cycle regulators.

Based on the effects of Stau1 overexpression on mitosis, it was expected that it will also decrease overall cell proliferation (Fig. 7). Indeed, a moderate Stau1⁵⁵-HA₃ expression, at levels below that of the endogenous protein, is definitely detrimental for cell division as only few cells form colonies after 14 days in culture. Importantly, cells that still grow lost Stau1⁵⁵-HA₃ overexpression over time. Likewise, our efforts to obtain a stable cell line expressing a tagged version of Stau1 always resulted in the establishment of clones with poor expression of the protein (data not shown). Our results are in agreement with those of a large-scale screen in which Stau1 significantly inhibited colony formation when transfected in human hepatoma cells (58). It is currently unclear whether cell proliferation impairment associated with Stau1 overexpression is strictly related to the accumulation of mitotic defects after multiple rounds of cell division or if there is a requirement for Stau1 regulation in other phases of the cell cycle.

Several questions remain concerning the relevance of Stau1 degradation and its roles in the cell cycle. It is well accepted that Stau1, as a multifunctional RNA-binding protein (14, 25, 28, 29), governs the post-transcriptional fate of bound mRNAs. Its regulation and consequently that of its associated mRNAs may have major impacts on protein expression. For example, the UPS-mediated degradation of the RNA-binding protein HuR following heat shock was shown to have a measurable effect on its mRNA substrates. These mRNAs were destabilized and consequently the levels of their encoded proteins reduced (1). Stau1-mediated post-transcriptional regulation of gene expression is a process compatible with the coordination of several events in mitosis. For instance, several studies have shown that specific mRNAs are localized on the mitotic or meiotic spindles in

Drosophila, *Xenopus* and the human HeLa cell line (5, 15, 23, 49). It is noteworthy that 101 of the mRNAs enriched on the mitotic spindle of human cells are among those associated with Stau1 (5, 18). Thus, one attractive possibility is that Stau1 participates in the localization and/or anchoring of mRNAs on the mitotic apparatus. The presence of a tubulin-binding domain in Stau1 protein and its involvement in the microtubule-dependent transport of mRNAs in neurons are consistent with this hypothesis (25, 28, 60).

It was suggested that the process of mRNA localization to the spindle ensures the appropriate distribution of specific transcripts in daughter cells (5, 6). In addition, it may contribute to the local synthesis of proteins required for the completion of cell division (5, 15, 23). As cap-dependent translation is mainly inhibited during mitosis (47), translation of these proteins is assumed to rely on an alternative mechanism that involves internal ribosome entry sites (IRES) (12, 48, 61). IRES are elements in the 5'UTR of specific mRNAs that recruit the translation initiation machinery independently of the cap structure. Auxiliary proteins, the IRES trans-acting factors (ITAFs), contribute to this mechanism (54). Although there is no evidence that Stau1 is an ITAF, it is tempting to speculate that it could be part of an analogous process to favour the expression of mitotic regulators. Especially, Stau1 was shown to enhance the translation of repressed reporter mRNAs by binding inhibitory structures in their 5'UTR, without altering global protein synthesis (14). Through this mechanism, Stau1 could control an mRNA regulon composed of genes involved in mitotic progression. Its subsequent degradation by the APC/C^{Cdh1} would silence these mRNAs whose expression may no longer be required as cells exit mitosis.

In addition to its role in mRNA localization and translation, Stau1 was shown to control mRNA decay (29, 30). When bound to the 3'UTR of some mRNAs, Stau1 can elicit their degradation via the recruitment of the nonsense-mediated decay factor UPF1. The APC/C^{Cdh1}-dependent down-regulation of Stau1 protein may therefore facilitate the expression in G₁ of genes needed for cell growth. The identification of many Stau1-bound mRNAs coding for proteins involved in cell metabolism (18) is consistent with this

hypothesis. Nevertheless, the findings that Stau1 is associated with nearly 7% of the HEK293T transcriptome and that Stau1 degradation is only partial during M/G₁ suggest that more than one of the Stau1 functions may contribute to the overall control of cell proliferation. The identification of Stau1-bound mRNAs during specific phases of the cell cycle will allow a better understanding of its contribution to cell division process.

Through the cell cycle-dependent proteolysis of numerous substrates, APC/C is required for cell survival and proliferation. The list of its known targets not only includes important cell cycle regulators such as cyclins, mitotic kinases and organizers of the cytoskeleton, but also modulators of gene expression like transcription factors and components of E3 ubiquitin ligases complexes (11, 19, 31, 32, 42, 45). Our results with Stau1 add an RNA-binding protein to this growing list of downstream modulators, suggesting that post-transcriptional mechanisms are also subject to APC/C control.

2.1.7 Acknowledgment

We thank Louise Cournoyer for help in the cell culture experiments, Xavier H. Mascle for sharing preliminary results, Natasha Dozois and Eric Zampini for help in some experiments. We also thank Dr Michele Pagano, Dr Michel Bouvier and Dr Reuven Agami for providing plasmids.

This work was supported by a Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) grant (41596-04) to LDG. VT and KB were supported by studentships from NSERC and Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ), respectively.

2.1.8 References

1. Abdelmohsen, K., S. Srikantan, X. Yang, A. Lal, H. H. Kim, Y. Kuwano, S. Galban, K. G. Becker, D. Kamara, R. de Cabo, and M. Gorospe. 2009. Ubiquitin-mediated proteolysis of HuR by heat shock. *Embo J*.
2. Almeida, A., J. P. Bolanos, and S. Moreno. 2005. Cdh1/Hct1-APC is essential for the survival of postmitotic neurons. *J Neurosci* 25:8115-21.
3. Bashir, T., N. V. Dorrello, V. Amador, D. Guardavaccaro, and M. Pagano. 2004. Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase. *Nature* 428:190-3.
4. Belanger, G., M. A. Stocksley, M. Vandromme, L. Schaeffer, L. Furic, L. DesGroseillers, and B. J. Jasmin. 2003. Localization of the RNA-binding proteins Staufen1 and Staufen2 at the mammalian neuromuscular junction. *J Neurochem* 86:669-77.
5. Blower, M. D., E. Feric, K. Weis, and R. Heald. 2007. Genome-wide analysis demonstrates conserved localization of messenger RNAs to mitotic microtubules. *J Cell Biol* 179:1365-73.
6. Blower, M. D., M. Nachury, R. Heald, and K. Weis. 2005. A Rae1-containing ribonucleoprotein complex is required for mitotic spindle assembly. *Cell* 121:223-34.
7. Brummelkamp, T. R., R. Bernards, and R. Agami. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296:550-3.
8. Burton, J. L., V. Tsakraklides, and M. J. Solomon. 2005. Assembly of an APC-Cdh1-substrate complex is stimulated by engagement of a destruction box. *Mol Cell* 18:533-42.
9. Chan, C. S., O. Elemento, and S. Tavazoie. 2005. Revealing posttranscriptional regulatory elements through network-level conservation. *PLoS Comput Biol* 1:e69.
10. Chatel-Chaix, L., K. Boulay, A. J. Mouland, and L. Desgroseillers. 2008. The host protein Staufen1 interacts with the Pr55Gag zinc fingers and regulates HIV-1 assembly via its N-terminus. *Retrovirology* 5:41.
11. Christensen, K. L., J. D. Brennan, C. S. Aldridge, and H. L. Ford. 2007. Cell cycle regulation of the human Six1 homeoprotein is mediated by APC(Cdh1). *Oncogene* 26:3406-14.
12. Cornelis, S., Y. Bruynooghe, G. Denecker, S. Van Huffel, S. Tinton, and R. Beyaert. 2000. Identification and characterization of a novel cell cycle-regulated internal ribosome entry site. *Mol Cell* 5:597-605.
13. Dephoure, N., C. Zhou, J. Villen, S. A. Beausoleil, C. E. Bakalarski, S. J. Elledge, and S. P. Gygi. 2008. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10762-7.

14. Dugre-Brisson, S., G. Elvira, K. Boulay, L. Chatel-Chaix, A. J. Mouland, and L. DesGroseillers. 2005. Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res* 33:4797-812.
15. Eliscovich, C., I. Peset, I. Vernos, and R. Mendez. 2008. Spindle-localized CPE-mediated translation controls meiotic chromosome segregation. *Nat Cell Biol* 10:858-65.
16. Engelbert, D., D. Schnerch, A. Baumgarten, and R. Wasch. 2008. The ubiquitin ligase APC(Cdh1) is required to maintain genome integrity in primary human cells. *Oncogene* 27:907-17.
17. Fang, G., H. Yu, and M. W. Kirschner. 1998. Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Mol Cell* 2:163-71.
18. Furic, L., M. Maher-Laporte, and L. DesGroseillers. 2008. A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes. *RNA* 14:324-35.
19. Gabellini, D., I. N. Colaluca, H. C. Vodermaier, G. Biamonti, M. Giacca, A. Falaschi, S. Riva, and F. A. Peverali. 2003. Early mitotic degradation of the homeoprotein HOXC10 is potentially linked to cell cycle progression. *Embo J* 22:3715-24.
20. Gao, D., H. Inuzuka, A. Tseng, R. Y. Chin, A. Toker, and W. Wei. 2009. Phosphorylation by Akt1 promotes cytoplasmic localization of Skp2 and impairs APCCdh1-mediated Skp2 destruction. *Nat Cell Biol* 11:397-408.
21. Gautrey, H., J. McConnell, M. Lako, J. Hall, and J. Hesketh. 2008. Staufen1 is expressed in preimplantation mouse embryos and is required for embryonic stem cell differentiation. *Biochim Biophys Acta*.
22. Glotzer, M., A. W. Murray, and M. W. Kirschner. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349:132-8.
23. Groisman, I., Y. S. Huang, R. Mendez, Q. Cao, W. Theurkauf, and J. D. Richter. 2000. CPEB, maskin, and cyclin B1 mRNA at the mitotic apparatus: implications for local translational control of cell division. *Cell* 103:435-47.
24. Hong, K. U., Y. S. Park, Y. S. Seong, D. Kang, C. D. Bae, and J. Park. 2007. Functional importance of the anaphase-promoting complex-Cdh1-mediated degradation of TMAP/CKAP2 in regulation of spindle function and cytokinesis. *Mol Cell Biol* 27:3667-81.
25. Kanai, Y., N. Dohmae, and N. Hirokawa. 2004. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 43:513-25.
26. Ke, P. Y., and Z. F. Chang. 2004. Mitotic degradation of human thymidine kinase 1 is dependent on the anaphase-promoting complex/cyclosome-CDH1-mediated pathway. *Mol Cell Biol* 24:514-26.
27. Keene, J. D. 2007. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet* 8:533-43.

28. Kiebler, M. A., I. Hemraj, P. Verkade, M. Kohrmann, P. Fortes, R. M. Marion, J. Ortin, and C. G. Dotti. 1999. The mammalian staufen protein localizes to the somatodendritic domain of cultured hippocampal neurons: implications for its involvement in mRNA transport. *J Neurosci* 19:288-97.
29. Kim, Y. K., L. Furic, L. Desgroseillers, and L. E. Maquat. 2005. Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* 120:195-208.
30. Kim, Y. K., L. Furic, M. Parisien, F. Major, L. Desgroseillers, and L. E. Maquat. 2007. Staufen1 regulates diverse classes of mammalian transcripts. *Embo J* 26:2670-81.
31. Laoukili, J., M. Alvarez-Fernandez, M. Stahl, and R. H. Medema. 2008. FoxM1 is degraded at mitotic exit in a Cdh1-dependent manner. *Cell Cycle* 7:2720-6.
32. Lasorella, A., J. Stegmuller, D. Guardavaccaro, G. Liu, M. S. Carro, G. Rothschild, L. de la Torre-Ubieta, M. Pagano, A. Bonni, and A. Iavarone. 2006. Degradation of Id2 by the anaphase-promoting complex couples cell cycle exit and axonal growth. *Nature* 442:471-4.
33. Lebeau, G., M. Maher-Laporte, L. Topolnik, C. E. Laurent, W. Sossin, L. Desgroseillers, and J. C. Lacaille. 2008. Staufen1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells. *Mol Cell Biol* 28:2896-907.
34. Li, L., Y. Zhou, L. Sun, G. Xing, C. Tian, J. Sun, L. Zhang, and F. He. 2007. NuSAP is degraded by APC/C-Cdh1 and its overexpression results in mitotic arrest dependent of its microtubules' affinity. *Cell Signal* 19:2046-55.
35. Lindon, C., and J. Pines. 2004. Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells. *J Cell Biol* 164:233-41.
36. Littlepage, L. E., and J. V. Ruderman. 2002. Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes Dev* 16:2274-85.
37. Mailand, N., and J. F. Diffley. 2005. CDKs promote DNA replication origin licensing in human cells by protecting Cdc6 from APC/C-dependent proteolysis. *Cell* 122:915-26.
38. Marion, R. M., P. Fortes, A. Beloso, C. Dotti, and J. Ortin. 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* 19:2212-9.
39. Martel, C., P. Macchi, L. Furic, M. A. Kiebler, and L. Desgroseillers. 2006. Staufen1 is imported into the nucleolus via a bipartite nuclear localization signal and several modulatory determinants. *Biochem J* 393:245-54.
40. Moore, M. J. 2005. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* 309:1514-8.
41. Nakayama, K. I., and K. Nakayama. 2006. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* 6:369-81.

42. Park, H. J., R. H. Costa, L. F. Lau, A. L. Tyner, and P. Raychaudhuri. 2008. Anaphase-promoting complex/cyclosome-CDH1-mediated proteolysis of the forkhead box M1 transcription factor is critical for regulated entry into S phase. *Mol Cell Biol* 28:5162-71.
43. Perroy, J., S. Pontier, P. G. Charest, M. Aubry, and M. Bouvier. 2004. Real-time monitoring of ubiquitination in living cells by BRET. *Nat Methods* 1:203-8.
44. Pesin, J. A., and T. L. Orr-Weaver. 2008. Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24:475-99.
45. Peters, J. M. 2006. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:644-56.
46. Pflieger, C. M., and M. W. Kirschner. 2000. The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev* 14:655-65.
47. Pyronnet, S., J. Dostie, and N. Sonenberg. 2001. Suppression of cap-dependent translation in mitosis. *Genes Dev* 15:2083-93.
48. Pyronnet, S., L. Pradayrol, and N. Sonenberg. 2000. A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Mol Cell* 5:607-16.
49. Raff, J. W., W. G. Whitfield, and D. M. Glover. 1990. Two distinct mechanisms localise cyclin B transcripts in syncytial *Drosophila* embryos. *Development* 110:1249-61.
50. Reed, S. I. 2003. Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:855-64.
51. Rodier, G., P. Coulombe, P. L. Tanguay, C. Boutonnet, and S. Meloche. 2008. Phosphorylation of Skp2 regulated by CDK2 and Cdc14B protects it from degradation by APC(Cdh1) in G1 phase. *Embo J* 27:679-91.
52. Seki, A., and G. Fang. 2007. CKAP2 is a spindle-associated protein degraded by APC/C-Cdh1 during mitotic exit. *J Biol Chem* 282:15103-13.
53. Sigl, R., C. Wandke, V. Rauch, J. Kirk, T. Hunt, and S. Geley. 2009. Loss of the mammalian APC/C activator FZR1 shortens G1 and lengthens S phase but has little effect on exit from mitosis. *J Cell Sci* 122:4208-17.
54. Stoneley, M., and A. E. Willis. 2004. Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene* 23:3200-7.
55. Tyson, J. J., A. Csikasz-Nagy, and B. Novak. 2002. The dynamics of cell cycle regulation. *Bioessays* 24:1095-109.
56. Tyson, J. J., and B. Novak. 2008. Temporal organization of the cell cycle. *Curr Biol* 18:R759-R768.
57. Vessey, J. P., P. Macchi, J. M. Stein, M. Mikl, K. N. Hawker, P. Vogelsang, K. Wieczorek, G. Vendra, J. Riefler, F. Tubing, S. A. Aparicio, T. Abel, and M. A. Kiebler. 2008. A loss of function allele for murine *Staufen1* leads to impairment of dendritic *Staufen1*-RNP delivery and dendritic spine morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:16374-9.

58. Wan, D., Y. Gong, W. Qin, P. Zhang, J. Li, L. Wei, X. Zhou, H. Li, X. Qiu, F. Zhong, L. He, J. Yu, G. Yao, H. Jiang, L. Qian, Y. Yu, H. Shu, X. Chen, H. Xu, M. Guo, Z. Pan, Y. Chen, C. Ge, S. Yang, and J. Gu. 2004. Large-scale cDNA transfection screening for genes related to cancer development and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15724-9.
59. Wei, W., N. G. Ayad, Y. Wan, G. J. Zhang, M. W. Kirschner, and W. G. Kaelin, Jr. 2004. Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature* 428:194-8.
60. Wickham, L., T. Duchaine, M. Luo, I. R. Nabi, and L. DesGroseillers. 1999. Mammalian staufin is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 19:2220-30.
61. Wilker, E. W., M. A. van Vugt, S. A. Artim, P. H. Huang, C. P. Petersen, H. C. Reinhardt, Y. Feng, P. A. Sharp, N. Sonenberg, F. M. White, and M. B. Yaffe. 2007. 14-3-3sigma controls mitotic translation to facilitate cytokinesis. *Nature* 446:329-32.
62. Yamaguchi, Y., R. Oohinata, T. Naiki, and K. Irie. 2008. Stau1 negatively regulates myogenic differentiation in C2C12 cells. *Genes Cells* 13:583-92.
63. Zhou, Y., Y. P. Ching, A. C. Chun, and D. Y. Jin. 2003. Nuclear localization of the cell cycle regulator CDH1 and its regulation by phosphorylation. *J Biol Chem* 278:12530-6.

2.1.9 Figure legends

Figure 1. Stau1 protein levels vary during the cell cycle. (A) Stau1 expression in HCT116 cells. HCT116 cells were synchronized by a double thymidine or a nocodazole block and then released by addition of fresh medium. Cell extracts were prepared at different time points post-release as indicated and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using anti-Stau1, anti-Cyclin A, anti-MPM2, and anti- β -Actin antibodies. The ratios between Stau1 and β -Actin expression were calculated from the Western blot signals. The ratio at each time point expressed as a percentage of the ratio observed in unsynchronized cells (AS), which was arbitrarily set to 100%, is indicated below the gel (%S/A). **(B) Stau1 expression in HEK293T cells. Top:** HEK293T cells were grown asynchronously (AS) or were synchronized at the G₁/S transition by a double thymidine block (Thy), in prometaphase by a nocodazole block (Noc) or in G₁ by a nocodazole block followed by a release of 4 h in fresh medium (Noc+4h). Stau1 expression was monitored by Western blotting using anti-Stau1, anti-Cyclin A and anti- α -Tubulin antibodies. The ratios between Stau1 and α -Tubulin expression were calculated as above, the ratio in unsynchronized cells (AS) being arbitrarily set to 100%. **Bottom:** Synchronization of the cells was validated by FACS analyses. The position of the peaks corresponding to diploid (2n) and tetraploid (4n) cells is indicated by arrows.

Figure 2. Stau1 expression peaks in late G₂/early mitosis and then declines as cells complete division. (A) Top: HCT116 cells were synchronized at the G₁/S transition by a double thymidine block and then released by addition of fresh medium. Mitotic cells were collected 9 h post-release by shake-off and replated. Cell extracts were prepared at different time points and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using anti-Stau1, anti-Cyclin A, anti-MPM2 and anti- β -Actin antibodies. The ratios between Stau1 and β -Actin expression were calculated as in the legend of figure 1. **Bottom:** The percentage of cells in

different phases of the cell cycle at each time point was determined by FACS analyses. **(B) Top:** Prometaphase cells were collected by shake-off and replated in fresh medium. Cell extracts were prepared at different time points and analysed by Western blots using antibodies against Stau1, MPM2 and β -Actin. The ratios between Stau1 and β -Actin expression were calculated as above, the ratio at time 0 post-release being arbitrarily set to 100%. **Bottom:** Quantification of the relative amounts of Stau1 protein (left) and mRNA (right) at each time point, expressed as the mean of 3 independent experiments. For protein analysis: ***: $p < 0.0005$ (Student's *t*-test). For mRNA analysis, RNA was isolated from the cell extracts used for Western blot analysis and the levels of mRNA were quantified by RT-qPCR. The ratios between Stau1 and GAPDH mRNA are expressed as a percentage of the ratio observed at time 0 post-release which was arbitrarily set to 100%. Percentages were not statistically different (Student's *t*-test).

Figure 3. Stau1 is a substrate of the ubiquitin proteasome system. (A) Endogenous Stau1. HEK293T cells were treated with the proteasome inhibitor MG132 or by DMSO (the MG132 vehicle) as control. Cell extracts were analyzed by Western blotting using anti-Stau1 and anti-GAPDH antibodies. The ratios between Stau1 and GAPDH expression were calculated as described in the legend of figure 1, the ratio observed in cells treated with DMSO being arbitrarily set to 100%. **(B) Transfected Stau1⁵⁵-HA₃.** HEK293T cells were transfected with a plasmid coding for Stau1⁵⁵-HA₃ and incubated with either DMSO or increasing concentrations of MG132 for 8h. As controls, empty vector-transfected (empty vector) cells and Stau1⁵⁵-HA₃-transfected cells (NT) were left untreated. Stau1⁵⁵-HA₃ expression was analyzed by Western blotting using anti-HA and anti- β -Actin antibodies. The ratios between Stau1⁵⁵-HA₃ and β -Actin expression were calculated as above, the ratio observed in non-treated cells (NT) being arbitrarily set to 100%. **(C) Stau1⁵⁵-HA₃ is ubiquitinated.** HEK293T cells were transfected with plasmids coding for Stau1⁵⁵-HA₃ and/or GFP-Ubiquitin. Left: input. Right: Stau1⁵⁵-HA₃ was immunoprecipitated with a

mouse monoclonal anti-HA antibody (12CA5) and co-immunoprecipitated proteins were analyzed by Western blotting using rabbit polyclonal anti-HA and anti-GFP antibodies.

Figure 4. Stau1 down-regulation during mitotic exit is dependent on the APC/C activator Cdh1. (A) Overexpression of Cdh1 reduces Stau1 levels. **Top:** HEK293T cells were co-transfected with plasmids coding for Stau1⁵⁵-FLAG and HA-Cdc20, HA-Cdh1 or the empty vector as control. Cells extracts were analyzed by Western blotting using anti-FLAG, anti-HA and anti- β -Actin antibodies. The ratios between Stau1⁵⁵-FLAG and β -Actin expression were calculated as in the legend of figure 1, the ratio observed in cells transfected with the empty vector being arbitrarily set to 100%. **Middle and bottom:** Quantification of the relative amounts of Stau1⁵⁵-FLAG protein (middle) and mRNA (bottom) for each condition, expressed as the mean of 3 independent experiments performed as above (top). For mRNA analysis, RNA was isolated from the cell extracts used for Western blot analysis and the levels of mRNA were quantified by RT-qPCR. The ratios between Stau1 and GAPDH mRNA are expressed as a percentage of the ratio in the control condition which was arbitrary set to 100%. **(B) Down-regulation of Cdh1 stabilizes endogenous Stau1 expression.** HEK293T cells were transfected with plasmids expressing shRNA against Cdc20, Cdh1 or a random sequence as control. Cells extracts were analyzed by Western blotting using anti-Stau1, anti-Cdc20, anti-Cdh1 and anti- β -Actin antibodies. The ratios between Stau1⁵⁵ and β -Actin expression were calculated as above. **(C) Expression of a dominant negative Cdh1 stabilizes endogenous Stau1 expression.** HEK293T cells were transfected with a plasmid coding for a FLAG-tagged dominant negative isoform of Cdh1 (DN) or the empty vector (V), then blocked in prometaphase with nocodazole (N) and released from the drug-induced arrest in fresh medium for 3h (G₁). Protein expression was analyzed by Western blotting using anti-Stau1, anti-MPM2, anti-FLAG and anti- β -Actin antibodies. The ratios between Stau1⁵⁵ and β -Actin expression were calculated as above, the ratio observed in nocodazole-treated cells being arbitrarily set to 100%. **(D) Interaction between Cdh1 and Stau1⁵⁵.** HEK293T

cells were co-transfected with plasmids coding for Stau1⁵⁵-HA₃ and FLAG-Cdh1, FLAG-YFP or the empty vector as indicated. Left: Input. Right: FLAG-tagged proteins were immunoprecipitated with anti-FLAG antibody and co-purified Stau1⁵⁵-HA₃ was detected with anti-HA (12CA5) antibody by Western blotting.

Figure 5. Stau1 down-regulation is dependent on a D-box motif. (A) Sequence alignment of a putative D-box motif in Stau1 from different species. Sequence of the mutated Stau1 protein is indicated below. **(B) Mutations in the D-box stabilize Stau1^{55-Dmut}-HA₃ expression.** HEK293T cells were co-transfected with plasmids coding for either Stau1⁵⁵-HA₃ or Stau1^{55-Dmut}-HA₃ and FLAG-Cdc20, FLAG-Cdh1 or the empty vector as control. Cell extracts were analyzed by Western blotting using anti-HA, anti-FLAG and anti-β-Actin antibodies. The ratios between Stau1⁵⁵-HA₃ and β-Actin expression were calculated as described in legend of figure 1.

Figure 6. Expression of Stau1^{55-Dmut}-HA₃ delays exit from mitosis. (A) HEK293T cells were transfected with plasmids coding for Stau1⁵⁵-HA₃ (WT-HA₃), Stau1^{55-Dmut}-HA₃ (Dmut-HA₃) or the empty vector. **Top:** Western blot analysis of Stau1 expression using anti-HA and anti-β-Actin antibodies. **Bottom:** FACS analysis indicating the percentage of cells in different phases of the cell cycle in each condition. **(B)** HEK293T cells were transfected as in (A), blocked in prometaphase by a nocodazole block and then released in fresh medium. At different time points post-release, cells were harvested and analyzed by FACS. The percentage of cells in G₂/M at each time point is indicated and is expressed as the mean of 3 independent experiments. **(C)** Cells used for experiments in (B) were lysed and cell extracts were processed for Western blotting using anti-MPM2, anti-HA and anti-β-Actin antibodies.

Figure 7. Stau1⁵⁵ overexpression impairs cell proliferation. (A) HEK293T cells were transfected with a plasmid coding for Stau1⁵⁵-HA₃ (+) or the empty vector (-). Twenty four

hours post-transfection cells were harvested and Stau1⁵⁵-HA₃ overexpression analyzed by Western blotting using anti-Stau1, anti-HA and anti-β-Actin antibodies. **(B)** Transfected cells (as in A) were grown in the presence of puromycin for 2 days and then replated at the same density in fresh medium. Cells were harvested every day and their number was counted using a hemacytometer. **(C)** Phase contrast analysis of cells from (B) after 4 days in culture. **(D)** Colony assays were performed to measure cell proliferation in cells overexpressing Stau1⁵⁵-HA₃. HEK293T and U2OS cells were transfected with a plasmid coding for Stau1⁵⁵-HA₃ or the empty vector. Transfected cells were selected in the presence of puromycine for 2 days, then plated at the same density in fresh medium and grown for fourteen days. Colonies were stained with crystal violet. **(E)** Colony formation from experiments performed as in (D) was quantified by measuring absorbance at 570 nm as described in materials and methods. Quantification of the relative amounts of cells transfected with the empty vector (white bars) or Stau1⁵⁵-HA₃ (gray bars) is expressed as the mean of 3 independent experiments. **(F)** Western blot analysis using anti-Stau1, anti-HA and anti-β-Actin antibodies was done to evaluate the level of Stau1⁵⁵-HA₃ overexpression in HEK293T cells at day 0 and day 14.

2.1.10 Figures

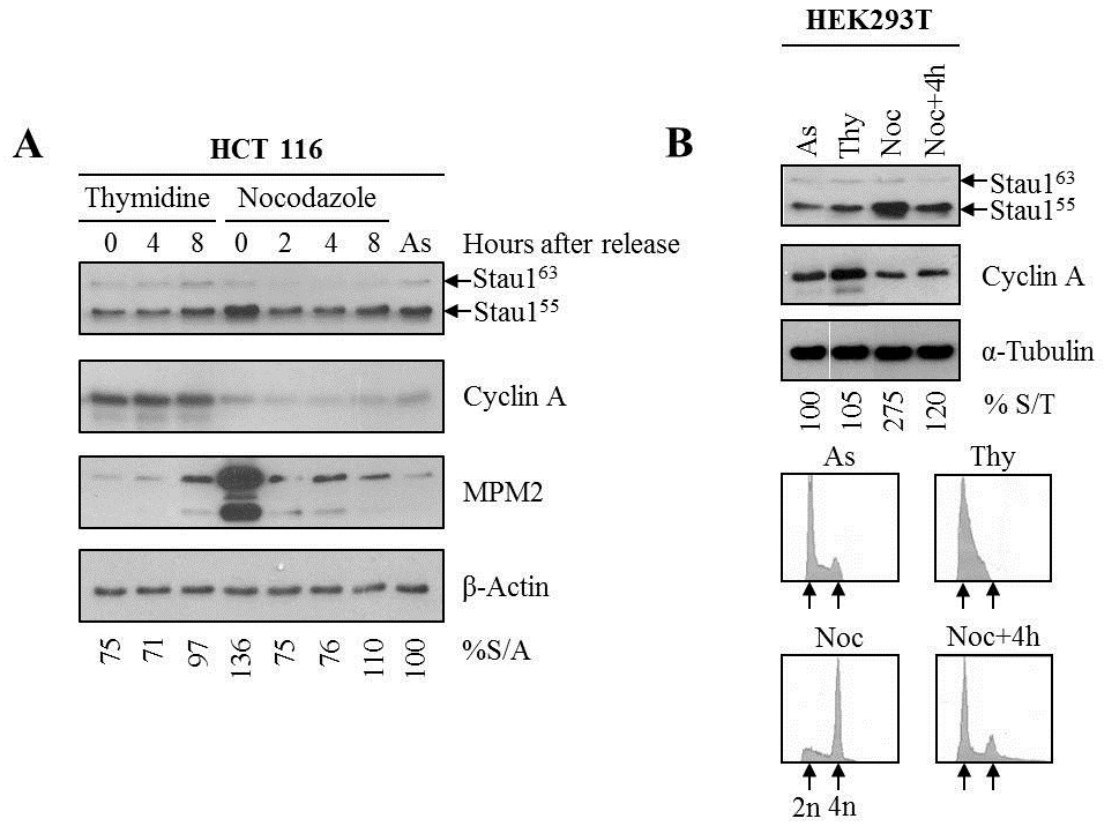


Figure 1

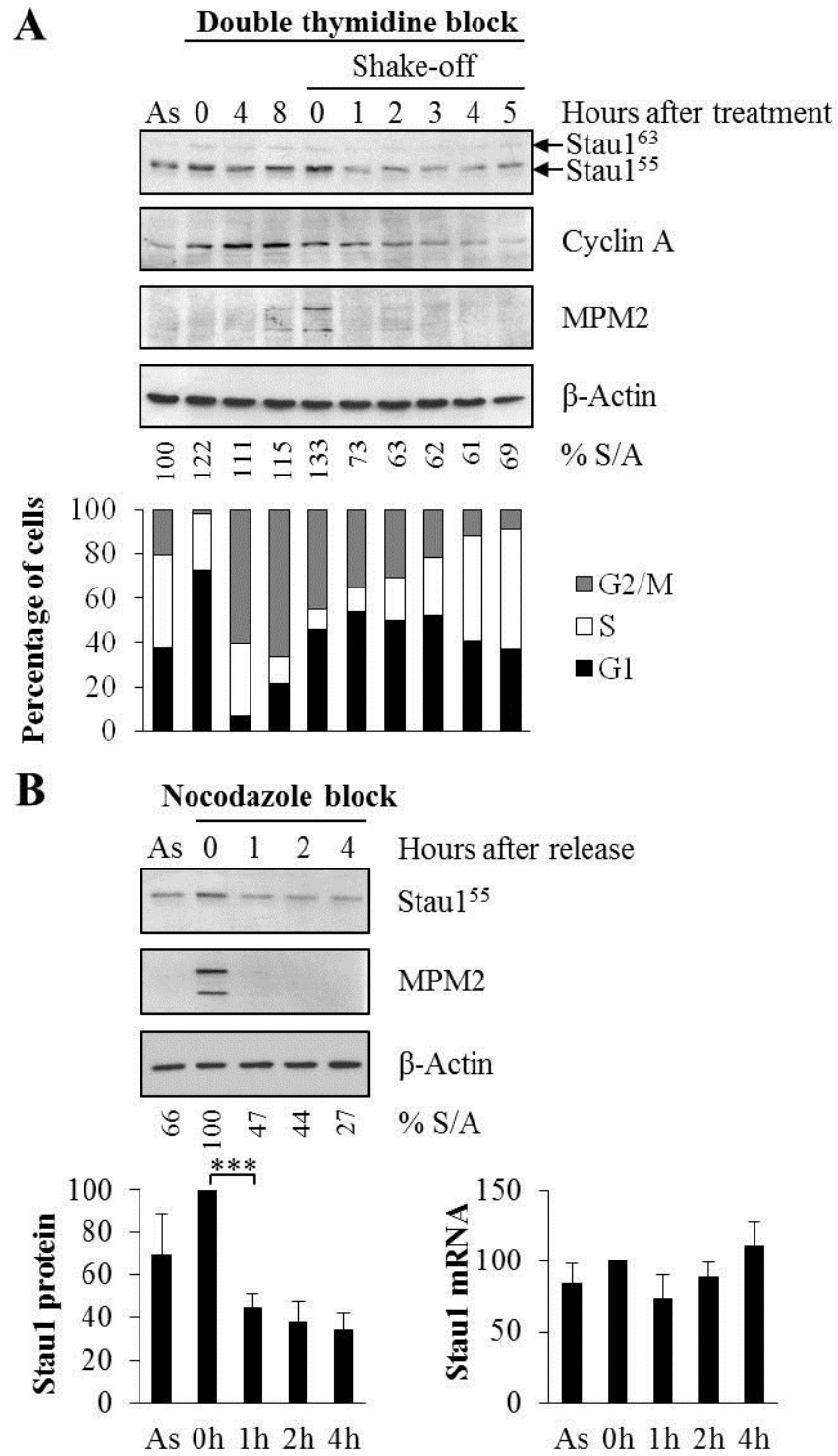


Figure 2

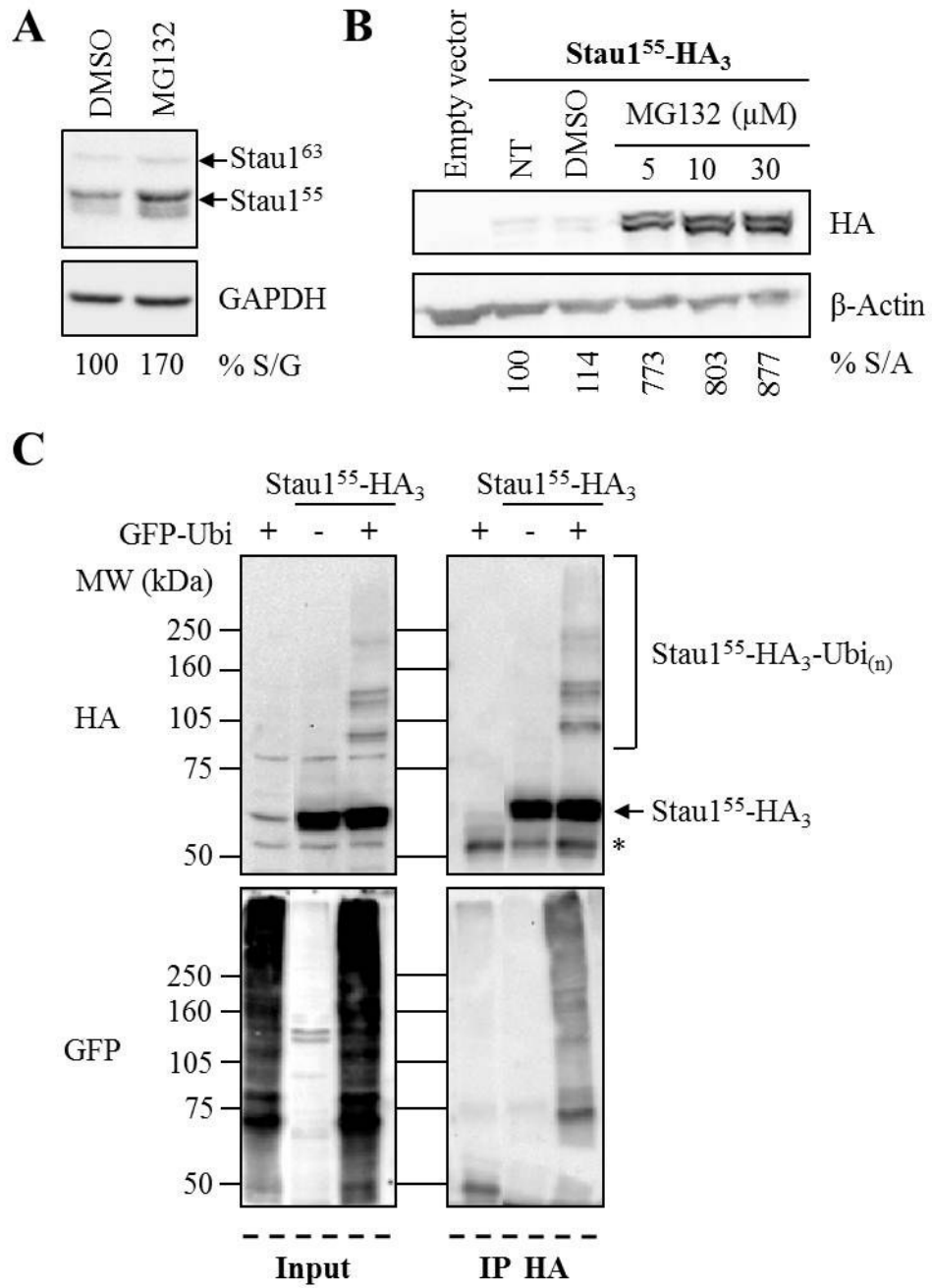


Figure 3

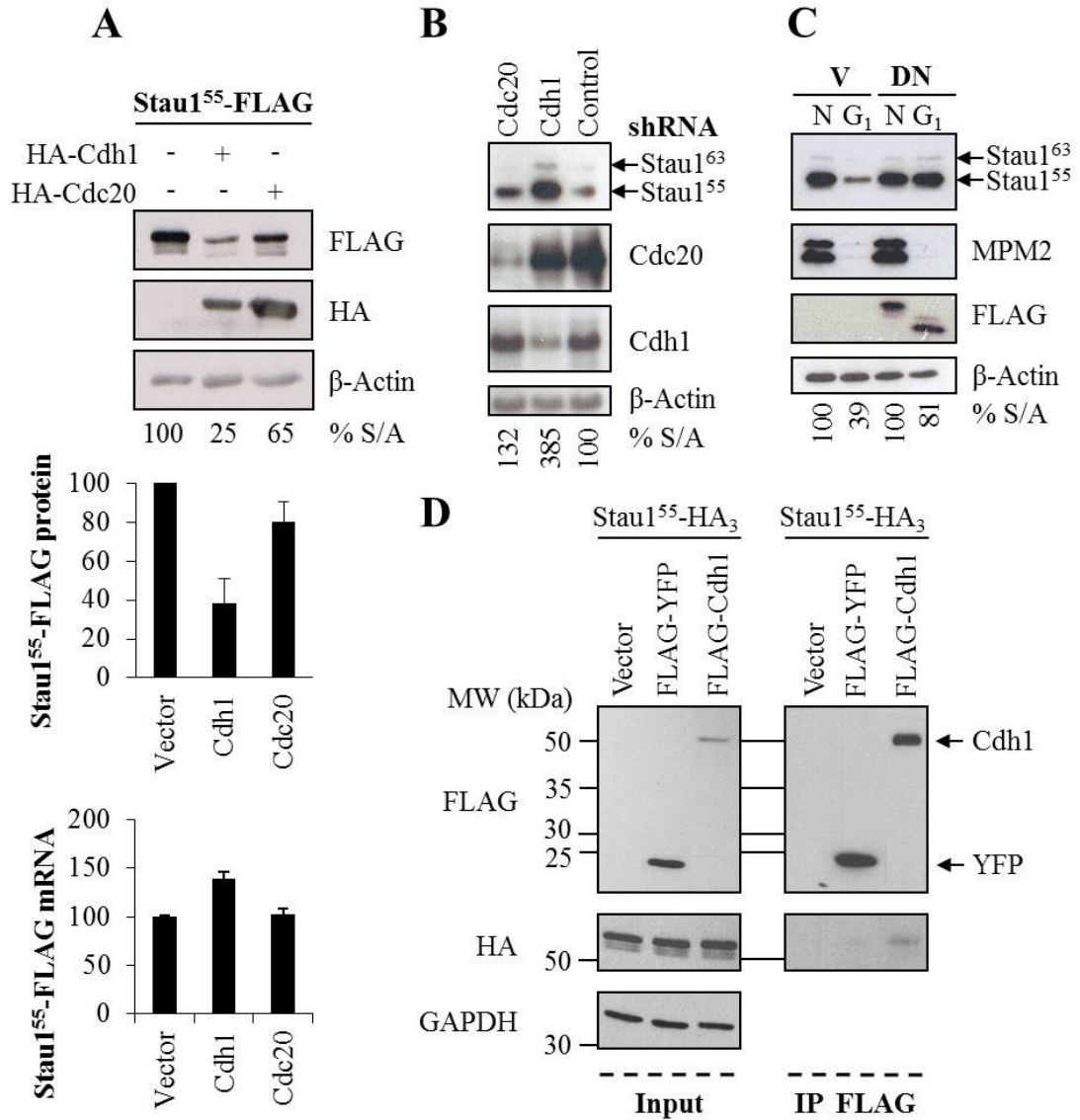


Figure 4

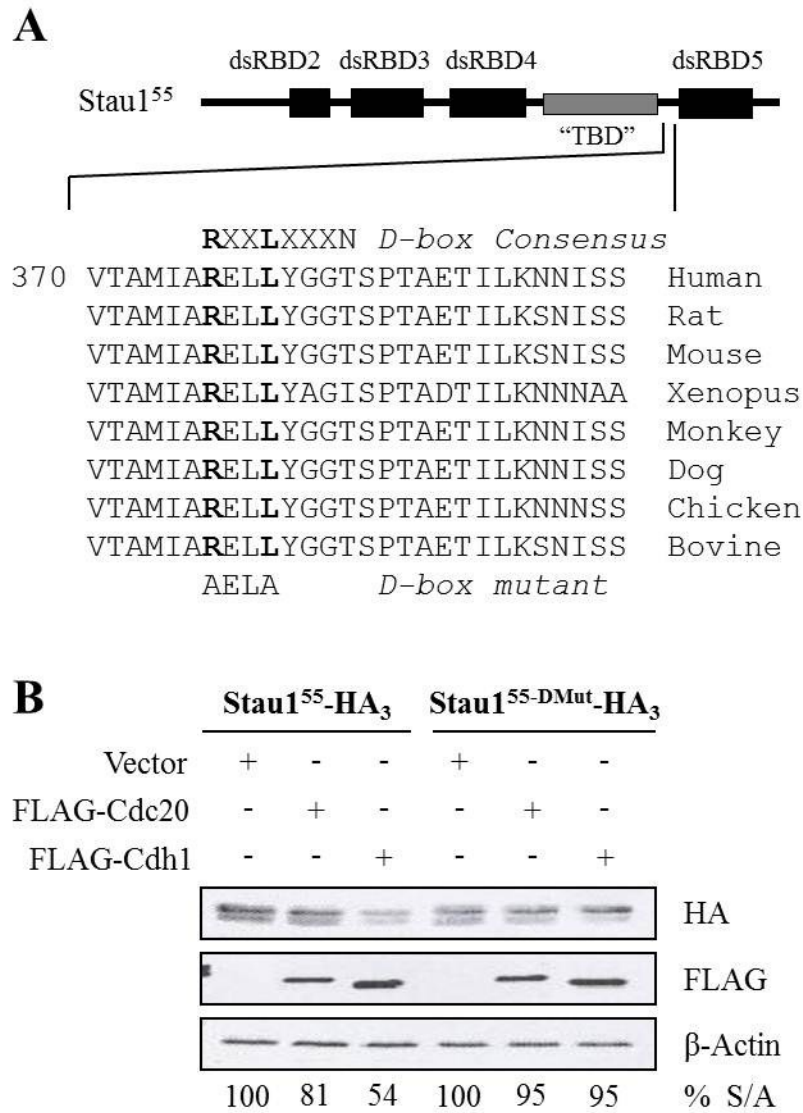


Figure 5

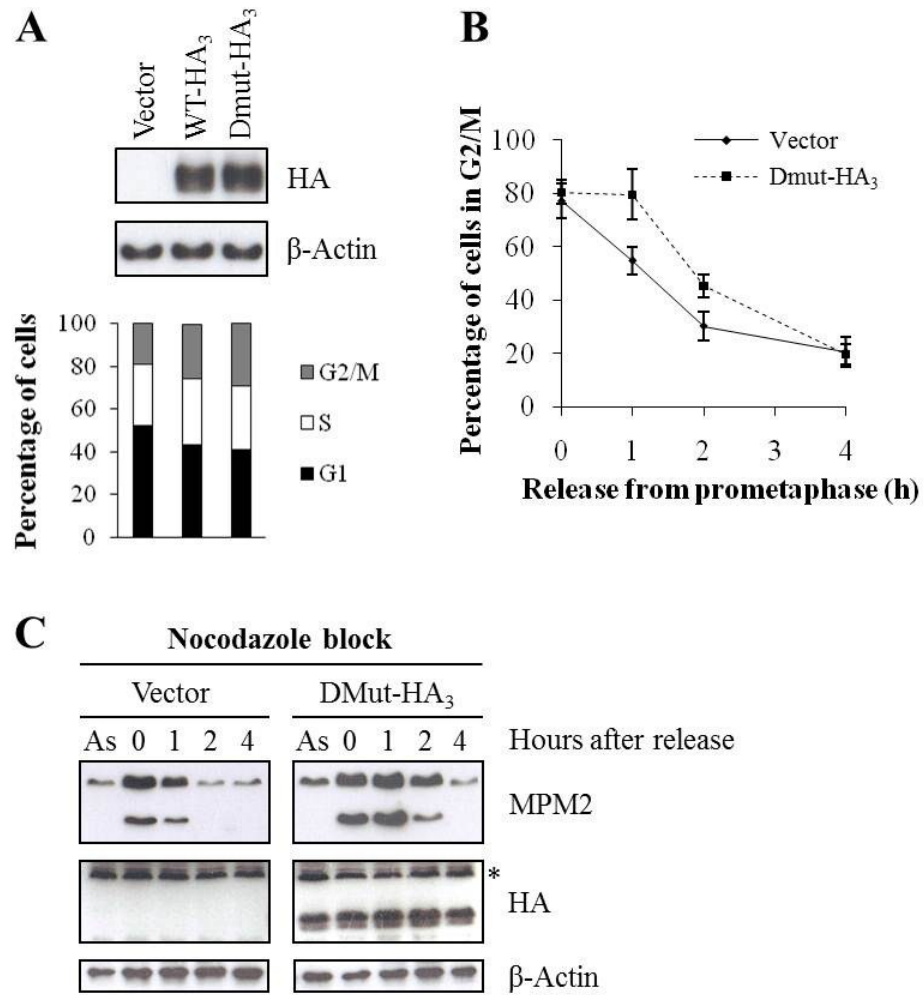


Figure 6

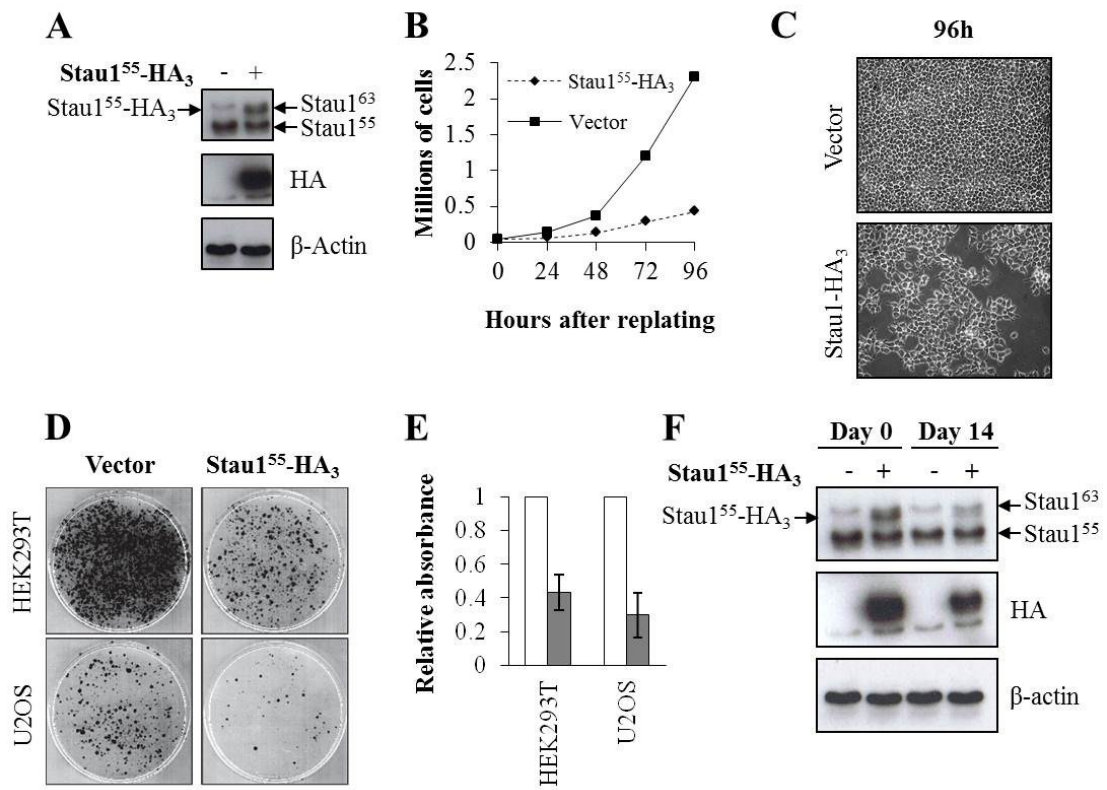


Figure 7

2.2 Article 2: Phosphorylation of Stau1: a putative role in the regulation of Stau1-mediated mRNA decay.

2.2.1 Mise en contexte

Au courant des dernières années, les différentes fonctions de Stau1 dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique ont été mises en évidence. La participation de Stau1 à ces divers processus soulève toutefois son lot de questions. En effet, puisque l'interaction de Stau1 avec un transcrit peut autant favoriser son transport, sa traduction ou sa dégradation, on peut s'interroger sur ce qui définit l'impact qu'aura la protéine sur les ARNm qui y sont associés. D'une part, il semblerait que le site de reconnaissance de Stau1 sur un ARNm détermine en quelque sorte sa destinée car il a été rapporté que la liaison de Stau1 au 5'UTR d'un transcrit stimule sa traduction alors que la liaison de la protéine au 3'UTR d'un transcrit induit plutôt sa destruction. Or même si cela n'est pas encore clair chez les mammifères, il est assumé que Stau1 contribue au transport des ARNm en se liant également à leur portion 3'UTR. Nous avons donc supposé que d'autres mécanismes pourraient influencer le choix de la voie empruntée. En considérant que Stau1 accomplit possiblement ses différentes tâches en recrutant des facteurs cellulaires sur les ARNm qu'il lie, il est plausible que de tels mécanismes ciblent spécifiquement l'association de Stau1 à ses différents partenaires. Nous avons émis l'hypothèse que des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation pourraient moduler Stau1. L'article qui suit consiste en la validation de cette proposition.

Ce manuscrit demeure en préparation puisque des expériences doivent encore être complétées avant sa soumission

Notes :

Contribution(s) des auteurs :

K. Boulay : Électrophorèse en gel à deux dimensions, et purification de phosphoprotéines à l'aide de colonnes d'affinité, établissement d'une lignée stable exprimant Stau1-FLAG, immunopurification à large échelle de Stau1, construction de mutants phosphomimétiques et non-phosphorylables de Stau1, immunoprécipitations et synchronisation de cellules.

L. Furic : Marquages métaboliques et purification de phosphoprotéines à l'aide de colonnes d'affinité

G. Lapointe : Mise en culture et transfection de neurones d'hippocampe de rat, acquisition d'images par microscopie à fluorescence confocale

S. Dugré-Brisson : Essais luciférase

É. Bonneil : Analyse par spectrométrie de masse

P. Thibault : Supervision générale

L. DesGroseillers : Supervision générale et écriture du manuscrit.

Phosphorylation of Staufen1 : a putative role in the regulation of Staufen1-mediated mRNA decay.

*Karine Boulay, Luc Furic, Gabriel Lapointe, Samuel Dugré-Brisson, Éric Bonneil¹, Pierre Thibault¹ and Luc DesGroseillers**

Département de Biochimie, Faculté de médecine, Université de Montréal, 2900 Edouard Montpetit Montréal, QC H3T 1J4, Canada and ¹Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montréal, Quebec, Canada, H3C 3J7

* To whom correspondence should be addressed:

2.2.2 Abstract

Staufen1 (Stau1) is a multifunctional RNA binding protein involved in mRNA transport, translation and decay. Stau1 binds to the 5'- or 3'-untranslated region of a specific subset of transcripts and controls their expression, possibly through its interaction with key post-transcriptional regulators. However, it is currently unknown how the different activities of the protein are modulated. Here, we present several evidences indicating that a large percentage of the Stau1 pool is phosphorylated *in vivo*. A mass spectrometry analysis revealed that Stau1 Ser95, Thr291 and Ser309 are phosphorylated residues. Phosphomimetic or non-phosphorylatable substitutions of these residues neither changed Stau1 intracellular distribution nor impaired its capacity to stimulate translation. Interestingly, the phosphomimetic mutations of Thr291 and Ser309 impeded Stau1 association with the non-sense mediated decay (NMD) factor UPF1. Since this interaction is necessary to elicit the destabilization of Stau1-bound RNAs, our data strongly suggest that Stau1-mediated decay (SMD) is negatively regulated by Stau1 phosphorylation.

2.2.3 Introduction

Staufen 1 (Stau1) is a member of the double-stranded RNA-binding protein family that interacts with complex RNA structures (30, 46). In human cells, the Stau1 gene is expressed in most tissues and alternative splicing generates transcripts coding for protein isoforms of 55 and 63 kDa that only differ at their N-terminal extremities (30, 46). In addition to Stau1, mammals express a second Staufen paralogue, Stau2, which is mainly detected in the brain (7, 41). Although Stau1 and Stau2 shares 51% amino acid sequence identity, the two proteins are part of distinct complexes in neurons (7) and they are associated to mRNA populations that poorly overlap in dividing cells (9). Accordingly, knockdown experiments in hippocampal slice cultures revealed that Stau1 and Stau2 are involved in different pathways, being required for long term potentiation and long term depression, respectively (23, 24).

So far, Stau1 has been more characterized than Stau2. It was found to interact with about 7% of the HEK293T cell transcriptome (9) and its presence in various ribonucleoprotein complexes (RNPs) was validated in multiple cell types by proteomic and cell fractionations approaches (3, 5, 17, 22, 25, 28, 34, 45). Moreover, Stau1 was linked to at least three mechanisms of post-transcriptional regulation of gene expression: mRNA transport, translation and decay (8, 17, 19, 44). These functions are most likely achieved through the RNA-binding capacity of Stau1 conferred by two of its double-stranded RNA binding domains (dsRBDs), dsRBD3 and dsRBD4 (46). However, since Stau1 has no intrinsic enzymatic activity, it is believed that the protein has to recruit cofactors to fulfil its roles.

The involvement of Stau1 in mRNA transport has been clearly established in neurons where Stau1 RNPs migrate along the microtubules to distal parts of the dendrites (18, 21). In these cells, Stau1 is a component of RNA granules equipped with a kinesin motor and down-regulation of its expression or impairment of its RNA-binding activity

disrupt the dendritic localization of specific mRNAs (17, 44). Besides its contribution to mRNA transport, Stau1 can control translation. Indeed, we showed that Stau1 enhance the expression of mRNAs when bound to structures present in their 5'UTR, possibly by relieving the translational inhibition imposed by these motifs (8). This result is consistent with previous studies providing evidences that the protein is associated to ribosomes (3, 25, 30, 45). Stau1 also modulates the stability of a wide variety of transcripts via a pathway called Stau1-mediated mRNA decay (SMD) (11, 12, 19, 20, 43). Hence, Stau1 interacts with the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) factor UPF1 and the recruitment of this complex to the 3'UTR of an mRNA through Stau1 binding is sufficient to trigger its degradation (19).

Collectively, these data indicate that Stau1 diverse roles in post-transcriptional regulation of gene expression can influence the fate of its bound mRNAs. The site of Stau1 recognition on transcripts determines the nature of the induced process as the protein stimulates translation of mRNAs when bound to the 5'UTR (8) and elicits their transport or their destruction when bound to the 3'UTR (17, 19). Therefore, a major question arises on how are Stau1 functions selected if its interaction with a transcript can lead to either mRNA localization or mRNA decay. The answer probably lies in the mechanisms that control Stau1 association with mRNA targets and/or with different cellular machineries. Various studies on other members of the double-stranded RNA-binding protein family have pointed out that post-translational modifications such as phosphorylation can modulate the RNA-binding properties, the intracellular distribution, the stability or the interactome of these proteins (13, 14, 36, 38, 39). Interestingly, it was reported that both Stau proteins are phosphorylated during meiotic maturation of *Xenopus* eggs, likely by the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway (1). Moreover, Stau1 was shown to interact directly with protein phosphatase 1 (PP1) in rat, suggesting that the protein may be submitted to cycles of phosphorylation and dephosphorylation (31). Taken together, these findings suggest that phosphorylation may regulate Stau1 activities.

In the work described here, we identified several phosphorylated residues in Stau1. Phosphomimetic or non-phosphorylatable mutation of all these sites did not alter Stau1 subcellular localization or its ability to facilitate mRNA translation. Instead, introduction of mutations mimicking constitutive phosphorylation of the sites found in Stau1 tubulin-binding domain (TBD) prevented UPF1 recruitment, suggesting that SMD may be specifically controlled by the action of kinases. Based on these results, we propose that Stau1 phosphorylation contributes to the selection and the regulation of its functions.

2.2.4 Materials and methods

Plasmid constructions

Plasmids expressing Stau1⁵⁵-HA₃ (8), Stau1⁵⁵-FLAG (4), SBS-Rluc (8) and Myc-UPF1 (19) were described previously. The truncated Stau1 mutant (dsRBD3/4-HA₃, amino acids 89-289), was constructed by PCR amplification of dsRBD3/4 using pcDNA-RSV-Stau1⁵⁵-HA₃ as a template, sense (5'-ATATAAGCTTAAGCCACCATGGAGGTGAATGGAAGAGAATC-3') and antisense (5'-ATATTCTAGATTAGCGGCCGCTCTCTCTGACTTGAGTGC-3') oligonucleotides and the Vent DNA polymerase (New England Biolabs). The resulting fragment was digested with HindIII and XbaI and cloned in the pcDNA-RSV vector (16). Then, dsRBD3/4 was C-terminally tagged with HA₃, as reported earlier (46). The plasmid coding for Stau1⁵⁵-FLAG₃ was generated as described before for Stau1⁵⁵-FLAG (4), with the exception that a FLAG₃ tag was inserted into the NotI sites of pcDNA-RSV-Stau1⁵⁵-HA₃ in replacement of the HA₃ tag. Construction of non-phosphorylatable Stau1⁵⁵ expressors (S95A, T291A and S309A) and phosphomimetic Stau1⁵⁵ expressors (S95D, T291D and S309D) was done by PCR-based site-directed mutagenesis using either Stau1⁵⁵-FLAG or Stau1⁵⁵-FLAG₃ as templates and the Phusion DNA polymerase (New England Biolabs). FLAG-Cdc20 was generated by PCR amplification of the coding sequence of Cdc20 using HA-Cdc20 (2) (a generous gift of Dr Michele Pagano) as a template and the Phusion DNA polymerase. The resulting fragment was cloned in pFLAG-CMV6a (Sigma-Aldrich).

Cell lines culture, synchronization and transfections

Human embryonic kidney fibroblasts (HEK293T) were cultured at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere in Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen) supplemented with 10% cosmic calf serum (HyClone), 2 mM L-Glutamine, 250 ng/mL

amphotericin B, 100 µg/mL streptomycin and 100 units/mL penicillin (Wisent). For synchronization in prometaphase, exponentially growing cells were treated with 100 ng/mL of nocodazole for 16 h.

For transient expression experiments, cells were transfected using Lipofectamine 2000 reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). For the establishment of stable cell lines, the pcDNA-RSV-Stau1⁵⁵-FLAG construction and the empty vector were first digested using BglIII. Then, the linearized plasmids were transfected in HEK293T cells using FuGENE 6 following the manufacturer's protocol (Roche Biochemicals). 48 hours post-transfection, cells were selected in medium containing 400 µg/ml of G-418 (Wisent) for 12 days. Antibiotic-resistant clones were isolated and tested for their expression of Stau1⁵⁵-FLAG by performing Western blot analyses. A clone transfected with the empty vector was also used as a control.

[³²P] orthophosphate metabolic labeling

HEK293T cells were either left untransfected or were transiently transfected with the indicated Stau1-HA₃ expressors. Twenty-four hours post-transfection, cells were incubated with [³²P] orthophosphate 1 mCi/mL (Amersham) in phosphate-free DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% dialyzed Fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen) for two hours. Cells were then washed three times in ice-cold PBS and lysed for subsequent experiments, as described below.

Preparation of cell extracts, Western blot analysis and immunoprecipitation

Cells were washed three times in ice-cold PBS and lysed in buffer (50 mM Tris-Cl at pH 7.5, 1% Triton X-100, 2 mM MgCl₂, 150 mM NaCl) supplemented with Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science), 2 mM NaF and 200 µM Na-orthovanadate. Lysates were cleared by centrifugation at 17,000 g for 15 min. For

Western blotting, the following commercial antibodies were used: Ac-74 mouse anti- β -actin (Sigma), D13.14.4E rabbit anti-phospho-ERK 1/2 (Cell Signalling), M2 mouse anti-FLAG (Sigma), 9E10 mouse anti-Myc (Sigma), 5G10 rabbit anti-S6 (Cell Signalling), mouse anti-L7 (Novus Biologicals) and 0.T.181 mouse anti-MPM2 (Abcam). 11C6 mouse anti-Stau1 (8) and 12CA5 mouse anti-HA (46) were previously described. Western blot signals were revealed using Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences).

Immunoprecipitations were performed by incubating cleared lysates with the indicated antibodies for two hours at 4°C and then with protein A-sepharose beads (Amersham) for an additional 2 h at 4°C. Immune complexes were washed 3 times with the lysis buffer and eluted from the resin by heating at 95°C for 5 minutes in 1X protein loading buffer (350 mM Tris-Cl at pH 6.8, 5% glycerol, 2% SDS, 0.1 M DTT, and 0.002% bromophenol blue). Eluates were resolved by SDS-PAGE and were analyzed either by Western blotting using antibodies against the indicated proteins or by autoradiography. For the immunoprecipitation of FLAG-tagged proteins, lysates were prepared as described above except that Na-orthovanadate was omitted in lysis buffer. Immunoprecipitations were carried out with anti-FLAG M2 affinity agarose gel (Sigma-Aldrich) and the immune complexes were eluted with the FLAG peptide (Sigma-Aldrich) as previously described (4). Eluates were resolved by SDS-PAGE and were analyzed by Western blotting using antibodies against the indicated proteins.

Phosphoprotein purification

Phosphorylated proteins were purified using the PhosphoProtein Purification Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The protein content of the different fractions was analyzed by SDS-PAGE followed by Western blotting using antibodies against the indicated proteins.

Phosphatase treatment

For phosphatase treatment, HEK293T lysates were prepared as described above except that NaF and Na-orthovanadate were omitted in lysis buffer. Cleared lysates were incubated for one hour at 37°C with 0.2 units of Calf Intestine Alkaline Phosphatase (Fermentas) per μL of lysate.

Two-dimensional gel electrophoresis

Two-dimensional gel electrophoresis was performed according to the O'Farrell protocol (32) with minor modifications. Protein samples were prepared by mixing HEK293T cell lysates with 1 volume of sample buffer (6.64% Nonidet P-40, 16.6% β -mercaptoethanol, 8.28% Ampholytes pH range 3-10 [Fluka]) and 0.1 volume of BEN buffer (200 mM Bicine pH 9, 50 mM EGTA, 5 M NaCl). The preparation was then completed by dissolving 1mg of Urea per μL of sample. Protein samples were separated on the first dimension by nonequilibrium pH gradient electrophoresis (NEPHGE) using tube gels containing 4% Ampholines pH range 3-10 and 1% Ampholines pH range 6-9.(Fluka) Gels were run at 500 V for 5.5 hours. Gels were then equilibrated in SDS sample buffer (32) for 20 minutes and run on SDS-PAGE for the second dimension.

Immunopurification and mass spectrometry analysis

HEK293T cells were treated with 50 nM of Calyculin A (Cell Signaling) for 30 minutes before being harvested and lysed as describe above. Large scale immunopurification of Stau1-FLAG was carried out by incubation of cleared lysates with anti-FLAG M2 affinity agarose gel for two hours at 4°C. The agarose beads were washed three times in Tris-buffered saline (TBS) (10 mM Tris-Cl pH 7.4 and 150 mM NaCl), once in high-salt TBS (10 mM Tris-Cl pH 7.4 and 1 M NaCl) to remove proteins interacting with

Stau1-FLAG and then once in TBS. 3% of the beads were eluted in 1X protein loading buffer without DTT and the purity of the preparation was determined by SDS-PAGE separation of the eluate followed by silver staining coloration of the gel using Silver Stain Plus Kit (BioRad Laboratories).

For mass spectrometry analysis, the remaining beads were reduced in 10 mM TCEP (Fisher Scientific)/50 mM ammonium bicarbonate (Sigma) for 1 hour at 37°C. 1 ug of Trypsin (Promega) was added and the digestion was performed overnight at 37°C. The supernatant was collected and the beads were washed 3 times with 50 µl of 50 mM ammonium bicarbonate. The washing aliquots were pooled with the supernatant and the solution was dried down in a Speed-Vac (Thermo Fisher). Phosphopeptide enrichment was performed as described elsewhere (29). After enrichment, the phosphopeptide elution solution was dried down and resolubilized in acetonitrile 5%/formic acid (FA) 0.2%. The sample was analysed on an Eksigent nano-LC sytem coupled to a LTQ-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher). The sample was first loaded on a C18-precolum (5 mm × 360 µm) at 10 µl/min and eluted on an home-made C18 analytical column (10 cm × 150 µm) with a 56-min gradient from 10–60% acetonitrile (0.2% FA) at 600 nanoliter/min. Each full MS spectrum was acquired in the Orbitrap (resolution 60000) and followed by three MS/MS spectra (four scan events), where the three most abundant multiply charged ions were selected for MS/MS sequencing. Tandem MS experiments were performed using collision-induced dissociation in the linear ion trap. The data were processed using the Mascot (Matrix Science) search engine.

Neuronal cells culture, transfections and microscopy

Rat primary hippocampal neurons were dissected from E18-E19 Sprague-Dawley embryos (Charles River Laboratories) and were dissociated in HBSS supplemented with 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate and penicillin/streptomycin. 50×10^3 neurons were

plated on #1 18 mm glass cover-slips coated with 30 $\mu\text{g/ml}$ poly-d-lysine (Sigma-Aldrich) and 3 $\mu\text{g/ml}$ laminin (Sigma-Aldrich) for 2h and equilibrated in DMEM supplemented with 10% FBS (PAA laboratories) the previous day. The neurons were incubated in NeurobasalTM (Invitrogen) supplemented with B-27 (Invitrogen), 2 mM Glutamax (Invitrogen) and 25 μM glutamate and incubated at 37 °C with 5% CO₂. At 3 days in-vitro (DIV 3), half the media was changed to a maintenance media without glutamate. Neurons were then transfected at DIV 5 with 1.0 μg of plasmid and 2 μg of Lipofectamine 2000 in 100 μl of plain Neurobasal for 10 min, then re-incubated at 37 °C, 5% CO₂ for 24 h. Neurons were fixed with 4% PFA in PBS at room temperature for 30 min, then washed twice with PBS and quenched with 1 M glycine in PBS 0.1% Triton-X100. Stau1 mutants were stained for 2 h at room temperature (RT) with anti-flag antibodies (1: 2 500) in PBS-Tween. Then, the neurons were washed trice in PBS and incubated for 2 hours at room temperature with Donkey anti-mouse antibodies tagged with Alexa Fluor® 488 (1: 400) (Invitrogen) in PBS-Tween. The cover-slips were finally washed trice in PBS and mounted on slides in TDE 97% (Sigma-Aldrich) (40) and sealed with nail polish. Pictures were taken on an Olympus Flowview 300 confocal mounted on an IX71 microscope with optimal size confocal aperture and a 60X Plan Apo N.A 1.4 oil objective. The images' gamma value was set to 1.5 and brightness and contrast were adjusted to the same value in ImageJ.

Luciferase assays

Luciferase assays to test Stau1 role in translation de-repression were performed as described previously (8) with minor modifications. HEK293T cells were co-transfected using Lipofectamine 2000 with 100 ng of plasmid expressing SBS-Rluc and with 500 ng of the indicated Stau1-FLAG expressors before luciferase activity measurements.

2.2.5 Results

Stau1 is phosphorylated *in vivo*

Since the RNA-binding protein Stau1 play several roles in post-transcriptional control of gene expression, we hypothesized its multiple functions may be regulated by phosphorylation. HEK293T cells were thus cultured with [³²P] orthophosphate to investigate Stau1 phosphorylation in intact cells. Endogenous Stau1 was immunoprecipitated with anti-Stau1 antibodies and isolated proteins were separated by SDS-PAGE electrophoresis. Detection of ³²P-labelled proteins by autoradiography revealed a 55kDa phosphoprotein that was absent from the pre-immune serum immunoprecipitate (Fig. 1A, lane 1 and 2), suggesting that endogenous Stau1⁵⁵ is phosphorylated *in vivo*. In order to confirm this supposition, metabolic labelling experiments were repeated with cells overexpressing either wild -type or a truncated form of Stau1⁵⁵-HA₃ and immunoprecipitations were performed using anti-HA antibodies. Visualization of a radiolabelled protein migrating at the size expected for Stau1⁵⁵-HA₃ provided further evidence for Stau1 phosphorylation (Fig.1A, lane 3). In addition, the mutant consisting of the two dsRBDs of Stau1 competent in RNA-binding *in vitro* also incorporated [³²P] orthophosphate (Fig. 1A, lane 4), indicating the presence of at least one phosphoacceptor site in close proximity or within these domains.

To study the extent of Stau1 phosphorylation, HEK293T cell extracts were resolved by two-dimensional electrophoresis to separate proteins in function of both their isoelectric point and molecular mass. Western blot analysis led to the observation of one Stau1⁶³ and two Stau1⁵⁵ immunoreactive spots that may represent distinct phosphorylated forms of the protein (Fig. 1B, top). To test this assumption, proteins from cell extracts were dephosphorylated with alkaline phosphatase prior to their electrophoresis. In comparison to the control, alkaline phosphatase treatment strongly reduced the intensity of the signal for the most acidic form of Stau1⁵⁵ and concomitantly increased the detection of the most basic

form of the protein (Fig. 1B, bottom). This shift, consistent with the loss of one or more negatively charged phosphates, demonstrates that a significant proportion of Stau1⁵⁵ is phosphorylated *in vivo*. In contrast, the migration pattern exhibited by the less abundant Stau1⁶³ isoform was only slightly altered after dephosphorylation.

To further evaluate Stau1 phosphorylation status, HEK293T cell lysates were subjected to affinity chromatography to separate phosphorylated proteins from their unmodified counterparts. The resulting fractions were then analyzed by Western Blotting (Fig. 1C). Both Stau1⁵⁵ and Stau1⁶³ were detected with the unbound material as well as with the retained proteins, showing their phosphorylation. As expected, phosphorylated ERK 1/2 was found predominantly in the eluate whereas β -actin was exclusively observed in the flowthrough, attesting the specific purification of phosphorylated proteins. Altogether these results support the idea that the different isoforms of Stau1 are phosphorylated *in vivo*.

Stau1 phosphorylation occurs on multiple residues

As a first step towards understanding the relevance of Stau1 phosphorylation, we intended to examine its post-translational modifications using a proteomic approach. Attempts to recover sufficient amounts of endogenous Stau1 for mass spectrometry analysis were unsuccessful (data not shown). Therefore, a stable HEK293T cell line expressing Stau1⁵⁵-FLAG at levels similar to that of the endogenous protein was generated to facilitate large scale isolation of Stau1⁵⁵ (Fig. 2A). Cells were pre-treated with the membrane-permeable serine/threonine phosphatase inhibitor Calyculin A to prevent protein dephosphorylation during sample processing and FLAG-tagged Stau1⁵⁵ was subsequently immunoprecipitated from cell extracts. The immune complexes were submitted to stringent washes to eliminate Stau1⁵⁵-interacting proteins as well as contaminants. This strategy enabled the purification of Stau1⁵⁵-FLAG to near homogeneity as assessed by SDS-PAGE separation and silver staining of the isolated material (Fig. 2B). The identification of

Stau1⁵⁵-FLAG as the band migrating at 55 kDa was confirmed by western blotting (data not shown).

In order to locate Stau1⁵⁵ phosphorylated amino acids, the immunopurified preparation was digested with trypsin directly on the beads. Tryptic phosphopeptides were enriched on a TiO₂ microcolumn to maximize the detection of phosphorylation events that may occur on a small fraction of the protein. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of the resulting mixture uncovered three distinct phosphorylation sites from the sequencing of four peptides presented in Table I. Mapping of these residues within the primary structure of Stau1⁵⁵ positioned serine 95 (S95) in the vicinity of dsRBD3 while threonine 291 (T291) and serine 309 (S309) lie in the N-terminal part of the TBD (Fig. 3, top). Comparison of various mammalian Stau1 orthologues revealed an almost complete sequence identity for regions encompassing these sites (Fig. 3, bottom). Furthermore, some conservation of the threonines/serines corresponding to T291/S309 was noticed in Stau1 proteins from other non-mammalian chordates. The conservation among species of the sites found to be phosphorylated in human Stau1⁵⁵, along with their neighboring amino acids, possibly denotes a regulatory function maintained throughout evolution.

Mutation of phosphorylation sites has no effect on Stau1 subcellular distribution in neurons

To gain insight into the role(s) of Stau1 phosphorylation, we introduced point mutations in a Stau1⁵⁵-FLAG expressor so that S95, T291 and S309 were either converted into alanines to disrupt phosphorylation sites or into aspartic acids to mimic constitutive phosphorylation of the protein. The different constructs were then transiently transfected in HEK293T cells and their expression was evaluated by Western blotting (Fig. 4a). FLAG-tagged mutants were produced at levels comparable to those of wild-type (WT) Stau1⁵⁵,

suggesting that the phosphorylation status of these sites does not have a major influence on the abundance of Stau1.

It has been reported that Stau1 is an essential factor for the dendritic localization of specific mRNAs in hippocampal neurons (17, 44). Accordingly, Stau1 is a constituent of mRNPs complexes travelling in dendrites, a process depending on the microtubule network (18, 21). Interestingly, two of the phosphorylation sites identified above reside within Stau1 TBD. Even though the involvement of this domain for the neuronal trafficking of Stau1 was never directly examined, it is noteworthy that earlier studies demonstrated a requirement for the TBD in the dendritic localization of another member of the Staufen family, Stau2 (15, 41). Moreover, pretreatment of neuronal cells with a mitogen-activating protein kinase inhibitor was shown to block the stimulation-induced increase of Stau2 dendritic localization, implying that phosphorylation events may control its transport (15). As Stau1 and its paralogue Stau2 share common characteristics, we speculated that the dendritic targeting of Stau1 in neuronal cells may be modulated by its phosphorylation. To address this question, immunofluorescence microscopy experiments using anti-FLAG antibodies were conducted on rat hippocampal neurons expressing either WT, non-phosphorylatable or phosphomimetic FLAG-tagged forms of human Stau1⁵⁵. In agreement with previous observations (17, 21, 44), transfected Stau1⁵⁵ (WT) displayed a strong signal in the cell body, but also appeared as puncta in dendrites (Fig. 4b). Likewise, all the mutants presented a dendritic pattern undistinguishable from that of the wild-type protein. Hence, this result indicates that the phosphorylation of S95, T291 or S309 may not act in the basal neuronal transport of Stau1.

Phospho-mimetic or non-phosphorylatable mutations do not affect Stau1 translation-promoting activity

In addition to its involvement in mRNA localization, Stau1 participates in other aspects of post-transcriptional control of gene expression. Notably, previous work established a role for the protein in translation facilitation (8). In particular, it was shown that Stau1⁵⁵ recruitment to double-stranded structures located in the 5'UTR of various reporter transcripts relieved the translational block induced by these structures. To verify whether this activity is subjected to regulation by Stau1⁵⁵ phosphorylation, functional assays described before (8) were reproduced with the phosphorylation sites mutants to estimate their capacity to de-repress the translation of a reporter mRNA. To this end, a transcript coding for Renilla reniformis luciferase (Rluc) and harbouring a Stau1-binding site (SBS) in its 5'UTR (Fig. 4C, top) was co-expressed in HEK293T cells with either WT Stau1⁵⁵ or the indicated point mutants fused to a FLAG epitope. The reporter construct was also co-transfected with the empty vector to determine the basal expression of luciferase in the absence of Stau1⁵⁵ transfection. Luciferase activity was then quantified as an indicator of translation of the reporter (Fig. 4C, bottom). When compared to the control, Stau1⁵⁵-FLAG overexpression expectedly stimulated SBS-Rluc translation. Similarly, expression of either the phosphomimetic or the non-phosphorylatable forms of Stau1⁵⁵-FLAG upregulated luciferase production, demonstrating that the modification of these sites has no significant effect on the ability of the protein to increase translation efficiency.

Phospho-mimetic mutations of Thr 291 and Ser309 preclude Stau1 interaction with the NMD factor UPF1

Stau1 functions in a third pathway related to mRNA metabolism. It has been demonstrated that transcripts bound by Stau1⁵⁵ downstream of their termination codon can be targeted to degradation (11, 12, 19, 20). This process, defined as Stau1-mediated mRNA decay (SMD), depends on the direct recruitment of the nonsense-mediated decay factor UPF1 by Stau1 and occurs via its TBD (11, 19). Considering that this domain was found to

be flanked by two phosphorylated residues (Fig. 3), we explored the possibility that Stau1 modification controls its association with UPF1. Myc-UPF1 and different Stau1⁵⁵-FLAG constructs were thus co-expressed in HEK293T (Fig. 5, left panel) with the objective to probe the phosphorylation site mutants for their binding to UPF1. Immunoprecipitations using anti-FLAG antibodies were subsequently performed with cell extracts and Western blot analysis of the immune complexes revealed that each Stau1⁵⁵-FLAG protein was precipitated with a similar efficiency (Fig. 5, right panel). Myc-UPF1, which could not be detected in the negative control (vector), was found to co-purify with WT as well as with both S95-mutated forms of Stau1⁵⁵-FLAG. Strikingly, phosphomimetic mutations in Stau1 TBD (T291D, S309D) almost abolished the co-purification of Myc-UPF1 in comparison to conditions where the corresponding non-phosphorylatable mutants were employed (T291A, S309A). Antibodies directed against the ribosomal protein S6 served as a positive control for co-precipitation with Stau1⁵⁵ since it is well documented that Stau1 is associated to ribosomes (3, 8, 22, 25, 30, 35, 42, 43, 45). The uniform co-precipitation of S6 with all Stau1⁵⁵-FLAG variants indicates that the introduction of a negative charge at positions 291 and 309 specifically affects the interaction between Stau1 and UPF1. This result suggests that Stau1⁵⁵ phosphorylation interferes with UPF1-binding and argues for the existence of a mechanism modulating SMD through the modification of Stau1⁵⁵.

Association between Stau1 and UPF1 is cell cycle-regulated

It was previously proposed that Stau1 abundance may also influence SMD efficiency (11, 19). Recently, a global proteomic analysis provided evidence that Stau1 is present in higher amounts in mitotic cells as compared to G₁ cells (6). Likewise, we observed variations of Stau1 protein levels during the cell cycle and we confirmed that Stau1 expression peaks in early mitosis (K. Boulay, W. Viranaicken and L. DesGroseillers, unpublished observations). Therefore, to extend our findings on potential mechanisms of SMD regulation, we aimed to characterize Stau1-UPF1 association during the cell cycle.

HEK293T cells co-expressing Myc-UPF1 and Stau1⁵⁵-FLAG were either grown asynchronously or were blocked in prometaphase using nocodazole. As controls, cells expressing Myc-UPF1 alone or cells co-expressing Myc-UPF1 and the unrelated protein FLAG-Cdc20 were submitted or not to the same treatment. The expression of the transfected constructs was visualized by Western blot analyses of cell extracts, which also attested the synchronization of the nocodazole-treated cells as judged by the appearance of the early mitotic marker MPM2 (Fig. 6, left). FLAG-tagged proteins were next immunoprecipitated using anti-FLAG antibodies. Despite the successful isolation of both FLAG-Cdc20 and Stau1⁵⁵-FLAG, Myc-UPF1 was co-purified exclusively with Stau1⁵⁵-FLAG (Fig. 6, right). Surprisingly, cell synchronization markedly decreased the amounts of UPF1 detected in the immune complex while constant quantities of the ribosomal protein L7 were co-precipitated in both conditions. This result suggests that the accumulation of endogenous Stau1 at the onset of mitosis does not correlate with an increased UPF1-binding capacity and support the notion that processes other than modulating Stau1 abundance control its interaction with UPF1.

2.2.6 Discussion

The concept that Stau1 is a multifunctional post-transcriptional regulator of gene expression is now substantiated by several reports. However, there is only little information about mechanisms that may control its distinct RNA-related activities. In this study, we present compelling data demonstrating that most of endogenous Stau1 is phosphorylated *in vivo*. The presence of this modification is further confirmed by the identification of three phosphoresidues within Stau1⁵⁵. Importantly, we provide a first line of evidence indicating that the phosphorylation of two of these sites potentially modulates SMD by inhibiting Stau1 association with UPF1. Indeed, our finding that Stau1/UPF1 interaction decreases in mitosis suggests that SMD is a regulated process.

Stau1 is a phosphoprotein

The first indication that Staufen proteins can be phosphorylated came from work in *Xenopus* where a shift in the electrophoretic mobility of XStau1 and XStau2 during meiotic maturation was abolished either in the presence of MAPK inhibitors or after λ phosphatase treatment (1). However, neither the identity of the phosphoresidues nor the relevance of this modification was determined. Here, we clearly established with several approaches that like *Xenopus* Stau1, human Stau1 is a phosphoprotein (Fig. 1). Moreover, the mass spectrometry-based strategy we used allowed the detection of S95, T291 and S309 phosphorylation (Table I). Interestingly, during the course of our work, S309 phosphorylation was also reported in a global phosphoproteomic study (10).

In order to estimate whether the involvement of MAPKs in Stau1 modification is conserved among species, a search using the Scansite algorithm at low stringency (33) was performed to predict the nature of the kinases that could phosphorylate the human orthologue. The analysis of Stau1 sequence reveals that both S95 and S309 reside in a

putative consensus site for Casein Kinase II (CKII) and that the former is also possibly modified by the DNA-dependent protein kinase (DNA-PK). T291 is a potential substrate of cyclin-dependent kinases (CDKs) 1 and 5 and of extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1). Intriguingly, T291, which is the only site predicted to be phosphorylated by a MAPK, does not have an equivalent in *Xenopus* Stau1 (Fig. 3). It is worth mentioning that *Xenopus* Stau1 modification was observed in oocytes during early meiotic maturation whereas we identified phosphorylation sites in human Stau1 immunopurified from asynchronous HEK293T cells. Similarly, the phosphorylation of two tyrosines (Y371, Y404) in Stau1 was described in extracts from Src-transformed mouse fibroblasts, but not in the corresponding untransfected cells (26). Even though our mass spectrometry studies were done with a transformed human cell line, we failed to detect phosphorylation of Y380, which is equivalent to Y371 in the mouse sequence. Y404 is not conserved in human Stau1. Thus, the phosphorylation status of Stau1 may be cell type and/or cell cycle-dependent. In addition, specific stimuli may trigger phosphorylation events on Stau1 that does not occur under basal growth conditions. Nevertheless, the signalling cascades and more precisely the kinases that are responsible for human Stau1 modification remain to be identified experimentally.

We suspect that the phosphorylation map we provided is incomplete due to the use of trypsin to produce peptides for mass spectrometry analysis. Trypsin digests proteins on the C-terminal side of lysines and arginines and because these residues are very abundant within Stau1, peptides too small for detection were presumably generated. Hence, three phosphopeptides out of the four that were sequenced resulted from a partial proteolysis (Table 1). Otherwise, T291 phosphorylation would have never been observed considering it is positioned between two nearby lysines. Also in agreement with this theory, a preliminary mass spectrometry analysis of Stau1⁵⁵-YFP in which phosphopeptide enrichment was omitted covered only 53% of Stau1 sequence (data not shown). The use of multiple proteases with different cleavage specificities could therefore improve Stau1 coverage and may lead to the discovery of new phosphorylation sites.

In numerous cases, phosphorylation of RNA-binding proteins was shown to modulate their interaction with RNA. For instance, Jammi et al proposed that PKR phosphorylation decreases its affinity for RNA (14). To our knowledge, it is the only report describing the influence of this modification on the RNA-binding properties of a dsRBD-containing protein. Although not measured directly, the RNA-binding activity of Stau1 phosphorylation site mutants towards the Arf1 SBS appears to resemble that of the wild-type protein. Since the capacity of Stau1 to bind RNA was determined earlier as a prerequisite to facilitate translation (8), this conclusion can be inferred from the observation that all the mutants comparably activated the translation of a SBS-bearing reporter transcript (Fig. 4C). However, the possibility that the association of Stau1 with RNA is controlled by the modification of the known phosphoacceptor sites in the protein as well as others yet to be identified is not excluded. Notably, multiple residues are predicted to be kinases substrates by Scansite in the region encompassing dsRBD3 and 4, which are the determinants of dsRNA-binding. In particular, potential target sites for protein kinase A (PKA) and various isoforms of protein kinase C (PKC) are well represented across these two domains. Furthermore, Stau1 was found to interact with 7% of the HEK293T transcriptome (9) and theoretically, its phosphorylation could affect a specific subset of bound mRNAs while having no impact on others. Immunoprecipitation of Stau1 phosphorylation site mutants followed by the identification of their associated mRNA by microarray analyses may help to test this hypothesis.

Stau1 phosphorylation may control SMD

In the light of our study, there is no clear indication that the post-translational modification of S95, T291 and S309 acts on Stau1 ability to bind RNA and our data rather argues for a role of Stau1 phosphorylation in modulating its interactions with protein partners. More precisely, the phosphomimetic mutation of Stau1 on either T291 or S309

substantially reduced the co-precipitation of UPF1 (Fig. 5). Given that these sites are located in the domain necessary for UPF1-binding (11, 19), our results strongly suggest that Stau1 phosphorylation blocks its association to UPF1. This interpretation is compatible with the previous demonstration that bacterially-expressed Stau1 and UPF1 co-purify *in vitro* (19), implying a direct interaction between the unmodified forms of both proteins. The simultaneous binding of Stau1 to the 3'UTR of a transcript and to UPF1 is sufficient to elicit mRNA decay and consequently, we speculate that the phosphorylation of Stau1 inhibits SMD. Further investigations are required to explore this scenario as it remains to be determined whether Stau1 phosphorylation induces the stabilization of SMD targets.

It was previously shown that during the myogenic differentiation of C2C12 mouse cells, the efficiency of SMD increases while that of nonsense-mediated decay (NMD) decreases (11, 20). This observation is consistent with the finding that Stau1 and UPF2, which are required for SMD and NMD respectively, compete for the same binding site on UPF1 (11). Because UPF2 amounts decline more than those of Stau1 as myogenesis proceeds, it was concluded that the efficiency of the two RNA degradation pathways depends on the relative abundance of both proteins (11). Our results suggest that an additional and complementary mechanism can regulate SMD. Hence, Stau1 TBD phosphorylation could trigger rapid and local changes in mRNA stability by reducing the levels of Stau1 that is competent to bind UPF1, independently of the absolute levels of either Stau1 or UPF2. Moreover, the phosphorylation-directed control of SMD might be reversible, regarding that Stau1 interacts with PP1 (31). Nonetheless, the functional significance of this association needs to be clarified.

The view that mechanisms distinct from modulating Stau1 levels may influence SMD is also supported by our finding that, even if Stau1 expression peaks in mitosis, its ability to recruit UPF1 unexpectedly diminishes (Fig. 6). In this context, the loss of Stau1 association to UPF1 could result from an increased NMD efficiency but since it was proposed that RNA decay is generally inhibited during cell division (37), this explanation

appears unlikely. Given that T291 is a predicted target of Cdk1 and S309 of CKII, two kinases which are active in mitosis (reviewed in (27)), it is tempting to speculate that Stau1 phosphorylation precludes its interaction with UPF1 in prometaphase. The generation of phosphospecific antibodies may help to delineate the timing of Stau1 phosphorylation in order to establish whether this event correlates with the decrease in UPF1-binding observed at the onset of mitosis.

Stau1 regulates diverse facets of mRNA metabolism and previous work indicated that the fate of its targets is at least determined by the position of the SBS in these transcripts. While Stau1 association to the 5'UTR of mRNAs enhances their translation (8), its binding to the 3'UTR of mRNAs promotes their degradation (11, 12, 19, 20). Regarding Stau1 functions, the present study suggests the existence of an additional layer of regulation and supports a model whereby phosphorylation specifically compromises SMD, without affecting the RNA-binding activity of Stau1 or its capacity to de-repress translation. Therefore, our results raise the interesting possibility that Stau1 acts as a downstream effector of signalling pathways to finely tune gene expression, via SMD. The evaluation of this proposition will be the focus of future work.

2.2.7 Acknowledgment

We thank Louise Cournoyer for help in the cell culture experiments and Wildriss Viranaicken for performing preliminary experiments. We also thank Dr Lynne Maquat and Dr Michele Pagano for providing plasmids and Dr Gerardo Ferbeyre for the generous gift of anti-phospho ERK 1/2 antibodies.

This work was supported by grants from the Natural Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Canadian Institutes for Health Research (CIHR) to LDG. KB and LF received studentships from the Fonds de Recherche en Santé du Québec and SDB was supported by a studentship from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

2.2.8 References

1. Allison, R., K. Czaplinski, A. Git, E. Adegbenro, F. Stennard, E. Houliston, and N. Standart. 2004. Two distinct Staufen isoforms in *Xenopus* are vegetally localized during oogenesis. *Rna* 10:1751-1763.
2. Bashir, T., N. V. Dorrello, V. Amador, D. Guardavaccaro, and M. Pagano. 2004. Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase. *Nature* 428:190-193.
3. Brendel, C., M. Rehbein, H. J. Kreienkamp, F. Buck, D. Richter, and S. Kindler. 2004. Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem J* 384:239-246.
4. Chatel-Chaix, L., K. Boulay, A. J. Mouland, and L. Desgroseillers. 2008. The host protein Staufen1 interacts with the Pr55Gag zinc fingers and regulates HIV-1 assembly via its N-terminus. *Retrovirology* 5:41.
5. Chatel-Chaix, L., J. F. Clement, C. Martel, V. Beriault, A. Gatignol, L. DesGroseillers, and A. J. Mouland. 2004. Identification of Staufen in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Mol Cell Biol* 24:2637-2648.
6. Dephoure, N., R. W. Howson, J. D. Blethrow, K. M. Shokat, and E. K. O'Shea. 2005. Combining chemical genetics and proteomics to identify protein kinase substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17940-17945.
7. Duchaine, T. F., I. Hemraj, L. Furic, A. Deitinghoff, M. A. Kiebler, and L. DesGroseillers. 2002. Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J Cell Sci* 115:3285-3295.
8. Dugre-Brisson, S., G. Elvira, K. Boulay, L. Chatel-Chaix, A. J. Mouland, and L. DesGroseillers. 2005. Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic Acids Res* 33:4797-4812.
9. Furic, L., M. Maher-Laporte, and L. DesGroseillers. 2008. A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes. *Rna* 14:324-335.
10. Gauci, S., A. O. Helbig, M. Slijper, J. Krijgsveld, A. J. Heck, and S. Mohammed. 2009. Lys-N and trypsin cover complementary parts of the phosphoproteome in a refined SCX-based approach. *Anal Chem* 81:4493-4501.
11. Gong, C., Y. K. Kim, C. F. Woeller, Y. Tang, and L. E. Maquat. 2009. SMD and NMD are competitive pathways that contribute to myogenesis: effects on PAX3 and myogenin mRNAs. *Genes Dev* 23:54-66.
12. Gong, C., and L. E. Maquat. 2011. lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature* 470:284-288.
13. Harashima, A., T. Guettouche, and G. N. Barber. 2010. Phosphorylation of the NFAR proteins by the dsRNA-dependent protein kinase PKR constitutes a novel

- mechanism of translational regulation and cellular defense. *Genes Dev* 24:2640-2653.
14. Jammi, N. V., and P. A. Beal. 2001. Phosphorylation of the RNA-dependent protein kinase regulates its RNA-binding activity. *Nucleic Acids Res* 29:3020-3029.
 15. Jeong, J. H., Y. J. Nam, S. Y. Kim, E. G. Kim, J. Jeong, and H. K. Kim. 2007. The transport of Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes involves kinesin motor protein and is modulated by mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurochem* 102:2073-2084.
 16. Jockers, R., A. Da Silva, A. D. Strosberg, M. Bouvier, and S. Marullo. 1996. New molecular and structural determinants involved in beta 2-adrenergic receptor desensitization and sequestration. Delineation using chimeric beta 3/beta 2-adrenergic receptors. *J Biol Chem* 271:9355-9362.
 17. Kanai, Y., N. Dohmae, and N. Hirokawa. 2004. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 43:513-525.
 18. Kiebler, M. A., I. Hemraj, P. Verkade, M. Kohrmann, P. Fortes, R. M. Marion, J. Ortin, and C. G. Dotti. 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.
 19. Kim, Y. K., L. Furic, L. Desgroseillers, and L. E. Maquat. 2005. Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* 120:195-208.
 20. Kim, Y. K., L. Furic, M. Parisien, F. Major, L. DesGroseillers, and L. E. Maquat. 2007. Staufen1 regulates diverse classes of mammalian transcripts. *Embo J* 26:2670-2681.
 21. Kohrmann, M., M. Luo, C. Kaether, L. DesGroseillers, C. G. Dotti, and M. A. Kiebler. 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.
 22. Krichevsky, A. M., and K. S. Kosik. 2001. Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron* 32:683-696.
 23. Lebeau, G., M. Maher-Laporte, L. Topolnik, C. E. Laurent, W. Sossin, L. Desgroseillers, and J. C. Lacaille. 2008. Staufen1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells. *Mol Cell Biol* 28:2896-2907.
 24. Lebeau, G., L. C. Miller, M. Tartas, R. McAdam, I. Laplante, F. Badaeux, L. DesGroseillers, W. S. Sossin, and J. C. Lacaille. 2011. Staufen 2 regulates mGluR long-term depression and Map1b mRNA distribution in hippocampal neurons. *Learn Mem* 18:314-326.
 25. Luo, M., T. F. Duchaine, and L. DesGroseillers. 2002. Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association. *Biochem J* 365:817-824.

26. Luo, W., R. J. Slebos, S. Hill, M. Li, J. Brabek, R. Amanchy, R. Chaerkady, A. Pandey, A. J. Ham, and S. K. Hanks. 2008. Global impact of oncogenic Src on a phosphotyrosine proteome. *J Proteome Res* 7:3447-3460.
27. Ma, H. T., and R. Y. Poon. 2011. How protein kinases co-ordinate mitosis in animal cells. *Biochem J* 435:17-31.
28. Mallardo, M., A. Deitinghoff, J. Muller, B. Goetze, P. Macchi, C. Peters, and M. A. Kiebler. 2003. Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2100-2105.
29. Marcantonio, M., M. Trost, M. Courcelles, M. Desjardins, and P. Thibault. 2008. Combined enzymatic and data mining approaches for comprehensive phosphoproteome analyses: application to cell signaling events of interferon-gamma-stimulated macrophages. *Mol Cell Proteomics* 7:645-660.
30. Marion, R. M., P. Fortes, A. Beloso, C. Dotti, and J. Ortin. 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.
31. Monshausen, M., M. Rehbein, D. Richter, and S. Kindler. 2002. The RNA-binding protein Staufen from rat brain interacts with protein phosphatase-1. *J Neurochem* 81:557-564.
32. O'Farrell, P. Z., H. M. Goodman, and P. H. O'Farrell. 1977. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12:1133-1141.
33. Obenauer, J. C., L. C. Cantley, and M. B. Yaffe. 2003. Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res* 31:3635-3641.
34. Ohashi, S., K. Koike, A. Omori, S. Ichinose, S. Ohara, S. Kobayashi, T. A. Sato, and K. Anzai. 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.
35. Orru, S., A. Aspesi, M. Armiraglio, M. Caterino, F. Loreni, M. Ruoppolo, C. Santoro, and I. Dianzani. 2007. Analysis of the ribosomal protein S19 interactome. *Mol Cell Proteomics* 6:382-393.
36. Parrott, A. M., M. R. Walsh, T. W. Reichman, and M. B. Mathews. 2005. RNA binding and phosphorylation determine the intracellular distribution of nuclear factors 90 and 110. *J Mol Biol* 348:281-293.
37. Ross, J. 1997. A hypothesis to explain why translation inhibitors stabilize mRNAs in mammalian cells: mRNA stability and mitosis. *Bioessays* 19:527-529.
38. Singh, M., D. Castillo, C. V. Patel, and R. C. Patel. 2011. Stress-induced phosphorylation of PACT reduces its interaction with TRBP and leads to PKR activation. *Biochemistry* 50:4550-4560.
39. Smith, N. L., and W. K. Miskimins. 2011. Phosphorylation at serine 482 affects stability of NF90 and its functional role in mitosis. *Cell Prolif* 44:147-155.

40. Staudt, T., M. C. Lang, R. Medda, J. Engelhardt, and S. W. Hell. 2007. 2,2'-thiodiethanol: a new water soluble mounting medium for high resolution optical microscopy. *Microsc Res Tech* 70:1-9.
41. Tang, S. J., D. Meulemans, L. Vazquez, N. Colaco, and E. Schuman. 2001. A role for a rat homolog of stauferin in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron* 32:463-475.
42. Thomas, M. G., L. J. Martinez Tosar, M. A. Desbats, C. C. Leishman, and G. L. Boccaccio. 2009. Mammalian Staufin 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly. *J Cell Sci* 122:563-573.
43. Thomas, M. G., L. J. Martinez Tosar, M. Loschi, J. M. Pasquini, J. Correale, S. Kindler, and G. L. Boccaccio. 2005. Staufin recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes. *Mol Biol Cell* 16:405-420.
44. Vessey, J. P., P. Macchi, J. M. Stein, M. Mikl, K. N. Hawker, P. Vogelsang, K. Wieczorek, G. Vendra, J. Riefler, F. Tubing, S. A. Aparicio, T. Abel, and M. A. Kiebler. 2008. A loss of function allele for murine Staufin1 leads to impairment of dendritic Staufin1-RNP delivery and dendritic spine morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:16374-16379.
45. Villace, P., R. M. Marion, and J. Ortin. 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.
46. Wickham, L., T. Duchaine, M. Luo, I. R. Nabi, and L. DesGroseillers. 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.

2.2.9 Figure legends

Figure 1. Stau1 is a phosphoprotein. (A) Analysis of Stau1 phosphorylation *in vivo* by metabolic labelling of HEK293T cells. Untransfected cells (-) and cells transiently transfected with plasmids coding for HA-tagged wild type Stau1⁵⁵ (Stau1⁵⁵-HA₃, amino acids 1-496) or a truncated Stau1 mutant (dsRBD3/4-HA₃, amino acids 89-289) were incubated with [³²P] orthophosphate. Cell extracts were immunoprecipitated (IP) with either the pre-immune serum (PI), anti-Stau1 (St1) or anti-HA (HA) antibodies. Immune complexes were resolved on a SDS-PAGE and phosphorylated proteins were detected by autoradiography. Arrows point to the position of endogenous or HA-tagged Stau1 and asterisks mark nonspecific bands **(B)** Analysis of Stau1 isoforms by two-dimensional gel electrophoresis. HEK293T cell extracts were incubated in the absence (-) or in the presence of alkaline phosphatase (CIAP) for 1 h at 37°C. Extracts were then separated by nonequilibrium pH gradient electrophoresis (NEPHGE) in the first dimension and by SDS-PAGE in the second dimension. Stau1 isoforms were visualized by Western blotting using anti-Stau1 antibodies. **(C)** Evaluation of Stau1 phosphorylation by affinity purification. Phosphorylated proteins from HEK293T cell extracts were isolated with a phosphoprotein affinity column. The presence of Stau1 isoforms (Stau1⁵⁵ and Stau1⁶³) in the total extract (Input), in the unphosphorylated fraction (Flow-through) and in the phosphorylated fraction (Eluate) was monitored by Western blotting using anti-Stau1 antibodies. The efficiency of the separation was estimated by Western blotting using anti-β-Actin and anti-pERK antibodies as controls for unphosphorylated and phosphorylated proteins, respectively.

Figure 2. Purification of Stau1⁵⁵-FLAG for mass spectrometry analysis. (A) Establishment of a stable HEK293T cell line expressing low levels of Stau1⁵⁵-FLAG. Stable expression of Stau1⁵⁵-FLAG was characterized by Western Blotting using anti-FLAG (top) and anti-Stau1 (bottom) antibodies. As a control, a stable cell line with the empty vector was generated. **(B)** Purification of Stau1⁵⁵-FLAG. Stau1⁵⁵-FLAG was

immunoprecipitated from the stable cell line described in (A) with anti-FLAG resin. An aliquot of the resin (3%) was eluted with non-reducing SDS loading buffer. The purity of the preparation was evaluated by SDS-PAGE separation and silver staining detection of the isolated proteins. The remaining fraction of the resin was subjected to mass spectrometry analysis as described in materials and methods.

Figure 3. Distribution and conservation of phosphorylation sites in Stau1. (Top) Schematic representation of the location of the phosphorylation sites identified by mass spectrometry relative to Stau1⁵⁵ functional domains. Black boxes and white boxes represent double-stranded RNA-binding domains (dsRBD) with or without demonstrated double-stranded RNA-binding activity *in vitro*, respectively. The grey box depicts the tubulin-binding domain (TBD). **(Bottom)** Amino acid sequence alignment showing conservation of Ser95, Thr291 and Ser309 in different species. Numbers indicate the position of the first amino acid in the human sequence. The phosphorylated sites in human Stau1⁵⁵ and the corresponding residues in Stau1 homologs are shaded in light grey.

Figure 4. Characterization of phospho-mimetic or non-phosphorylatable point mutants of Stau1⁵⁵. (A) Expression of FLAG-tagged Stau1⁵⁵ constructs. HEK293T cells were transiently transfected with plasmids coding for FLAG-tagged wild type (WT) Stau1⁵⁵, non-phosphorylatable (S/T→A) or phospho-mimetic (S/T→D) point mutants as indicated. Cell extracts were analyzed by Western blotting using anti-FLAG and anti-β-Actin antibodies. **(B)** Stau1⁵⁵ somatodendritic localization in neurons is not affected by non-phosphorylatable or phospho-mimetic mutations. Rat hippocampal neurons were transfected with plasmids coding for either wild-type (WT) Stau1⁵⁵-FLAG₃ or the indicated point mutants. Twenty-four hours post-transfection, cells were fixed and stained with primary anti-FLAG and secondary Alexa Fluor 488-labeled antibodies. The localization of the fusion proteins was visualized by confocal fluorescence microscopy. Scale bars: 10μm. Insets under the images show a magnification of the dendrites boxed in red. Scale bars:

2 μ m. (C) Stau1⁵⁵ ability to increase translation of 5'UTR structure-repressed mRNAs is not altered by mutation of its phosphorylation sites. Top: Schematic representation of the reporter transcript SBS-*Rluc*. The mRNA bears a Stau1-binding site (SBS) at its 5' end and code for the *Renilla reniformis* luciferase (*Rluc*) reporter protein. Bottom: HEK293T cells were co-transfected with a plasmid expressing the SBS-*Rluc* mRNA and either the indicated Stau1⁵⁵-FLAG constructs or the empty vector as a control. Cell extracts were prepared twenty-four hours post-transfection and translation of the reporter protein was evaluated by measurement of luciferase activity. The relative *Rluc* activity is presented as the mean of three independent experiments where the counts for the WT-transfected cells were arbitrarily adjusted to 1 to facilitate comparison. Standard deviation is shown by error bars.

Figure 5. Phospho-mimetic mutations T291D and S309D impair Stau1-UPF1-binding. HEK293T were co-transfected with a plasmid coding for Myc-UPF1 and either the indicated Stau1⁵⁵-FLAG constructs or the empty vector as a control. FLAG-tagged proteins were immunoprecipitated from cell extracts with anti-FLAG resin. The expression of the transfected constructs (left panels, Input) and the presence of the proteins in the immune complexes (right panels, IP FLAG) were monitored by Western blotting using anti-FLAG and anti-Myc antibodies. Anti-ribosomal protein S6 antibodies were also employed as a loading control for the input and as a positive control for the immunoprecipitation. Molecular weight markers are indicated on the left side of the panels.

Figure 6. Stau1 interaction with UPF1 is reduced in mitotic cells. HEK293T were co-transfected with a plasmid coding for Myc-UPF1 along with plasmids coding either for Stau1⁵⁵-FLAG or FLAG-Cdc20 or with the empty vector as indicated. Twenty-four hours post-transfection, cells were synchronized in prometaphase with a nocodazole block (+) or were left untreated (-). FLAG-tagged proteins were immunoprecipitated from cell extracts with anti-FLAG resin. The expression of the transfected constructs (left panels, Input) and

the presence of the proteins in the immune complexes (right panels, IP FLAG) were monitored by Western blotting using anti-FLAG and anti-Myc antibodies. Cell synchronization was confirmed with anti-MPM2 antibodies. Anti- β -Actin and anti-ribosomal protein L7 antibodies were employed as a loading control for the input and as a positive control for the immunoprecipitation, respectively. Molecular weight markers are indicated on the left side of the panels.

Table I. Phosphorylated Stau1 peptides detected by mass spectrometry. Immunopurified Stau1⁵⁵-FLAG was digested with trypsin and phosphopeptides were enriched using TiO₂ microtips prior to liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. Detected tryptic phosphopeptides are listed. Modified amino acids are underlined and their position in the 496 amino acids isoform of human Stau1 (Stau1⁵⁵) described in Wickham et al (532) is indicated.

2.2.10 Figures

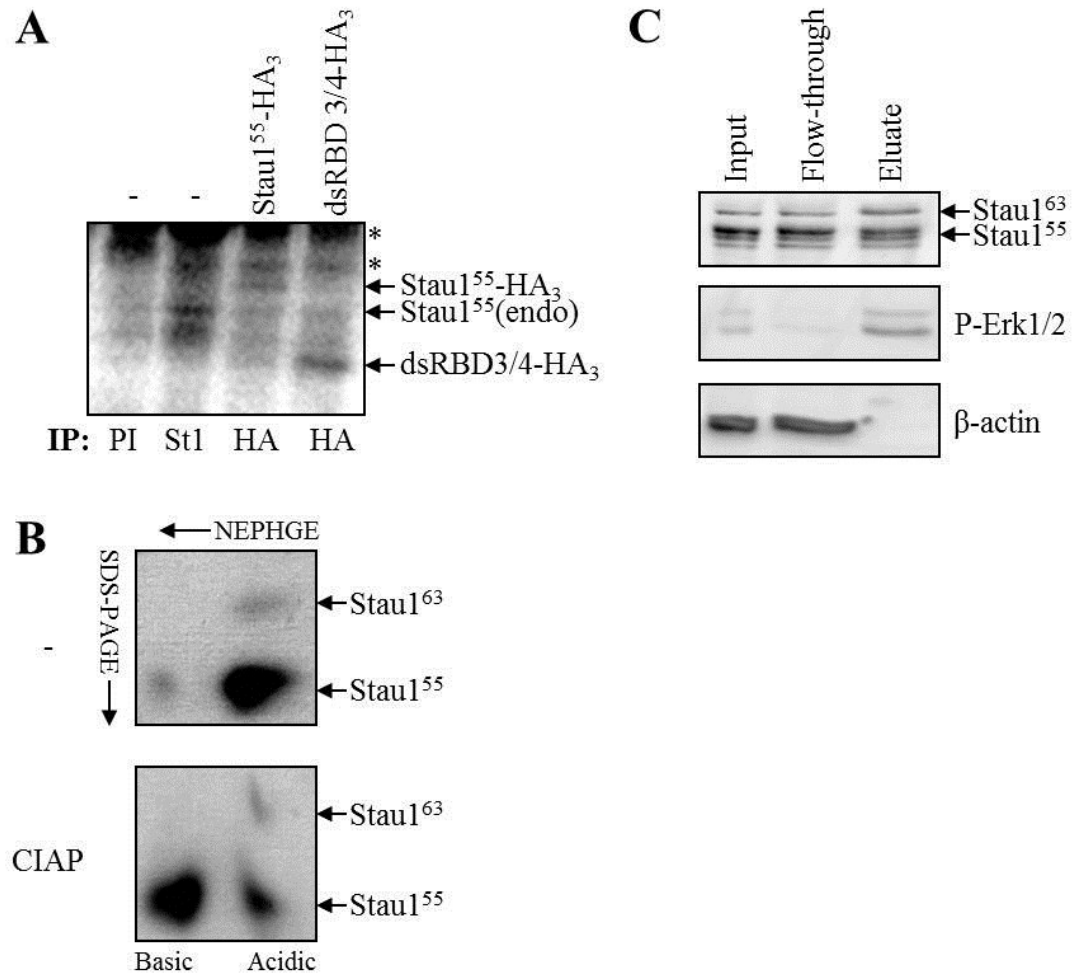


Figure 1

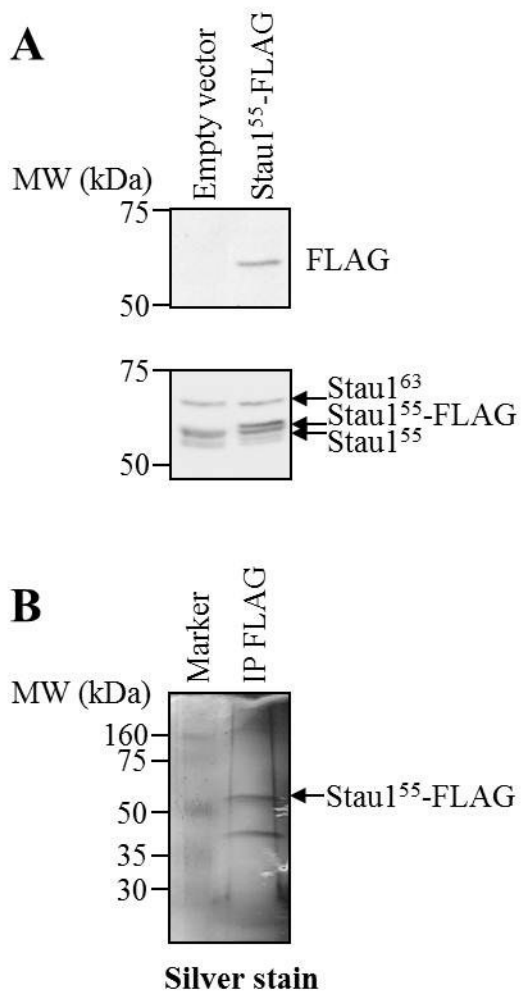


Figure 2

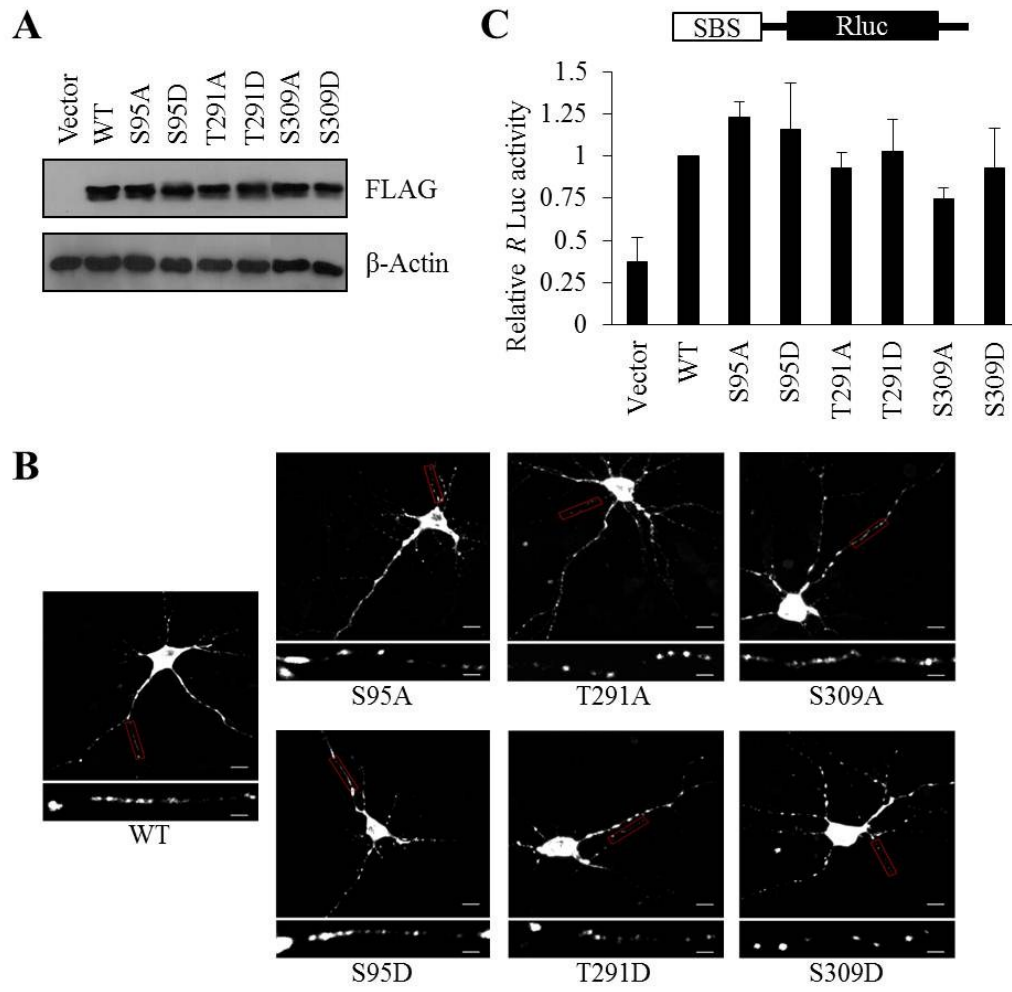
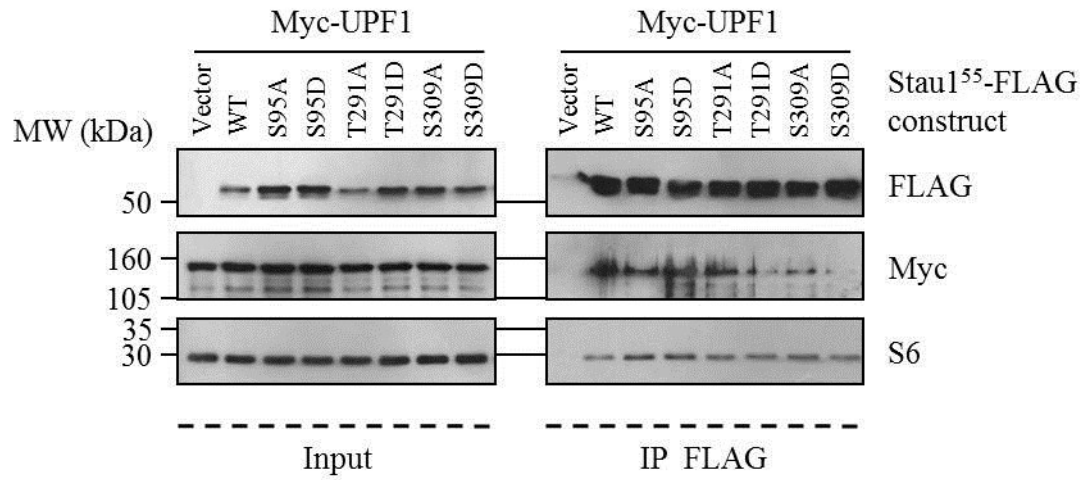


Figure 4

**Figure 5**

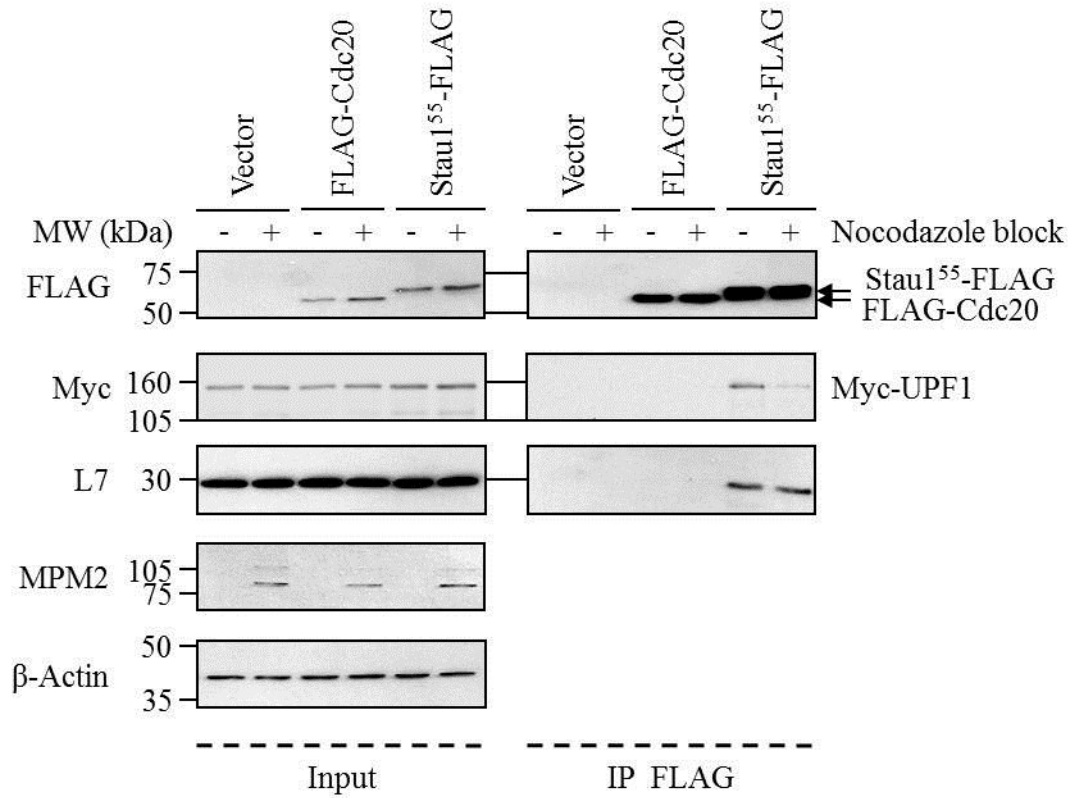


Figure 6

Table I

Peptide	Position of the modified amino acid
LEVNGRE <u>S</u> EEENLNK	S95
SEEK <u>T</u> PIK	T291
VTFE <u>P</u> GS <u>G</u> DENGTSNK	S309
KVTFE <u>P</u> GS <u>G</u> DENGTSNK	S309

3. Discussion

Au moment d'entreprendre les études réalisées dans le cadre de cette thèse, nous disposions de très peu d'informations concernant l'existence de mécanismes qui régissent les diverses fonctions moléculaires de Stau1. Ainsi, nos recherches ont permis de démontrer que Stau1 est soumis à différentes formes de contrôle requérant au moins deux types de modifications post-traductionnelles, soit l'ubiquitination et la phosphorylation. De plus, nos données mettent en évidence que la modulation de l'expression de Stau1 et de ses activités s'effectue en fonction du cycle de division cellulaire. Dans cette section, les résultats obtenus seront analysés en profondeur et leurs implications potentielles seront présentées. Il sera entre autres question des conséquences possibles du contrôle de Stau1 sur la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique et ce, surtout dans le contexte de la progression dans le cycle cellulaire. Un lien entre l'ubiquitination et la phosphorylation de Stau1 sera également proposé.

3.1 L'expression de Stau1 est régulée en fonction du cycle de division cellulaire

Dans le premier article présenté au chapitre 2, nous avons montré que l'expression de Stau1 fluctue au cours du cycle cellulaire (Figures 1 et 2 de la section 2.1.10). En effet, les niveaux protéiques de Stau1 augmentent en phase G_2 et atteignent un maximum en début de mitose. Par la suite, un déclin de la protéine est observé alors que les cellules complètent la division cellulaire et passent en phase G_1 . Cette variation dépendante du cycle cellulaire fut la première indication que l'expression de Stau1 est sujette à un contrôle temporel et nous a mené à la découverte d'un processus qui pourrait causer ultimement la dégradation de la protéine via le système ubiquitine-protéasome.

3.1.1 Régulation de l'abondance de Stau1 en sortie de mitose : mécanisme proposé

Grâce à nos travaux, nous avons établi que la fonctionnalité de l'APC/C est nécessaire à la diminution des niveaux de Stau1 en sortie de mitose. Ainsi, nos données suggèrent fortement que Stau1 soit un substrat de cette E3 ubiquitine ligase normalement active de la prométaphase jusqu'à la fin de la phase G₁. Dans le modèle que nous proposons, l'ubiquitination de Stau1 dirigée par l'APC/C modulerait son abondance en agissant comme un signal entraînant la déstabilisation d'une sous-population de la protéine par le protéasome. Nous supposons que suite à cette dégradation, les transcrits qui étaient associés à Stau1 soient libérés de la régulation post-transcriptionnelle imposée par ce dernier, tel que décrit pour d'autres protéines liant l'ARN (section 1.3.2.2).

3.1.1.1 Importance des co-activateurs de l'APC/C

Les répercussions sur les niveaux de Stau1 provoquées par la surexpression ou la déplétion des co-activateurs de l'APC/C Cdc20 et Cdh1, en plus de l'utilisation d'un dominant négatif de Cdh1 ont permis d'inférer que l'APC/C est responsable de la baisse d'expression de Stau1 en sortie de mitose (Figure 4 de la section 2.1.10). En ce sens, l'importante stabilisation de Stau1 générée par l'utilisation d'ARN interférents ciblant Cdh1 a mené à la conclusion que l'APC/C^{Cdh1} est un régulateur majeur de la protéine.

Il est intéressant de souligner que Cdc20 semble aussi affecter l'abondance de Stau1, quoique dans une moindre mesure. Ces résultats soulèvent des questions quant à l'implication de l'APC/C^{Cdc20} dans la dégradation mitotique de Stau1. À ce jour, un peu plus d'une centaine de substrats de l'APC/C ont été répertoriés (353) et la plupart d'entre eux sont envoyés à la dégradation par l'entremise d'un seul des deux cofacteurs du complexe enzymatique. Malgré cela, il est plausible que Stau1 soit reconnu à la fois par Cdc20 et Cdh1, tel qu'observé pour quelques-unes des cibles de l'APC/C (4, 40, 87, 101,

165, 173, 197, 254, 379, 472, 523, 553, 555). Stau1 possède un motif de type D box pouvant théoriquement être lié par les deux sous-unités activatrices, ce qui soutient cette hypothèse. À l'aide d'expériences de co-immunoprécipitation, nous avons d'ailleurs déterminé qu'à l'instar de Cdh1, Cdc20 s'associe à Stau1 (Figure 1).

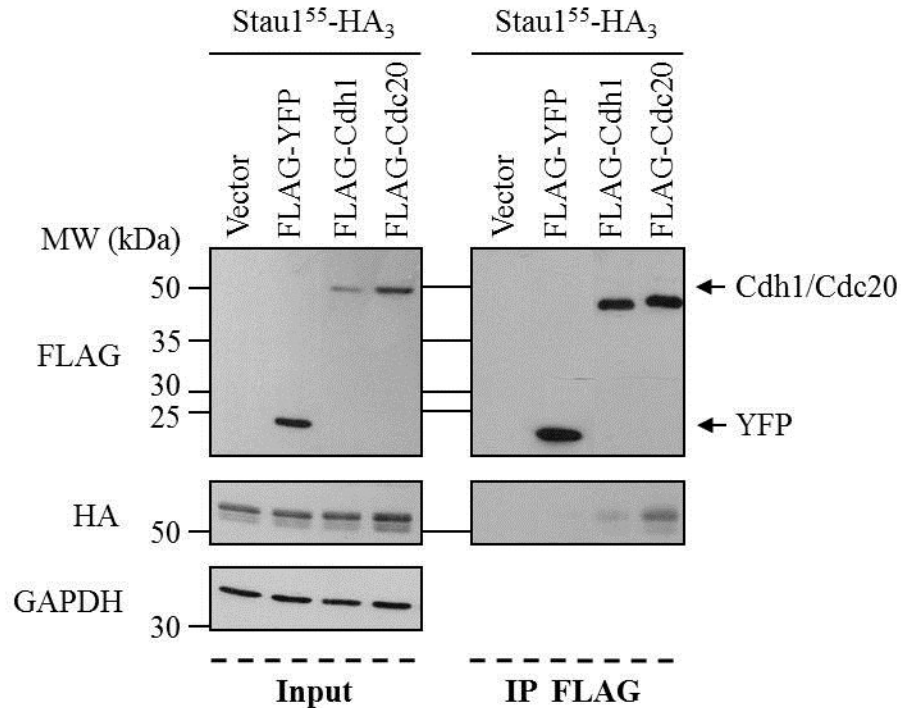


Figure 1 : Stau1 interagit avec Cdh1 et Cdc20. Des cellules HEK293T ont été co-transfectées avec les constructions indiquées. Des immunoprécipitations avec un anticorps dirigé contre l'épitope FLAG ont été faites sur les lysats des cellules récupérées 24 heures post-transfection et les protéines co-précipitées ont été analysées par immunobuvardage de type Western. Les masses (MW) des protéines du marqueur de poids moléculaire sont indiquées à gauche de la figure.

À première vue, il est surprenant que Stau1 co-précipite davantage avec Cdc20 qu'avec Cdh1 et cette observation pourrait se traduire par l'idée que Stau1 a une plus grande affinité pour Cdc20 que pour Cdh1. Or, compte tenu des conséquences attendues

suite à la liaison de Stau1 aux co-activateurs de l'APC/C, ce résultat pourrait également refléter que l'interaction entre Stau1 et Cdh1 cible plus efficacement la protéine à la dégradation, conférant ainsi un caractère plus transitoire à leur association. De ce fait, plusieurs scénarios sont envisageables afin de justifier que Cdc20, bien qu'interagissant avec Stau1, n'entraîne pas systématiquement sa dégradation.

Premièrement, il est possible que Stau1 interagisse avec Cdc20 alors qu'il n'est pas associé à l'APC/C. Cette supposition pourrait être aisément testée en effectuant des expériences de double immunoprécipitation telles que décrites à la figure 8 de l'article présenté en annexe. Par exemple, nous pourrions d'abord procéder à l'immunopurification de Stau1. Le matériel obtenu pourrait ensuite être soumis à une deuxième immunoprécipitation en utilisant un anticorps dirigé contre Cdc20. La présence ou non d'une protéine de l'APC/C dans l'isolat final nous indiquerait alors si les trois composants étudiés font partie d'un même complexe. Dans l'éventualité où l'interaction entre Stau1 et Cdc20 ne se produit pas dans un contexte de recrutement à l'APC/C, il serait alors intéressant d'élucider la fonction de cette association.

Deuxièmement, la période d'activité de l'APC/C^{Cdc20} est somme toute beaucoup plus courte que celle de l'APC/C^{Cdh1}. Cela pourrait signifier que l'APC/C^{Cdc20} entame l'ubiquitination de Stau1 qui est subséquentement poursuivie par l'APC/C^{Cdh1}, tel que suggéré pour certaines cibles de l'enzyme reconnues par les deux sous-unités activatrices (4, 197). Le rôle joué par Cdc20 dans la déstabilisation de Stau1 pourrait donc être évalué par l'utilisation d'ARN interférents ciblant Cdc20, en mesurant la cinétique de destruction de Stau1 durant la progression mitotique pour vérifier si elle s'en trouve modifiée. En effet, la plupart des essais visant à examiner l'implication de Cdc20 et Cdh1 dans la régulation des niveaux de Stau1 ont été effectués dans des cellules asynchrones. À l'avenir, afin de mieux comprendre la fonction de l'association entre Stau1 et les co-facteurs de l'APC/C, il sera primordial de refaire certains tests avec des extraits provenant de cellules synchronisées. Par exemple, la reprise de co-immunoprécipitations dans ces conditions

permettrait d'établir si l'interaction entre Stau1 et Cdc20/Cdh1 se produit principalement au cours de la période d'activité de l'APC/C.

Troisièmement, les substrats de l'APC/C ne sont pas tous égaux face à l'action du complexe enzymatique puisque leur dégradation se fait de façon séquentielle plutôt que simultanée (310). Afin d'expliquer cette hiérarchie, il a été proposé que divers motifs présents sur les cibles de l'APC/C puissent faciliter l'assemblage de chaînes de polyubiquitine avec des efficacités variables, contrôlant ainsi la rapidité de destruction des substrats les uns par rapport aux autres (422, 534). En suivant ce raisonnement, il est donc vraisemblable que la polyubiquitination de Stau1 par l'APC/C^{Cdc20} et la dégradation qui s'ensuit soient des processus lents, d'où l'effet plus modeste sur l'expression de Stau1 engendré par le cofacteur.

Enfin, Stau1 pourrait être protégé de la dégradation par des modifications post-traductionnelles. Par exemple, il a été montré que l'acétylation de la protéine BubR1 n'altère pas son interaction avec Cdc20 mais bloque toutefois sa dégradation (87). À cet égard, il est pertinent de mentionner que l'acétylation de la lysine 189 de Stau1⁵⁵ a été rapportée dans une étude de protéomique à large échelle (88). Toutefois la signification biologique de cet événement n'a pas été étudiée. Il serait donc intéressant de muter ce résidu pour voir si sa modification a le potentiel d'influencer la stabilité de la protéine en empêchant sa reconnaissance par Cdc20 et/ou Cdh1.

3.1.1.2 Motifs impliqués dans la reconnaissance de Stau1 par l'APC/C

Cdc20 et Cdh1 exercent deux rôles distincts au sein de l'APC/C. D'une part, ils sont indispensables à l'activation de l'E3 ubiquitine ligase et d'autre part, ils participent au recrutement des substrats qui sont par la suite ubiquitinés par le complexe. De concert avec une des protéines composantes du cœur de l'APC/C, soit APC10, ils peuvent d'ailleurs former un corécepteur à motif de type D box (66, 105, 238).

En scrutant avec attention la séquence en acides aminés de Stau1, un seul signal de destruction classiquement reconnu par l'APC/C et ses co-activateurs est apparent, soit une D box qui se situe entre le TBD et le dsRBD5 de la protéine (Figure 5 de la section 2.1.10). Ce motif semble fonctionnel car la surexpression de Cdh1 n'a aucun impact sur les niveaux protéiques d'un mutant de Stau1 où le consensus de la D box est aboli (Figure 5 de la section 2.1.10). Nous avons donc refait des expériences de co-immunoprécipitation en utilisant ce dernier mutant afin de vérifier si l'association de Stau1 à l'APC/C dépend de l'intégrité de la D box. À notre grand étonnement, la mutation de la D box ne modifie en rien la capacité de Stau1 à co-précipiter Cdh1 (Figure 2) et Cdc20 (données non-montrées). Un phénomène similaire a déjà été relevé chez la levure *S. cerevisiae* alors que la mutation d'une D box importante pour la déstabilisation de la cycline mitotique Clb2p par l'APC/C n'empêche pas cette protéine d'interagir avec les sous-unités activatrices de l'enzyme (65).

Ce résultat inattendu nous a poussés à localiser la ou les régions de Stau1 essentielles à sa reconnaissance par les sous-unités activatrices de l'APC/C et ce en employant plusieurs mutants de délétion de la protéine dans notre essai de co-immunoprécipitation. Ces tests ont permis de déterminer que les 88 premiers acides aminés de Stau1, parmi lesquels se trouve le dsRBD2, contiennent les éléments nécessaires à son interaction avec Cdh1 et Cdc20 (Figure 2, données non-montrées). L'idée que la portion N-terminale de la protéine soit importante pour sa régulation par l'APC/C est soutenue par l'observation qu'en absence de cette région, Stau1 n'est pas affecté par la surexpression de Cdh1 (données non-montrées). De plus, des données préliminaires obtenues dans le laboratoire ont révélé qu'alors que l'ubiquitination de la protéine jaune fluorescente (yellow fluorescent protein, YFP) n'est normalement pas visible, la fusion du N-terminal de Stau1 à cette dernière entraîne son ubiquitination (Wildriss Viranaicken et Luc DesGroseillers, données non-publiées). La description d'un nouveau motif de dégradation lié à l'APC/C constitue en soi une découverte importante qui mériterait d'être approfondie. En effet, vu que les séquences protéiques généralement reconnues par l'APC/C n'englobent que

quelques acides aminés, il serait approprié d'affiner la cartographie du déterminant minimal de Stau1 requis pour son interaction avec les co-activateurs de l'enzyme et sa déstabilisation subséquente. Cet objectif pourrait être facilement atteint en générant plusieurs mutants de Stau1 arborant une diversité de courtes délétions N-terminales pour ensuite évaluer l'abondance de ces mutants lors de la surexpression de Cdh1, de même que leur aptitude à lier Cdh1/Cdc20. En outre, la recherche du signal de destruction non-canonique de Stau1 dans la séquence primaire d'autres protéines pourrait mener à l'identification de nouvelles cibles de l'APC/C.

Ainsi, la destruction de Stau1 dépendante de l'APC/C semble requérir un signal bipartite, à l'image de plusieurs autres cibles de l'enzyme (353). Pourtant, de récentes données structurales sur le complexe formé entre l'APC/C^{Cdh1} et un polypeptide ne contenant qu'une D box portent à croire que le corécepteur composé d'APC10 et Cdh1 ne lie qu'un seul site sur son substrat (66, 105). On peut donc s'interroger sur la fonction des deux motifs de dégradation de Stau1 relativement au contrôle de son expression. Bien que cette énigme ne soit pas résolue, il a été proposé que le fait de posséder plus d'un motif puisse augmenter l'efficacité avec laquelle un substrat est présenté au complexe enzymatique pour être ubiquitiné (65). Il a aussi été suggéré que des contacts supplémentaires s'établissent entre l'APC/C et ses substrats, distincts de ceux formés par l'intermédiaire des motifs conventionnels reconnus par l'enzyme (406). Il est donc possible que la région N-terminale, via son interaction avec les co-activateurs de l'APC/C, facilite le recrutement de Stau1 à l'E3 ubiquitine ligase qui peut ensuite reconnaître la D box et promouvoir la polyubiquitination de la protéine.

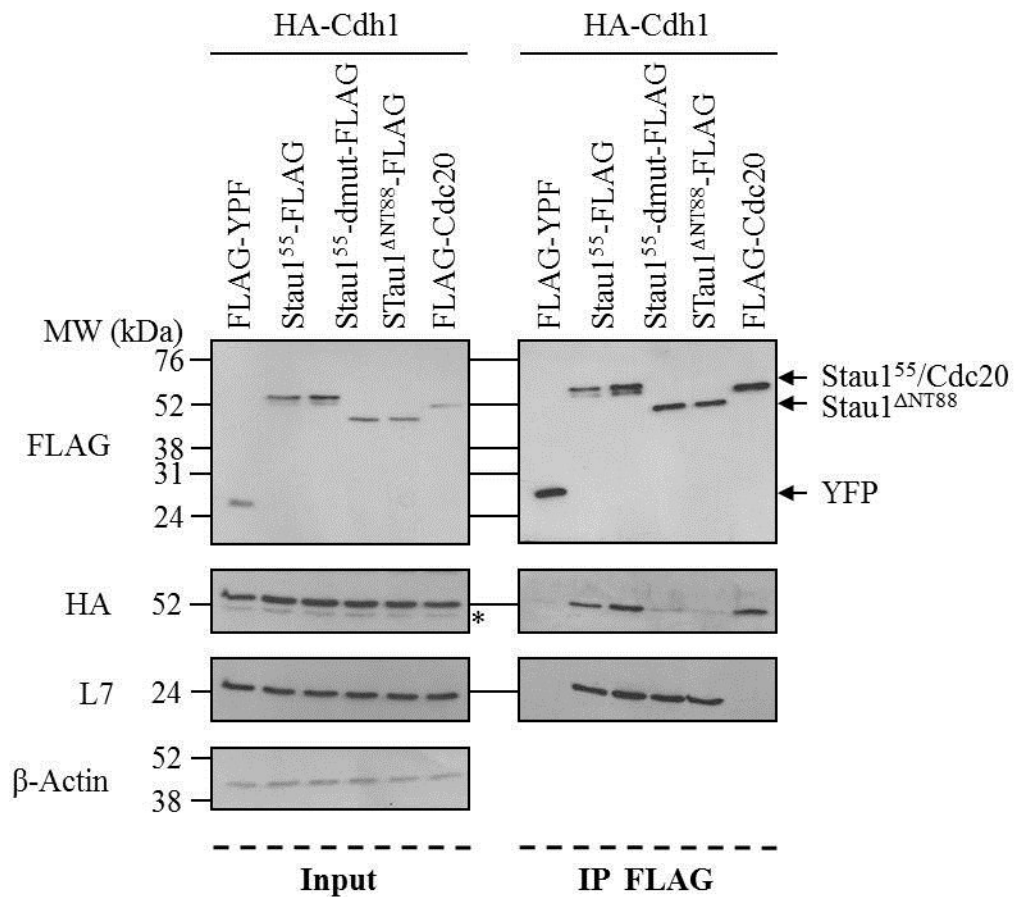


Figure 2 : La délétion des 88 premiers acides aminés de Stau1 l'empêche de s'associer à Cdh1. Des cellules HEK293T ont été co-transfectées avec les constructions indiquées. Des immunoprécipitations avec un anticorps dirigé contre l'épitope FLAG ont été faites sur les lysats des cellules récupérées 24 heures post-transfection et les protéines co-précipitées ont été analysées par immunobuvardage de type Western. Les anticorps dirigés contre la β -Actine et contre la protéine ribosomale L7 ont été utilisés respectivement comme contrôle de chargement et comme contrôle positif d'immunoprécipitation. Les masses (MW) des protéines du marqueur de poids moléculaire sont indiquées à gauche de la figure. L'astérisque (*) identifie un marquage non-spécifique.

3.1.1.3 Ubiquitination de Stau1 par l'APC/C

La principale fonction de l'APC/C est de recruter des substrats sur lesquels des chaînes d'ubiquitine seront conjuguées et ce par l'action d'enzymes de type E2 ubiquitine ligases spécifiquement associées au complexe. Étant donné que la baisse d'expression de Stau1 observée en fin de division cellulaire survient durant le pic d'activité de l'APC/C, nous avons supposé que la protéine soit une cible de cette E3 ubiquitine ligase. En accord avec cette hypothèse, nous avons montré que Stau1 est ubiquitiné et dégradé par le protéasome (Figure 3 de la section 2.1.10). Il faut néanmoins admettre que ce résultat a été acquis à partir de cellules asynchrones. Il est donc possible que l'ubiquitination de Stau1 que nous avons détectée ne soit pas le fruit de sa modification par l'APC/C. Ainsi, même si Stau1 interagit avec Cdc20 et Cdh1 et que ces derniers influencent l'abondance de la protéine (Figure 4 de la section 2.1.10), nous ne pouvons pas exclure totalement l'éventualité qu'il s'agisse d'une conséquence indirecte des actions de l'APC/C.

Afin de déterminer plus précisément le niveau d'implication de l'APC/C dans la destruction de Stau1 par la voie ubiquitine-protéasome, quelques expériences sont à considérer. Il est maintenant établi que dans les cellules humaines, l'APC/C favorise la formation de chaînes de polyubiquitine où la lysine 11 des molécules d'ubiquitine est utilisée. Une étude récente a d'ailleurs dévoilé que l'activité de l'APC/C est la principale source cellulaire de chaînes de polyubiquitine générées à partir de ce résidu (345). En tenant compte de ces informations, il serait pertinent de répéter l'essai d'ubiquitination présenté à la figure 3 de la section 2.1.10 en y ajoutant une condition expérimentale où sont co-exprimés Stau1 et une ubiquitine dont la lysine 11 est mutée. Puisque cette forme d'ubiquitine ne peut soutenir l'assemblage de chaînes via la lysine 11, une diminution de l'ubiquitination de Stau1 indiquerait un rôle probable pour l'APC/C dans la modification post-traductionnelle de la protéine. Il est à noter que nous avons déjà tenté cette expérience en employant une ubiquitine doublement mutée au niveau des lysines 48 et 63. Bien que ces résidus sont utilisés par une vaste majorité d'ubiquitine ligases pour allonger des

chaînes d'ubiquitine, le patron d'ubiquitination de Stau1 que nous avons obtenu est identique à celui observé en surexprimant une ubiquitine de type sauvage (données non-montrées). Ce résultat n'élimine donc pas la possibilité que l'APC/C soit le principal médiateur de la polyubiquitination de Stau1.

Enfin, la réalisation de tests d'ubiquitination *in vitro* pourrait aussi confirmer que l'APC/C a la capacité de conjuguer des molécules d'ubiquitine sur Stau1. Ces essais consistent à effectuer une réaction d'ubiquitination sur un substrat présumé à l'aide de molécules d'ubiquitine, d'ubiquitine ligases de type E1 et E2, de l'un ou l'autre des co-activateurs de l'APC/C et d'une préparation d'APC/C purifié (379). Le mélange réactionnel est subséquentement résolu sur un gel SDS-PAGE. L'apparition de formes de la protéine candidate qui présentent des mobilités électrophorétiques diminuées reflète son ubiquitination par l'APC/C. En plus de révéler si Stau1 peut être modifié directement par l'APC/C, cette expérience indiquerait si le complexe enzymatique activé par Cdc20 a le potentiel de réguler l'expression mitotique de Stau1 (section 3.1.1.1), en montrant s'il est en mesure ou non de catalyser l'ubiquitination de la protéine.

3.1.2 L'expression de Stau1 est maximale en début de mitose

Le premier article porte essentiellement sur le contrôle de la stabilité de Stau1 par l'APC/C. Dans la mesure où les niveaux de la protéine culminent en prométaphase, nos résultats mettent également en lumière une régulation positive de l'expression de Stau1 en fonction du cycle cellulaire (Figures 1 et 2 de la section 2.1.10). L'analyse des quantités globales de transcrits codants pour Stau1 par transcription inverse-réaction en chaîne par polymérase quantitative (RT-qPCR) indiquent que celles-ci ne varient pas de façon significative durant les différentes phases du cycle cellulaire (Figure 2 de la section 2.1.10 et Wildriss Viranaicken et Luc DesGroseillers, données non-publiées). Il n'y a donc pas de corrélation évidente entre les niveaux d'ARNm et les niveaux protéiques de Stau1. Ceci dénote que les différences d'expression observées au cours du cycle cellulaire ne sont pas le

fait d'une modulation de la transcription de Stau1 ou d'un changement de la stabilité de son transcrit.

Par conséquent, la fluctuation des niveaux de Stau1 découle sans doute d'une modification de l'équilibre entre le taux de production de la protéine et la vitesse de sa dégradation. En suivant cette logique, une plus forte expression de Stau1 peut résulter d'une élévation de son efficacité de traduction, de sa stabilisation ou encore d'une combinaison de ces deux phénomènes. Afin de mieux cerner les mécanismes qui conduisent à une augmentation de l'expression de Stau1 en début de mitose, il faudrait procéder à une caractérisation plus détaillée de son abondance durant le cycle cellulaire, spécialement pendant les phases S et G₂. À cet effet, l'expérience de relâche de cellules synchronisées à la transition G₁/S décrite à la figure 1 de la section 2.1.10 pourrait être reprise en récoltant des échantillons à des intervalles plus rapprochés. Ceci aiderait à déterminer si Stau1 s'accumule peu à peu pendant la progression dans le cycle cellulaire ou si ses niveaux sont haussés subitement alors que les cellules se préparent à enclencher la division cellulaire. Par exemple, les conclusions que nous avons présentées pourraient expliquer l'obtention de données qui tendent vers la première de ces options. Effectivement, en supposant que l'APC/C^{Cdh1} est le principal régulateur de la stabilité de Stau1, l'inactivation du complexe enzymatique en fin de phase G₁ permettrait un accroissement graduel de la concentration de la protéine et ce jusqu'à la reprise des activités de l'E3 ubiquitine ligase en mitose. Des résultats qui reflètent plutôt la deuxième possibilité seraient aussi très intéressants car ils démontreraient que Stau1 est traduit tout juste avant la division cellulaire. Une telle découverte suggérerait fortement que le messager de Stau1 possède un IRES parce qu'il est assumé que la synthèse protéique dépendante de la coiffe est globalement inhibée à ce moment du cycle (section 1.1.4.6.2). Ces hypothèses devront très certainement être testées pour améliorer notre compréhension des événements qui contribuent au contrôle de l'expression de Stau1 en fonction du cycle cellulaire.

3.2 Stau1 est-il important pour la progression dans le cycle cellulaire?

Le patron d'expression de Stau1 au cours du cycle de division cellulaire s'apparente beaucoup à ceux rapportés pour de nombreux substrats mitotiques de l'APC/C. En examinant les caractéristiques de ce type de cibles du complexe enzymatique, on constate rapidement que la plupart d'entre elles jouent des rôles prépondérants en mitose (336). Par exemple, on remarque la présence de plusieurs protéines avec des fonctions directes dans la condensation des chromosomes, dans la cohésion des chromatides sœurs, dans l'assemblage du fuseau mitotique, dans l'attachement des chromosomes condensés au fuseau et dans la cytokinèse. On trouve aussi des protéines essentielles à la coordination des différentes étapes qui se succèdent pour mener ultimement à la division cellulaire telles que Cdc20, des protéines effectrices du SAC, des protéines kinases, des protéines phosphatases de même que les cyclines mitotiques A et B. Enfin, on note que cette liste contient un régulateur de l'expression génique, soit le facteur de transcription FoxM1 (289, 393). Ce dernier favorise l'expression de gènes importants pour la mitose et il est intéressant de souligner que certains de ces gènes sont également des substrats de l'APC/C (393).

Par analogie avec les diverses protéines ciblées à la dégradation par l'APC/C, on peut donc supposer que Stau1 soit impliqué dans le processus de division cellulaire. Ce raisonnement est en outre appuyé par nos données qui indiquent que la surexpression de Stau1 cause un ralentissement de la progression mitotique. Tel que mentionné dans la discussion du premier article (section 2.1.6), des problèmes du même ordre ont été relevés lors de la surexpression de certains substrats de l'APC/C ayant des rôles établis en mitose. Pour expliquer ce phénomène, il a été proposé qu'une des tâches de l'APC/C consiste à faciliter l'inactivation de régulateurs mitotiques via leur déstabilisation, cette inactivation étant nécessaire pour compléter mitose (310). Par conséquent, une interprétation plausible

de nos résultats est que Stau1 a des fonctions mitotiques qui doivent ensuite être inhibées pour achever la division cellulaire.

3.2.1 Contributions potentielles de Stau1 au processus de division cellulaire

Plusieurs options s'offrent à nous pour tenter d'identifier les rôles probables de Stau1 pendant la mitose. Premièrement, il serait primordial de déterminer sa distribution intracellulaire tout au long de la division. À cet effet, Stau1 pourrait être immunomarcqué et visualisé par microscopie à fluorescence. Une co-localisation entre la protéine et des structures particulières telles que les chromosomes, le kinétochore, les microtubules mitotiques ou l'anneau contractile d'actine pourrait nous donner des renseignements sur ses fonctions mitotiques potentielles en indiquant le lieu de leur exécution. En raison des nombreux travaux qui font état d'une association entre Stau1 et des composants du cytosquelette (section 1.5.4.2), il demeure plausible qu'une telle caractérisation nous procure ce genre de précisions. Vu que la surexpression de Stau1 semble perturber le déroulement normal de la mitose (Figure 6 de la section 2.1.10), il serait préférable de réaliser cette expérience en utilisant un anticorps reconnaissant la protéine endogène. Ceci est maintenant envisageable puisque nous disposons depuis peu d'un anticorps dirigé contre Stau1 qui semble fonctionnel en immunomarquage.

Deuxièmement, la diminution des niveaux de Stau1 à l'aide d'ARN interférents pourrait nous fournir des informations sur son implication dans les dernières étapes du cycle de division. Par exemple, on pourrait comparer l'apparence du fuseau mitotique de cellules exprimant un petit ARN interférent ciblant Stau1 à celle de cellules contrôles en immunomarcquant la tubuline pour visualiser le réseau de microtubules par microscopie à fluorescence. En parallèle, les chromosomes condensés de ces cellules pourraient être également observés par microscopie en utilisant un colorant spécifique de l'ADN tel que le 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI). Un résultat montrant que la déplétion de Stau1

change l'aspect de l'appareil mitotique et/ou l'alignement des chromosomes suggérerait fortement que Stau1 est nécessaire à l'assemblage du fuseau. De façon similaire, on pourrait étudier le comportement des chromosomes mitotiques en exprimant une forme de l'histone H2B fusionnée à une protéine fluorescente et en acquérant des images de cellules vivantes à de courts intervalles. Ce type de données permettrait de déterminer le temps écoulé en moyenne entre le bris de l'enveloppe nucléaire et l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique, entre le moment où les chromosomes sont correctement alignés et où les chromatides sœurs sont séparées, etc. Dans le cas où la réduction des niveaux de Stau1 modifie la durée d'une des étapes de la mitose, on pourrait supposer que la protéine participe aux événements qui surviennent durant cette période.

Cependant, il est important de mentionner que nous avons généré des courbes de croissance à partir de cellules exprimant un petit ARN interférant ciblant Stau1, tout comme nous l'avons fait précédemment pour des cellules surexprimant Stau1 (Figure 7 de la section 2.1.10). La moyenne des courbes obtenues est d'ailleurs présentée à la figure 3.

Le fait que la croissance des cellules sous-exprimant Stau1 soit pratiquement identique à celle des cellules du contrôle indique que la protéine ne semble pas essentielle à la prolifération cellulaire. À partir de ce résultat, on peut inférer que la déplétion de Stau1 ne devrait pas affecter le processus de division de façon drastique puisque dans un tel cas, nous aurions dû observer un ralentissement ou un arrêt de la prolifération. Il est tout de même possible que Stau1 soit impliqué dans la mitose et que la réduction de son expression occasionne des problèmes plus subtils. De plus, on peut envisager que d'autres protéines compensent advenant une baisse des niveaux de Stau1. Par exemple la protéine Stau2 pourrait potentiellement pallier à l'absence Stau1. Même si les fonctions moléculaires de Stau2 sont très peu caractérisées, il est connu que les deux paralogues humains de Staufen partagent certains ligands d'ARN (157). Il serait donc intéressant de tester cette hypothèse en renouvelant les essais de prolifération dans des conditions où seraient utilisés de petits ARN interférents destinés à diminuer simultanément l'expression Stau1 et de Stau2.

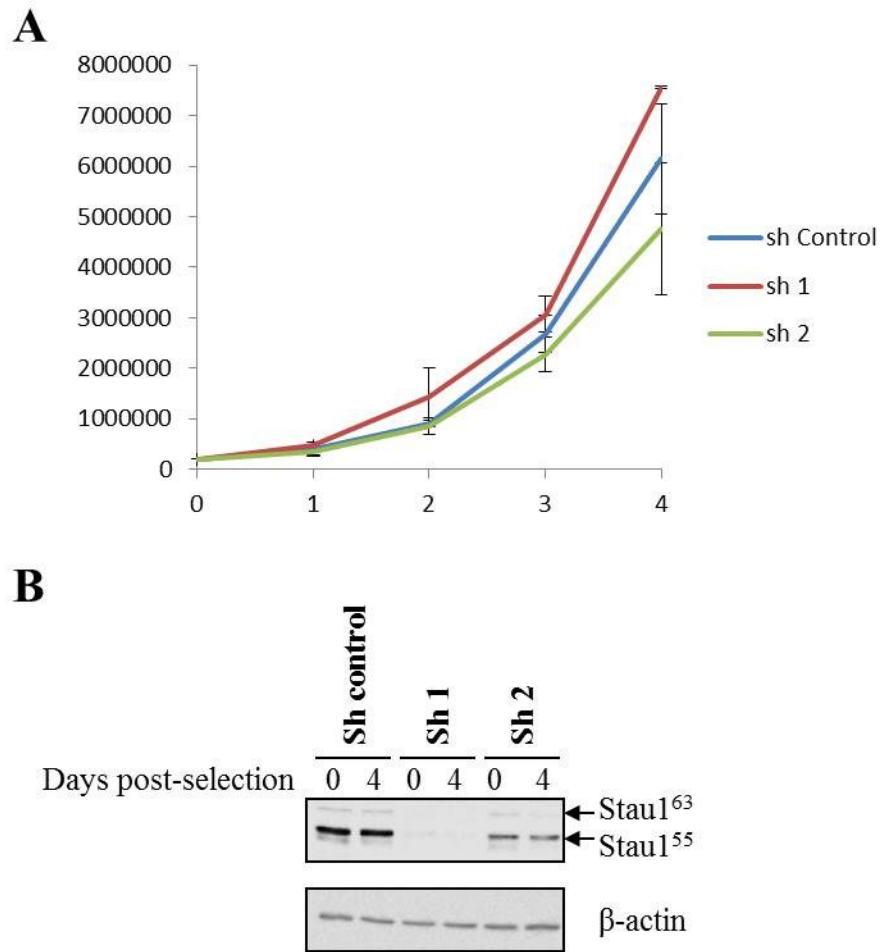


Figure 3 : La diminution des niveaux endogènes de Stau1 n'affecte pas la prolifération cellulaire. A) Des cellules HEK293T ont été infectées à l'aide de rétrovirus permettant l'expression d'un gène de résistance à la puromycine ainsi que celle de petits ARN interférents contrôles ou ciblant Stau1. Les cellules ont été mises sous sélection à la puromycine pendant deux jours puis ont été remises en culture à la même densité. Les cellules ont été récoltées à chaque jour puis comptées à l'aide d'un hémocytomètre. La moyenne de 3 expériences est présentée et les barres d'erreur représentent l'écart-type. B) Analyse par immunobuvardage de type Western de l'expression de Stau1 aux jours 0 et 4 de l'expérience décrite en A.

Stau1 n'est peut-être pas indispensable à la division cellulaire, mais le contrôle de ses niveaux est essentiel parce que sa surexpression, même faible, inhibe considérablement la prolifération cellulaire en plus de ralentir la progression mitotique (Figures 6 et 7 de la section 2.1.10). Des expériences de microscopie du même ordre que celles proposées pour des cellules exprimant un petit ARN interférant ciblant Stau1 sont donc à considérer pour tenter d'identifier les problèmes causés par un excédent de la protéine. Ceci pourrait nous amener à mieux définir les rôles de Stau1 en mitose tout en indiquant quelle est la pertinence biologique de la régulation de la protéine par l'APC/C.

3.2.1.1 Liens possibles entre les fonctions moléculaires de Stau1 et le déroulement de la mitose

À l'égard de toutes les informations actuellement disponibles sur Stau1, il est difficile de présumer de la nature de sa participation au processus de division cellulaire. D'ailleurs, le fait qu'il s'agisse d'une protéine multifonctionnelle complexifie cette tâche. On peut tout de même émettre des hypothèses quant à l'implication de Stau1 au cours de la mitose et ce en considérant ses différentes activités liées à la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique. Ainsi, cette protéine liant l'ARN pourrait contribuer au passage des cellules dans les dernières étapes de leur cycle de division en aidant à la localisation d'ARNm, en facilitant la synthèse de certaines protéines ou encore en entraînant la dégradation de transcrits spécifiques. Toutefois, à la lecture du deuxième article présenté au chapitre 2, cette dernière possibilité semble peu probable compte tenu qu'une baisse significative de l'association entre Stau1 et UPF1 est observée conséquemment à la synchronisation de cellules en prométaphase (Figure 6 de la section 2.2.10). Puisque la capacité de Stau1 à recruter UPF1 est requise pour déstabiliser les ARNm qui sont liés à la protéine, ce résultat porte à croire que l'efficacité du SMD doit être grandement diminuée pendant cette période du cycle. Des travaux futurs devraient donc être focalisés sur les rôles de Stau1 dans l'acheminement de transcrits vers leur destination et dans la dé-répression de la traduction.

Avec l'objectif de jeter les bases des recherches qui pourraient éventuellement mener à la détermination des fonctions de Stau1 en mitose, nous avons souhaité découvrir l'identité des ARNm associés à la protéine durant cette phase. C'est pourquoi des cellules HEK293T exprimant transitoirement l'isoforme Stau1⁵⁵ fusionné à un épitope FLAG ont été synchronisées en prométaphase à l'aide d'un blocage au nocodazole. Des extraits de ces cellules ont ensuite été produits et Stau1⁵⁵-FLAG a été immunoprécipité dans le but d'isoler la portion du transcriptome des HEK293T qui co-précipite avec la protéine. L'utilisation subséquente de micropuces d'ADN nous a permis de dresser la liste des transcrits qui sont potentiellement retrouvés dans les mêmes complexes que Stau1 préalablement à la division cellulaire. Cette liste comprend un peu plus de 1000 gènes différents est présentée dans le tableau I situé en annexe.

Une analyse préliminaire de nos données indique que les ARNm associés à Stau1 en début de mitose sont produits à partir de gènes impliqués dans une panoplie de voies. D'ailleurs, si on procède à la classification de ces transcrits en tenant compte des caractéristiques fonctionnelles des protéines pour lesquelles ils codent, on constate que la distribution obtenue est très similaire à la distribution observée pour le transcriptome total des cellules HEK293T (données non-montrées). Cela signifie que parmi la population d'ARNm qui interagit avec Stau1, il n'y a pas d'enrichissement notable de groupes de gènes qui fonctionnent dans des processus cellulaires particuliers. Un examen approfondi de nos résultats fait tout de même ressortir plusieurs éléments qui valent la peine d'être soulignés.

À prime abord, des recherches réalisées précédemment ont montré que de nombreux transcrits sont localisés sur les fuseaux mitotiques et méiotiques de diverses espèces (44, 137, 301). Entre autres, quelques milliers d'ARNm possiblement associés à ce type de structure ont été identifiés dans la lignée cellulaire humaine HeLa (44). Cependant, le lien entre ce phénomène et le processus de division cellulaire, s'il existe, demeure indéterminé. Tel que discuté dans le premier article (section 2.1.6), il a été proposé que l'association

d'ARNm traductionnellement inactifs au réseau de microtubules favorise leur répartition entre les deux cellules filles résultant de la mitose. De plus, des travaux soutiennent la notion que le ciblage de certains ARNm sur les appareils méiotiques et mitotiques permet la synthèse locale de régulateurs majeurs de la division, à l'endroit où leur action est requise. Un rôle structural pour l'ARN dans l'assemblage du fuseau a aussi été proposé puisqu'il a été rapporté que la présence de molécules d'ARN (et possiblement d'ARNm) est requise pour l'organisation des microtubules dans des extraits d'œufs de Xénope (45). La distribution subcellulaire de Stau1 pendant la mitose n'est pas connue, mais dans la mesure où la protéine co-localise avec les microtubules dans d'autres contextes (section 1.5.4.2), il était approprié de comparer la liste des transcrits qui co-précipitent avec Stau1 en prométaphase à la liste des transcrits associés au fuseau mitotique de cellules HeLa (44). Cet exercice dont les résultats sont présentés dans le tableau II en annexe a révélé que 71 ARNm possiblement en complexe avec Stau1 sont également co-purifiés avec le fuseau mitotique. Ainsi, Stau1 pourrait participer au processus de division cellulaire en favorisant la localisation de transcrits sur cette structure durant la mitose. La vraisemblance de cette proposition pourrait être évaluée en visualisant certains de ces transcrits par la méthode d'hybridation *in situ* utilisant la fluorescence. Leur distribution dans des cellules exprimant un petit ARN interférent conçu pour réduire les niveaux de Stau1 pourrait ainsi être comparée à celle observée pour des cellules contrôles.

En deuxième lieu, certains des ARNm associés à Stau1 codent pour des protéines qui sont d'un intérêt particulier en ce qui a trait à la mitose. Indépendamment du réseau de microtubules, la protéine pourrait être impliquée dans le ciblage de ces transcrits et/ou dans traduction de ces derniers. De cette manière, Stau1 contribuerait à l'expression régulée dans l'espace et dans le temps de protéines jouant des rôles de premier plan au cours des dernières étapes du cycle de division cellulaire. Ces divers transcrits qui sont tout désignés pour faire l'objet d'études ultérieures sont énumérés dans le tableau III situé en annexe. Entre autres, on y découvre des produits de gènes nécessaires à la condensation des chromosomes et au maintien de leur stabilité tout long de la mitose. De plus, cette liste

contient des facteurs d'assemblage du fuseau mitotique et quelques composants du kinétochore qui sont requis pour faire le pont entre les chromosomes et l'appareil mitotique. On note aussi la présence de protéines fonctionnant dans la cytokinèse et dans la reformation du noyau autour des chromosomes ségrégués au niveau des cellules filles. Finalement, on trouve des protéines importantes pour l'expression et la modulation de régulateurs clés de la mitose.

Un exemple frappant parmi les membres de cette dernière catégorie est celui du gène RASSF1, qui code pour une protéine qui peut d'une part inhiber l'APC/C^{Cdc20} et d'autre part être ubiquitinée par ce complexe enzymatique (89). En définitive, le fait que quelques-uns des ARNm co-précipitant avec Stau1 en prométaphase codent pour des protéines qui sont aussi envoyées à la dégradation par l'APC/C (Tableau III de l'annexe) mérite de plus amples considérations. En supposant que Stau1 favorise l'expression de ces gènes, on peut faire un parallèle avec le cas de FoxM1, qui est également une cible de l'APC/C. Tel que mentionné précédemment (section 3.2), ce facteur active la transcription de gènes dont l'expression est essentielle à la progression mitotique. Puisque certaines des protéines produites à partir de ces gènes sont aussi des substrats de l'APC/C, il a été proposé que l'action de l'E3 ubiquitine ligase sur FoxM1 consolide la régulation négative qu'elle exerce sur l'abondance de ces protéines (393). De façon similaire, l'APC/C pourrait imposer un contrôle à la fois post-traductionnel et post-transcriptionnel sur certaines de ses cibles en dirigeant la destruction de Stau1.

Somme toute, avant d'entreprendre la continuation de ces travaux, il faudra confirmer que les ARNm que nous avons identifiés forment réellement un complexe avec Stau1 et ce, même si seuls les transcrits répondant à des critères rigoureux furent sélectionnés parmi tous ceux qui ont co-précipité avec Stau1⁵⁵-FLAG. En effet, pour faire partie de la liste d'ARNm associés à Stau1, les transcrits devaient être retrouvés dans chacun des trois essais d'immunoprécipitation exécutés et présenter une abondance au minimum trois fois plus grande dans l'immunoprécipitation FLAG comparativement à

l'immunoprécipitation contrôle. C'est d'ailleurs par souci d'augmenter le degré de pureté du matériel isolé que nous avons choisi de travailler avec la protéine Stau1⁵⁵-FLAG, compte tenu de la grande affinité de l'anticorps FLAG pour son épitope et de la possibilité d'utiliser le peptide FLAG pour éluer par compétition les complexes immunoprécipités. Malgré toutes ces précautions, il n'est pas exclu que les ARNm choisis ne s'associent pas à la protéine Stau1 endogène. Le statut de ces ligands potentiels de Stau1 devra donc être clarifié, ce qui pourrait être fait en reproduisant les expériences d'immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps dirigé contre Stau1 et en vérifiant la présence de certains ARNm dans l'éluat final par RT-qPCR. Dans l'éventualité où des anticorps reconnaissant quelques-unes des protéines produites à partir de transcrits véritablement associés à Stau1 sont disponibles, il serait par la suite intéressant de vérifier si la déplétion ou la surexpression de Stau1 influence l'abondance de ces protéines.

3.2.1.2 Implications possibles de Stau1 indépendantes de la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique

Il est concevable que Stau1 accomplisse des tâches mitotiques qui ne sont pas reliées à sa capacité à lier l'ARN. D'une façon ou d'une autre Stau1 pourrait participer au maintien du SAC (section 1.4.2.3), ce qui expliquerait pourquoi sa surexpression dans des cellules bloquées en prométaphase puis relâchées retarde leur progression dans les dernières étapes de la mitose. D'ailleurs, puisque Stau1 interagit avec Cdc20, on pourrait supposer qu'il s'associe au MCC. Malgré de nombreuses tentatives, nous ne sommes pas parvenus à montrer une interaction entre Stau1 et un autre composant du MCC, soit la protéine Mad2 (données non-montrées). Bien que ce résultat négatif obtenu suite à des expériences de co-immunoprécipitation aille à l'encontre de l'idée que Stau1 fasse partie du MCC, il ne permet pas d'éliminer complètement la possibilité que la protéine soit un effecteur du SAC.

3.2.2 Stau1 joue-t-il un rôle en phase G₁?

La régulation de Stau1 par l'APC/C^{Cdh1}, bien qu'elle soit semblable à celle subie par d'autres substrats de cette E3 ubiquitine ligase, présente tout de même une singularité qui vaut la peine d'être soulignée. Effectivement, même s'il est établi que l'APC/C^{Cdh1} dirige l'ubiquitination de ses cibles jusqu'en fin de phase G₁, une portion non-négligeable de Stau1 semble protégée de l'action de l'enzyme au cours de cette période (Figures 1, 2 et 4 de la section 2.1.10). Cet aspect du contrôle de l'abondance de Stau1 suggère l'existence de mécanismes qui empêchent la destruction d'une partie de la protéine. Des hypothèses qui pourraient expliquer ce phénomène ont d'ailleurs été exposées dans la discussion du premier article. Entre autres, à l'égard d'une étude antérieure où il a été rapporté que l'APC/C^{Cdh1} se situe dans le noyau durant la phase G₁, nous avons proposé que la fraction cytoplasmique de Stau1 soit à l'abri de la dégradation orchestrée par le complexe enzymatique à cette étape du cycle. Notre laboratoire a précédemment montré que Stau1 possède la capacité de transiter par le noyau, même si la protéine y est rarement détectée (section 1.5.4.1). À la lumière de nos résultats, il est vraisemblable que l'absence de Stau1 au sein de cette organelle découle en partie de sa déstabilisation par l'APC/C^{Cdh1}. Dans le but de vérifier la validité de cette supposition, il serait approprié d'incuber des cellules synchronisées en phase G₁ en présence d'un inhibiteur du protéasome pour déterminer si ce traitement mène à une accumulation de Stau1 au noyau.

Nos observations soulèvent également des interrogations quant à la pertinence de ne réduire que partiellement les niveaux de Stau1 en sortie de mitose. Dans une minorité de cas où la destruction incomplète de substrats de l'APC/C^{Cdh1} a été signalée, il a été suggéré que d'autres voies achèvent l'inactivation des protéines concernées (198, 472). Nous soupçonnons qu'il pourrait en être autrement pour Stau1 et que la sous-population de la protéine qui est dégradée soit celle qui a une localisation subcellulaire précise et/ou qui exécute des tâches mitotiques particulières. Ainsi, Stau1 ne serait pas totalement éliminé, ce

qui lui permettrait de remplir d'autres fonctions en interphase. En ce sens, beaucoup de transcrits associés à Stau1 dans des cellules asynchrones codent pour des protéines impliquées dans le métabolisme cellulaire (157). La modulation fine de l'expression de ces ARNm par Stau1 pourrait être requise pendant la phase G_1 , au moment où la cellule se prépare à faire son entrée dans le cycle de division. De plus, on peut tenter de faire un parallèle avec les événements qui surviennent au cours de la différenciation cellulaire. Il est largement documenté qu'un maintien de l'activité l'APC/C^{Cdh1} va de pair avec la sortie du cycle de division et la promotion de la différenciation dans une diversité de systèmes cellulaires (526). Or, l'idée que Stau1 participe à ce phénomène chez les mammifères a aussi commencé à émerger conséquemment à la publication de quelques travaux (section 1.5.6.1). Bien que cela demeure à confirmer expérimentalement, on peut imaginer qu'une portion de Stau1 soit protégée de l'activité de l'APC/C^{Cdh1} de telle sorte que la protéine puisse contribuer au processus de différenciation cellulaire. Par analogie, il est donc plausible qu'une fraction de Stau1 ne soit pas affectée par l'ubiquitination dirigée par l'APC/C^{Cdh1} en phase G_1 afin de jouer des rôles qui restent à être définis.

3.3 Pourquoi le contrôle des niveaux de Stau1 est-il important pour la prolifération cellulaire?

Nous avons montré que la surexpression transitoire d'un mutant de Stau1 insensible à l'activité de l'APC/C^{Cdh1} ralentit la progression mitotique sans toutefois la bloquer (Figure 6 de la section 2.1.10). De fait, ces cellules qui présentent des niveaux totaux de Stau1 plus élevés complètent éventuellement la mitose mais avec un léger délai comparativement aux cellules de la condition contrôle. Cette observation est difficile à réconcilier avec les données que nous avons obtenues suite à la réalisation de divers essais de prolifération cellulaire, spécialement lorsqu'on tient compte de l'ampleur du ralentissement de croissance provoqué par la surexpression à plus long terme de Stau1 (Figure 7 de la section 2.1.10). Néanmoins, il est concevable que les problèmes mineurs

rencontrés en mitose par les cellules aux prises avec un surplus de Stau1 finissent par entraîner une inhibition générale de la prolifération. Pour appuyer cette proposition, l'exemple de la protéine associée au cytosquelette 2 (CKAP2) est digne de mention. En effet, la légère surexpression d'une forme non-dégradable de cette cible de l'APC/C^{Cdh1} n'empêche pas les cellules d'aller jusqu'au bout du processus de division (217). Cependant, des anomalies dans l'assemblage du fuseau au cours de la mitose subséquente sont à la source d'un arrêt du cycle (217, 452). En outre, une étude récente effectuée chez la levure *S. cerevisiae* soutient ce concept dans la mesure où il y a été révélé qu'un désassemblage incomplet de l'appareil mitotique ne compromet pas la division en cours mais bloque la formation d'un fuseau fonctionnel pendant la mitose suivante (537). Même s'il n'est pas démontré que Stau1 prenne part à l'organisation du fuseau mitotique, l'abolition de sa régulation par l'APC/C^{Cdh1} pourrait nuire à la prolifération cellulaire d'une manière semblable. Compte tenu que la surexpression de Stau1 à court terme augmente la proportion de cellules qui se trouvent dans la phase G₂ ou en mitose dans une population de cellules asynchrones (Figure 6 de la section 2.1.10), il serait intéressant d'évaluer la distribution dans le cycle de cellules qui surexpriment la protéine sur une plus longue période, par cytométrie en flux.

En plus de moduler la déstabilisation de régulateurs mitotiques clés, l'APC/C^{Cdh1} joue un rôle dans la maintenance des phases G₁ et G₀ et ce, en diminuant l'expression de protéines qui promeuvent l'entrée dans un nouveau cycle de division cellulaire. De façon générale, la déplétion ou l'invalidation de Cdh1 occasionne de l'instabilité génomique (526), mais les répercussions apparentes varient selon les types cellulaires étudiés. Dans quelques-unes des lignées humaines testées, l'utilisation de petits ARN interférents ciblant Cdh1 mène à un arrêt de croissance en phase G₁, qui s'accompagne parfois d'une augmentation de l'entrée en apoptose (464). Dans d'autres types cellulaires, la baisse des niveaux de Cdh1 accélère le passage en phase S. En contrepartie, ces cellules qui débutent prématurément la duplication de leur génome demeurent plus longtemps dans cette phase, ce qui reflète probablement leur préparation inadéquate pour procéder à la synthèse d'ADN

(138, 464). Il est remarquable que des conséquences similaires soient engendrées par la dérégulation de certains substrats de l'APC/C^{Cdh1}, alors que leur surexpression entraîne une transition G₁/S précoce (25, 221, 393, 401). Afin de mieux comprendre l'importance de contrôler l'abondance de Stau1, il serait tout indiqué d'examiner si des cellules qui surexpriment Stau1 de type sauvage ou une version de la protéine résistante aux actions de l'APC/C progressent plus rapidement vers la phase S. De plus, nous pourrions utiliser la cytométrie en flux pour déterminer si une proportion plus élevée de ces cellules sont apoptotiques. À ce sujet, il n'est pas banal que plusieurs des transcrits qui co-précipitent avec Stau1 en mitose codent pour des protéines impliquées de près ou de loin dans la mort cellulaire programmée (données non-montrées). Ce constat laisse entrevoir la possibilité d'un rôle pour Stau1 dans la régulation de l'apoptose. Enfin, il est à noter que tous les essais de prolifération que nous avons présentés ont été faits dans des lignées cellulaires où certaines des voies principales de réponse aux dommages à l'ADN sont inactivées. Il serait donc pertinent de répéter ce type d'expériences dans des cellules non-transformées, de telle sorte qu'il serait plus facile d'estimer si la surexpression de Stau1 est une source d'instabilité génomique.

En somme, nos travaux ont mené à l'identification d'un mécanisme qui restreint l'expression de Stau1 au cours du cycle de division cellulaire et qui requiert l'action de l'APC/C. Bien que nous ayons montré que cette forme de régulation semble nécessaire pour permettre aux cellules de proliférer en présence de signaux mitogènes, nous ne comprenons pas encore la raison de son existence. Une meilleure définition des rôles de Stau1 relativement à la progression dans le cycle cellulaire pourrait certainement aider à la résolution de cette énigme et selon toute vraisemblance, des recherches futures s'orienteront dans cette direction.

3.4 Stau1 est potentiellement régulé par un mécanisme impliquant sa phosphorylation

Les deux articles présentés dans cette thèse portent sur un thème commun car ils décrivent tous deux des mécanismes de contrôle de Stau1 par l'intermédiaire de modifications post-traductionnelles. Effectivement, dans notre seconde étude, nous sommes parvenus à mettre en évidence qu'une grande proportion de Stau1 est sous forme phosphorylée et ce sur plusieurs résidus. Cette découverte laisse présager que les multiples activités de Stau1 puissent être modulées par des cascades de signalisation.

En tant que régulateur post-transcriptionnel, Stau1 influence le destin des transcrits qu'il lie en s'associant à diverses machineries cellulaires. En théorie, tous les rôles exercés par Stau1 pourraient être affectés sans distinction par l'ubiquitination de la protéine, attendu que cet événement conduit apparemment à la destruction de Stau1. La phosphorylation de Stau1 pourrait entraîner des conséquences similaires dans des circonstances où cette modification jouerait sur la stabilité de Stau1 ou sur sa capacité à lier l'ARN. En revanche, si l'acquisition de groupements phosphates par Stau1 a une incidence sur le recrutement de certains de ses partenaires, la phosphorylation de la protéine pourrait être un moyen de réguler individuellement chacune de ses fonctions. Cette dernière idée est soutenue par nos données qui tendent à montrer que la phosphorylation du TBD de Stau1 bloquerait son interaction avec la protéine UPF1, sans empêcher la protéine de lier l'ARN ou de favoriser la traduction.

3.4.1 Stau1 est une phosphoprotéine

Dans le but de vérifier l'hypothèse que Stau1 soit phosphorylé, nous avons eu recours à différents essais qui nous ont tous confirmé que la protéine endogène est soumise à ce type de modification post-traductionnelle (Figure 1 de la section 2.2.10). Par la suite, nous avons voulu identifier des sites de phosphorylation de Stau1. C'est dans cette

intention que nous avons immunopurifié de grandes quantités de Stau1⁵⁵-FLAG à partir d'une lignée stable de cellules HEK293T qui expriment faiblement cette protéine. Notre préparation fut subséquemment analysée par spectrométrie de masse afin de détecter des acides aminés de Stau1⁵⁵ étant phosphorylés. Cette expérience a révélé la phosphorylation de la ser 95, de la thr 291 et de la ser 309 de Stau1⁵⁵ (Tableau I de la section 2.2.10).

Bien que la stratégie à laquelle nous avons eu recours ait porté fruit, on peut tout de même s'interroger sur la possibilité de généraliser nos résultats, surtout lorsqu'on considère qu'ils ont été obtenus dans un contexte de faible surexpression de Stau1⁵⁵. Une étude globale portant sur le phosphoprotéome des HEK293 valide en quelque sorte nos conclusions concernant la phosphorylation de la Ser309 puisqu'il y est rapporté que ce résidu de la protéine Stau1 endogène est phosphorylé (169). Néanmoins, une des lacunes du design expérimental choisi est qu'il ne permet pas d'examiner la phosphorylation des deux autres isoformes moins abondants de Stau1, soit Stau1⁶³ et Stauⁱ. Le fait que Stau1⁶³ soit retenu par une colonne d'affinité pour les phosphoprotéines suggère fortement qu'il soit sujet à cette modification post-traductionnelle (Figure 1 de la section 2.1.10). Compte tenu que l'intégralité de la séquence protéique de Stau1⁵⁵ est présente dans Stau1⁶³, on pourrait présumer que les événements de phosphorylation que nous avons décrits soient communs aux deux isoformes, même si cette supposition doit être testée. Stau1⁶³ reste somme toute très peu caractérisé comparativement à Stau1⁵⁵ et ses fonctions ne sont pas définies. Il est toutefois intéressant de mentionner qu'au cours de notre étude, un autre groupe a répertorié quatre phosphosites dans la portion N-terminale de Stau1⁶³. Il s'agit de la ser 60, de la thr 62, de la ser 63 et de la ser 70 (383). Il est à noter que ces acides aminés n'ont pas d'équivalent au niveau de Stau1⁵⁵, dans la mesure où les 81 premiers acides aminés de Stau1⁶³ ne sont pas inclus dans l'isoforme de 55 kDa.

3.4.1.1 Caractérisation des phosphosites identifiés

L'identification d'acides aminés phosphoaccepteurs de Stau1 constitue un bon point de départ pour la poursuite de nos travaux visant à évaluer les impacts de la phosphorylation sur la protéine. Cependant, la nature du matériel utilisé pour l'analyse de Stau1 par spectrométrie de masse (soit des extraits de cellules HEK293T proliférant de façon asynchrone) et la généralité de cette approche protéomique font en sorte que les caractéristiques propres à chacun des événements de phosphorylation que nous avons détectés demeurent obscures. Entre autres, il est présentement impossible de déterminer si la ser 95, la thr 291 et la ser 309 de Stau1⁵⁵ sont constitutivement phosphorylées ou si leur modification post-traductionnelle est induite dans une situation particulière. De plus, comme on ne dispose d'aucune information à propos du moment où ces résidus sont phosphorylés, on ne peut établir si leur modification est simultanée ou encore s'il y a une interdépendance entre les différentes phosphorylations que nous avons observées. Par exemple, la combinaison de multiples phosphorylations pourrait être requise pour produire un effet tangible sur Stau1. En outre, la phosphorylation d'un site pourrait favoriser le recrutement d'une autre kinase responsable de la modification d'un deuxième site. Face à ces constats, il semble nécessaire d'approfondir nos connaissances sur les circonstances entourant la phosphorylation de Stau1.

Nous avons montré d'une part que la phosphorylation de Stau1 compromet probablement son association à la protéine UPF1 (Figure 5 de la section 2.2.10) et d'autre part que l'interaction entre les deux protéines est fortement inhibée en mitose (Figure 6 de la section 2.2.10). Par conséquent, il paraît logique d'émettre l'hypothèse que la phosphorylation de certains acides aminés de Stau1 ait lieu en fonction du cycle de division cellulaire. Cette idée a d'ailleurs été évoquée dans la discussion du deuxième article présenté au chapitre 2. À ce propos, nous avons généré des extraits à partir de cellules de carcinome colorectal humain synchronisées puis nous les avons séparés par électrophorèse bidimensionnelle (Figure 4). Cette expérience préliminaire indique que le point

isoélectrique de Stau1⁵⁵ varie durant le cycle cellulaire. Par contre, on ne peut conclure avec certitude que les changements observés découlent de la phosphorylation ou de la déphosphorylation de Stau1⁵⁵. De fait, l'acquisition de modifications post-traductionnelles qui neutralisent les acides aminés basiques telles que la méthylation des arginines ou des lysines et l'acétylation des lysines va entraîner une diminution du point isoélectrique des protéines qui subissent ces additions covalentes, au même titre que la phosphorylation. Afin de faire le point sur l'état de phosphorylation de Stau1 au cours du cycle cellulaire, les essais d'électrophorèse bidimensionnelle sur des extraits de cellules synchronisées pourraient être repris en ajoutant une condition où une fraction des échantillons serait préalablement incubée avec de la phosphatase alcaline. Une altération de la mobilité électrophorétique de Stau1⁵⁵ occasionnée par ce traitement mènerait à l'interprétation que la protéine est phosphorylée au cours d'une phase donnée, mais sans fournir de détails sur l'identité des résidus modifiés. Pour parvenir à effectuer cette distinction, des mutants non-phosphorylables de Stau1 pourraient être exprimés transitoirement dans des cellules humaines et leur patron de migration en électrophorèse bidimensionnelle pourrait être comparé à celui de la protéine de type sauvage. Toutefois, cette option n'apparaît pas comme étant la meilleure compte tenu que la technique de séparation que nous avons employée pour la première dimension fait montre de peu de reproductibilité entre différentes séries d'expériences (99).

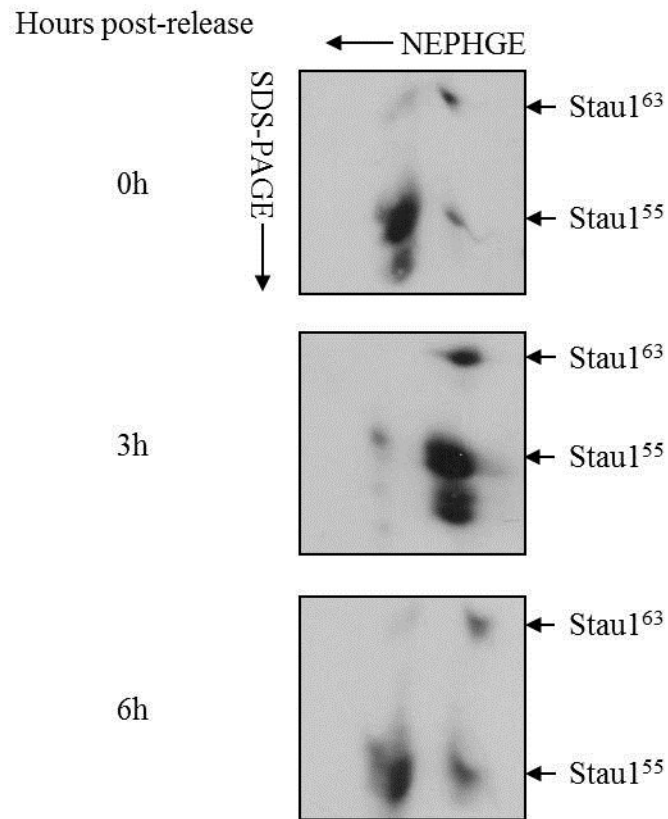


Figure 4 : Le point isoélectrique des isoformes de Stau1 varie durant le cycle cellulaire. Des cellules HCT116 ont été synchronisées à la transition G₁/S à l'aide d'un double blocage à la thymidine. Par la suite, les cellules ont été relâchées puis récoltées aux temps indiqués à gauche de la figure. Des extraits de ces cellules ont été séparés par électrophorèse en gel à deux dimensions et la protéine Stau1 a été détectée par immunobuvardage de type Western.

D'autres alternatives s'offrent à nous en vue d'établir à quel instant surviennent les divers événements de phosphorylation sur Stau1 et s'ils dépendent de la progression dans le cycle cellulaire. Il faut mentionner qu'à l'égard des difficultés se rattachant à l'usage de gels bidimensionnels, nous avons tenté d'étudier la phosphorylation de Stau1 à l'aide d'une méthode standard d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE). Malheureusement, nous ne sommes pas arrivés à déceler une

migration différentielle de Stau1 suite à l'analyse de lysats cellulaires traités ou non à la phosphatase alcaline par électrophorèse unidimensionnelle (données non-montrées). Pour remédier à ce problème, une caractérisation de la phosphorylation de Stau1 pendant le cycle cellulaire pourrait être entreprise en recourant à des gels SDS-PAGE de type « Phos-tag ». Le « Phos-tag » est une molécule qui possède une grande affinité pour les phosphates, notamment ceux qui modifient certains acides aminés. Lorsqu'employé comme additif dans la préparation d'un gel SDS-PAGE, ce composé va spécifiquement retarder la migration des phosphoprotéines et ainsi faciliter la visualisation des différentes formes d'une protéine, en fonction du nombre de groupements phosphates qu'elles contiennent (271). Dans le cas où cette technique s'avère efficace, elle pourrait également être mise à profit pour préciser quand la Ser95, la Thr291 ou la Ser309 sont phosphorylées. Ceci pourrait être accompli en examinant la migration de Stau1 de type sauvage parallèlement à celle des mutants non-phosphorylables de Stau1⁵⁵, en se servant d'extraits de cellules synchronisées. Enfin, la production d'anticorps dirigés contre les divers phosphosites de Stau1 pourrait être lancée, avec l'objectif de détecter directement la phosphorylation de résidus spécifiques de Stau1 tout au long du cycle cellulaire.

3.4.1.2 Y'a-t-il d'autres phosphosites dans Stau1⁵⁵?

Pour l'instant, on ne peut assumer que la cartographie des sites de phosphorylation de Stau1⁵⁵ que nous avons réalisée soit complète. Afin de générer des peptides de taille adéquate pour le séquençage par spectrométrie de masse, nous avons incubé notre préparation de Stau1⁵⁵-FLAG purifié avec de la trypsine. Ce choix était motivé par le fait que les conditions de digestion par cette enzyme qui clive les liens peptidiques en position C-terminale des lysines et des arginines sont bien établies. Or, la détection par le spectromètre de masse se limite souvent à des peptides dont la masse se situe entre 0,5 et 4 kDa (241). Pour des raisons invoquées dans la section 2.2.6, il est donc évident que des portions de Stau1⁵⁵ ont échappé à notre examen. Dans l'intention d'augmenter la couverture peptidique de la protéine, des endoprotéases possédant d'autres spécificités de

clivage pourraient être testées. Par exemple, l'utilisation de l'enzyme Glu-C est envisageable pour produire des peptides comprenant des parties de la séquence protéique de Stau1⁵⁵ peu représentées lorsque la trypsine est employée préalablement au séquençage par le spectromètre de masse. Comme son nom l'indique, le Glu-C coupe les liens peptidiques en position C-terminale des acides glutamiques.

En second lieu, le protocole que nous avons sélectionné pour immunopurifier Stau1⁵⁵-FLAG ne favorisait pas l'identification de tyrosines phosphorylées. La phosphorylation est une modification réversible et ceci est attribuable à l'action de protéines phosphatases. Alors que Stau1⁵⁵-FLAG a été isolé en présence d'inhibiteurs de sérines/thréonines-phosphatases, nous avons volontairement omis d'inclure des inhibiteurs de tyrosines-phosphatases au cours de la purification à cause de leur incompatibilité chimique avec la résine commerciale dont nous nous sommes servie. Ceci pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas observé de phosphotyrosines (Tableau I de la section 2.2.10), bien que la phosphorylation du résidu équivalent à la Tyr380 de Stau1⁵⁵ humain ait été décrite pour Stau1 de souris (324). Il est aussi probable que cet événement ne soit pas conservé entre les deux espèces ou qu'il soit induit par des voies de signalisation qui n'étaient pas sollicitées dans notre système. Dans le but de vérifier si des tyrosines de Stau1 sont phosphorylées, on pourrait d'abord immunoprécipiter la protéine et ensuite regarder par immunobuvardage de type Western si elle est reconnue par des anticorps dirigés contre les phosphotyrosines. Dans l'éventualité d'un résultat positif, on pourrait songer à reprendre l'étude de la phosphorylation de Stau1 par spectrométrie de masse au moyen d'une autre méthode de purification par immunoaffinité.

Néanmoins, avant de se lancer à la recherche d'autres phosphosites dans Stau1⁵⁵, il serait approprié d'évaluer la contribution relative de la Ser 95, la Thr 291 et de la Ser 309 à l'état global de phosphorylation de la protéine. À cet effet, les marquages métaboliques présentés à la figure 1 de la section 2.2.10 pourraient être répétés en sur-exprimant soit Stau1⁵⁵ de type sauvage, soit de simples, doubles ou triples mutants non-phosphorylables

de Stau1⁵⁵. Le degré d'incorporation de phosphore radioactif par chacune des formes de la protéine serait subséquemment mesuré par autoradiographie. La diminution d'un signal conséquemment à la mutation d'un résidu phosphoaccepteur de Stau1⁵⁵ refléterait en quelque sorte l'importance du site de phosphorylation concerné. Si nous ne parvenons pas à éliminer le radiomarquage de Stau1⁵⁵ malgré l'abolition des trois sites de phosphorylation que nous avons identifiés, nous pourrions avoir recours à des mutants de délétion pour tenter de délimiter les régions de Stau1 qui renferment des sites de phosphorylation dont l'existence n'aurait pas été portée à notre connaissance.

Nous pourrions aussi tirer avantage d'une variante de l'expérience de marquage métabolique que nous avons exécutée pour répondre à plusieurs questions qui subsistent relativement à la phosphorylation de Stau1⁵⁵. Effectivement, en procédant à l'immunoprécipitation d'une protéine marquée au phosphore radioactif puis en l'incubant avec de la trypsine, il est possible de générer une carte de phosphopeptides, qui est obtenue en séparant le produit de digestion par chromatographie bidimensionnelle. Les taches révélées par autoradiographie correspondent à un peptide ayant été modifié par au moins un groupement phosphate. Cette technique pourrait donc être utilisée pour comparer une carte de phosphopeptides de Stau1⁵⁵ avec celles de plusieurs simples mutants non-phosphorylables de la protéine. Si la suppression d'un site de phosphorylation de Stau1⁵⁵ entraîne la disparition d'une tache, on pourrait conclure que le résidu muté est responsable du marquage observé pour la protéine de type sauvage. De la même manière, l'analyse en parallèle de Stau1 endogène permettrait d'estimer si ce dernier est soumis aux mêmes événements de phosphorylation qu'une forme étiquetée et surexprimée de la protéine. Finalement, la présence de taches qui persisteraient en dépit de la mutation de chacun des trois sites de phosphorylation que nous avons localisés dans Stau1⁵⁵ signifierait que de nouveaux sites doivent encore être identifiés.

3.4.1.3 Quelles sont les kinases impliquées dans la phosphorylation de Stau1?

Jusqu'à maintenant, les protéines kinases qui catalysent la phosphorylation de Stau1 restent inconnues. Il serait tout de même intéressant de les découvrir puisque cela nous informerait sur les cascades de signalisation qui régulent potentiellement les différentes fonctions de Stau1. Afin de se mettre sur la piste des kinases responsables de la modification post-traductionnelle de Stau1, nous avons analysé sa séquence protéique avec l'outil de prédiction Scansite (380). Les faits saillants de ce test préliminaire sont d'ailleurs relatés dans la discussion du deuxième article. Nous y avons entre autres rapporté que les phosphosites de Stau1 se trouvent au sein de motifs consensus de phosphorylation par la caséine kinase II (CKII) (Ser 95 et Ser 309), par la protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK) (Ser 95), par les Cdk (Thr 291) et par la "extracellular signal-regulated kinase 1" (ERK1) (Thr291). Pour être à même de déduire quoi que ce soit sur le rôle de ces kinases dans la modification de Stau1, nous devons confirmer leur implication à l'aide de données expérimentales. En vue d'atteindre cet objectif, des essais de phosphorylation *in vitro* avec les différentes kinases candidates pourraient être effectués. Cette stratégie semble prometteuse compte tenu que des expériences réalisées auparavant au laboratoire ont montré que CKII est en mesure de phosphoryler Stau1 *in vitro* (Luc Furic et Luc DesGroseillers, données non-publiées). Il serait aussi pertinent de valider que ces kinases ont la capacité de phosphoryler Stau1 dans un contexte de cellules vivantes. Par contre, avant de s'engager dans ce processus de démonstration, il faudra d'abord optimiser la détection de la phosphorylation sur Stau1 et plusieurs propositions à ce sujet ont été énoncées dans les paragraphes qui précèdent. Une fois cette condition remplie, on pourra alors traiter des cellules avec des inhibiteurs de kinases pour voir si cela bloque la phosphorylation de certains résidus de Stau1. Enfin, il est notable qu'une interaction entre Stau1 et la kinase induisant le facteur nucléaire NF- κ B (NIK) ait été signalée dans une étude protéomique à large échelle (51). NIK est une Ser/Thr kinase qui participe à l'activation du facteur de transcription NF- κ B et son substrat le mieux caractérisé est la

sous-unité α de la kinase de l'inhibiteur de NF- κ B (312). La fonction de l'association entre NIK et Stau1 n'a pas été examinée et il vaudrait donc la peine de vérifier si ces deux protéines ont une relation de type kinase/substrat.

3.4.1.4 Est-ce que la phosphorylation de Stau1 est un processus réversible?

Puisque Stau1 est modifié post-traductionnellement par des protéines kinases, il est vraisemblable qu'il puisse également être déphosphorylé par des protéines phosphatases. À ce propos, une interaction directe entre PP1 et Stau1 via une courte région se trouvant entre la Thr291 et la Ser309 de la protéine a déjà été décrite (362), ce qui tend à suggérer qu'elle soit un substrat de cette enzyme. Cependant, il faut mentionner que les partenaires protéiques de PP1 peuvent établir d'autres types de liens fonctionnels avec la phosphatase. De fait, certains d'entre eux ont pour tâche de cibler PP1 vers des substrats alors que d'autres agissent à titre d'inhibiteurs de l'enzyme (49). Les auteurs de l'étude portant sur le complexe entre Stau1 et PP1 semblent toutefois avoir exclu cette dernière possibilité (362) et il demeure plausible que PP1 module directement la phosphorylation de Stau1. Ainsi, il serait pertinent de tester cette hypothèse en vérifiant si la mutation du motif de reconnaissance de Stau1 par PP1 augmente son niveau de phosphorylation.

3.4.2 Rôle présumé de la phosphorylation du TBD de Stau1 dans la régulation du SMD

Dans le but de mieux saisir les conséquences de la phosphorylation de Stau1 sur ses activités de régulateur post-transcriptionnel, nous avons accompli divers essais en employant des mutants phosphomimétiques et non-phosphorylables de la protéine (Figures 4 et 5 de la section 2.2.10). De cette façon, nous avons découvert que des formes de Stau1 dans lesquelles la Thr291 ou la Ser309 ont été remplacées par des acides aspartiques pour simuler la phosphorylation de ces acides aminés co-immunoprécipitent moins bien UPF1 que leur version alanine non-phosphorylable. Ces résidus se situent dans le TBD de Stau1 qui est de surcroît le domaine nécessaire à l'association entre la protéine et UPF1. Ce

résultat nous laisse donc supposer qu'une étape essentielle au SMD, soit le recrutement d'UPF1 sur un ARNm par Stau1, se trouve sous le contrôle de voies de signalisation.

3.4.2.1 La phosphorylation de Stau1 pourrait bloquer son interaction avec UPF1

Pour l'instant, le raisonnement voulant que la phosphorylation du TBD de Stau1 empêche sa liaison à UPF1 se base sur une preuve indirecte parce qu'il a été émis à la suite de nos travaux où furent utilisés des mutants phosphomimétiques de la protéine. Or, nous ne pouvons affirmer hors de tout doute que les mutations que nous avons introduites se substituent parfaitement à des événements de phosphorylation. Il serait donc indiqué de confirmer par d'autres moyens que la modification de la Thr 291 ou de la Ser 309 de Stau1 interfère avec son association à UPF1. Cette démonstration pourrait être effectuée dans le cas où l'on arrive à phosphoryler *in vitro* l'un ou l'autre des phosphosites du TBD. Des expériences de précipitation avec la glutathione S-transférase (GST) qui ont précédemment servi à révéler une interaction entre Stau1 et UPF1 *in vitro* (268) pourraient alors être reprises pour évaluer concrètement l'impact de la phosphorylation de la protéine sur le recrutement de son partenaire.

En admettant que le remplacement de la Thr 291 et de la Ser 309 de Stau1 par un acide aspartique imite adéquatément leur phosphorylation constitutive, le fait que chacune de ces mutations compromette de manière comparable la co-immunoprécipitation d'UPF1 sans la supprimer totalement soulève quelques préoccupations. Effectivement, puisque des traces d'UPF1 sont détectées dans l'éluat des immunoprécipitations de ces deux mutants (Figure 5 de la section 2.2.10), on peut se demander si la phosphorylation simultanée des deux sites du TBD est requise pour abolir complètement l'association entre Stau1 et UPF1. Pour tenter de répondre à cette question, il sera important de générer un double mutant phosphomimétique pour voir s'il perd complètement la capacité de co-purifier UPF1. Autrement, il est envisageable que la phosphorylation de l'un ou l'autre des sites du TBD de Stau1 soit suffisante pour produire un effet négatif tangible sur l'efficacité du SMD. En l'occurrence, compte tenu que la Thr 291 et la Ser 309 sont potentiellement les substrats de

kinases distinctes (section 3.4.1.3), nos observations évoquent l'idée que le mécanisme de dégradation d'ARNm dépendant de Stau1 puisse être régulé en intégrant les signaux de plus d'une cascade de signalisation, tel que montré pour d'autres protéines (93). Afin d'explorer cette avenue de recherche, il serait intéressant de recourir à un double mutant non-phosphorylable du TBD pour vérifier s'il recrute mieux UPF1 que la protéine de type sauvage.

Dans l'éventualité où les sites de phosphorylation que nous avons mis en évidence jouent réellement un rôle dans la modulation des activités de Stau1, on pourrait s'attendre à ce qu'ils soient conservés à travers les espèces (47). En procédant à l'alignement des séquences protéiques de Stau1 de divers organismes, on remarque que la Thr 291 est présente chez les mammifères et les oiseaux alors que la Ser 309 est pour sa part absente chez les rongeurs (Figure 3 de la section 2.2.10). Cette dernière constatation peut paraître étonnante en considérant que le SMD est fonctionnel dans des lignés cellulaires humaines ainsi que chez la souris où il est impliqué dans la différenciation cellulaire (85, 186, 187, 268, 269). Il faut toutefois préciser que chez le rat et la souris, une Ser se trouve à une position en amont du résidu correspondant à la Ser 309 de la protéine Stau1 humaine. Ceci dénote une certaine conservation car le programme Scansite prédit que cette Ser du TBD de la protéine des rongeurs est possiblement phosphorylée par CKII, au même titre que la Ser 309 de l'orthologue Stau1 humain (section 3.4.3.1). Notre analyse laisse entrevoir que le mécanisme de régulation du SMD que nous proposons pourrait avoir cours chez plusieurs espèces, bien que cela devra faire l'objet d'examen plus approfondis.

3.4.2.2 Est-ce que la phosphorylation du TBD de Stau1 inhibe le SMD?

Dans la mesure où la phosphorylation de Stau1 empêche sa liaison à UPF1, elle devrait logiquement mener à la stabilisation des transcrits soumis au SMD. Une de nos futures priorités sera donc d'étayer cette thèse à l'aide de données expérimentales et pour atteindre cet objectif, plusieurs options s'offrent à nous. À prime abord, il est connu que

l'utilisation d'ARN interférents visant à diminuer l'expression endogène de Stau1 résulte en une élévation des niveaux des messagers régulés par le SMD (85, 186, 187, 268, 269). En contrepartie, il n'a jamais été montré que la surexpression de Stau1 déstabilise encore plus ces ARNm. Ce type d'expérience pourrait donc être entrepris en mesurant l'abondance d'une cible connue du SMD dans des extraits de cellules contrôle pour la comparer à celle relevée dans des extraits de cellules surexprimant Stau1. Advenant qu'une hausse des niveaux de Stau1 augmente l'efficacité de déclenchement du SMD, on pourrait alors s'assurer que l'expression des mutants phosphomimétiques du TBD n'occasionne aucun changement, tel qu'attendu si la phosphorylation de Stau1 bloque son association à UPF1. En second lieu, si la stabilisation apparente des cibles du SMD lors de la déplétion de Stau1 est réellement due à l'absence de ce dernier, le SMD devrait être rétabli en exprimant une forme de la protéine dont le transcrit reste insensible à l'action de l'ARN interférent employé. Des essais de ce genre pourraient être accomplis en transfectant d'abord de petits ARN interférents ciblant Stau1 et des plasmides codant soit pour la protéine de type sauvage, soit pour les mutants phosphomimétiques du TBD. Par la suite, on pourrait déterminer les niveaux d'un substrat confirmé du SMD pour identifier les conditions où cette voie de dégradation semble à nouveau fonctionner. Si nos suppositions sont valables, nous présumons que seule l'expression de Stau1 et non celle des versions de la protéine imitant sa phosphorylation parvient à compenser pour l'inhibition du SMD provoquée par l'ARN interférent. Enfin, il a déjà été montré que le recrutement d'une forme de Stau1 fusionnée à la protéine de l'enveloppe du bactériophage MS2 sur le 3'UTR d'un ARNm rapporteur via des éléments structurés reconnus par cette protéine virale suffit pour réduire son abondance (268). Ce système pourrait être une fois de plus mis à profit pour voir si les mutants phosphomimétiques du TBD de Stau1 échouent à envoyer un messager rapporteur à la dégradation.

Il existe un précédent en ce qui a trait à la description d'un mécanisme de contrôle du SMD. Effectivement, tel que discuté dans le deuxième article présenté au chapitre 2, des travaux en provenance du laboratoire de Lynne Maquat ont mis en lumière que le SMD

(qui requiert Stau1) et le NMD (qui requiert UPF2) entrent en compétition l'un avec l'autre (186). Cette conclusion, justifiée par le fait que Stau1 et UPF2 se lient au même site sur UPF1, a mené à l'idée que l'efficacité d'un processus de dégradation d'ARNm par rapport à l'autre reflète la capacité relative des deux facteurs à recruter UPF1. À première vue, on pourrait donc penser que l'abondance de Stau1 versus celle d'UPF2 dicte le choix de la voie empruntée, tel que suggéré dans l'article publié par l'équipe de Lynne Maquat. Or, cette interprétation simple peut en quelque sorte être remise en doute par une étude de protéomique quantitative à large échelle qui montre que les niveaux cellulaires de Stau1 sont au moins cinq fois plus élevés que ceux d'UPF2 dans la lignée cellulaire de souris NIH3T3 (449). Dans de telles circonstances, si la destruction de transcrits par l'intermédiaire de Stau1 ou d'UPF2 dépendait uniquement des quantités absolues de chacune des protéines, la probabilité que survienne le NMD demeurerait très faible. Par conséquent, nous émettons l'hypothèse que la phosphorylation du TBD de Stau1 puisse avoir des répercussions à la fois sur le SMD et le NMD en empêchant la liaison de la protéine à UPF1.

3.4.2.3 Régulation du SMD au cours du cycle cellulaire

Un autre des facettes de la régulation du SMD qui ressort de l'analyse de nos résultats est que la dégradation d'ARNm dépendante de Stau1 pourrait varier en fonction du cycle de division cellulaire. Plus précisément, nous avons rapporté que l'interaction entre Stau1 et UPF1 diminue significativement dans des cellules mitotiques, comparativement à ce qui est observé dans des cellules asynchrones (Figure 6 de la section 2.2.10). Nous croyons qu'il serait capital de s'attarder plus longuement à cet aspect du contrôle de l'association entre Stau1 et UPF1 puisque certaines des cibles potentielles du SMD codent pour des protéines qui jouent des rôles dans le métabolisme et la prolifération cellulaires (268, 269). À la lueur de ces informations on peut aussi s'interroger sur la possibilité que le SMD contribue à la progression dans le cycle cellulaire. Afin d'aborder le sujet, il serait approprié de regarder de quelle manière évolue l'association entre Stau1 et

UPF1 au fil du cycle cellulaire. Ceci pourrait être mis en œuvre en procédant à des immunoprécipitations de Stau1 à partir d'extraits de cellules synchronisées dans différentes phases du cycle cellulaire, pour ensuite estimer le degré de co-purification d'UPF1. Dans le cas où ces expériences témoignent d'une modulation du SMD durant le cycle cellulaire, nous pourrions tenter de voir s'il existe une corrélation négative entre la formation du complexe Stau1/UPF1 et la phosphorylation du TBD de Stau1, tel que proposé dans la discussion du 2e article présenté dans la section résultats.

3.4.3 La phosphorylation de Stau1 remplit-elle d'autres fonctions?

Pour le moment, nous ne sommes pas parvenus à attribuer un rôle régulateur à la phosphorylation de la Ser 95. En considérant que ce résidu se trouve à proximité du domaine de Stau1 majoritairement responsable de son activité de liaison à l'ARN double-brin, nous nous attendions à ce que sa modification puisse moduler l'affinité de la protéine pour ses ligands. À cet égard, plusieurs études témoignent d'un impact de la phosphorylation aux environs ou à l'intérieur de domaines de liaison à l'ARN sur la capacité des protéines qui arborent ces motifs à s'associer à l'ARN. Alors que plusieurs travaux font état d'événements de phosphorylation qui interfèrent avec la liaison à l'ARN (111, 228, 385, 391, 512), certaines recherches montrent au contraire que l'acquisition de groupements phosphates par une protéine va promouvoir cette activité (121, 468). En ce qui concerne Stau1, nous ne pouvons pas exclure que son interaction avec des transcrits soit contrôlée par sa phosphorylation, tel qu'expliqué à la section 2.2.6. Néanmoins, les résultats que nous avons obtenus vont en quelque sorte à l'encontre de cette idée. En effet, des essais que nous avons exécutés indiquent que peu importe le statut de modification des phosphosites de Stau1, son habileté à dé-réprimer la traduction est maintenue (Figure 4 de la section 2.2.10). Puisque cette fonction de Stau1 dépend entièrement de sa capacité à lier des messagers, nous assumons que les diverses formes phosphomimétiques ou non-phosphorylables de la protéine possèdent une affinité similaire pour l'ARN. Malgré cela, il nous paraît nécessaire de confirmer de façon plus directe que les mutants de

phosphorylation de Stau1 lient l'ARN sans difficulté. Dans cette perspective, nous pourrions d'abord immunopurifier ces mutants à partir d'extraits de cellules les exprimant pour ensuite évaluer leur activité de liaison à l'ARN *in vitro* par buvardage de type Northwestern, comme nous l'avons fait auparavant (131).

3.4.3.1 Existe-t-il un lien entre la phosphorylation et la stabilité de Stau1?

Somme toute, il se peut que la phosphorylation de la Ser 95 soit un événement sans réelle signification fonctionnelle et en ce sens, la conception qu'une fraction importante de modifications post-traductionnelles ne joue pas de rôle biologique a commencé à émerger (35, 287, 308). Cependant, avant d'en arriver à cette conclusion, il reste une possibilité que nous n'avons pas eu le loisir d'examiner. À ce propos, il est pertinent de souligner que la Ser 95 se situe tout juste en aval de la portion N-terminale de Stau1 et que cette région est essentielle à l'interaction de la protéine avec les co-activateurs de l'APC/C (section 3.1.1.2). De façon intéressante, il été plusieurs fois rapporté que des substrats de l'APC/C soient protégés de la dégradation par leur phosphorylation aux abords des motifs reconnus par l'enzyme (162, 216, 315, 331, 428, 467, 520, 540). En toute logique, nous supposons donc que la phosphorylation de Stau1 pourrait influencer sa stabilité. D'ailleurs, nous avons récemment répété les expériences d'isolation de Stau1 puis de séquençage par spectrométrie de masse, ce qui nous a permis de découvrir que la Ser 384 de Stau1 est également phosphorylée (données non-montrées). Il est notable que cette Ser totalement conservée chez les chordés se trouve tout près d'un autre domaine de Stau1 impliqué dans sa destruction dépendante de l'APC/C, soit la D box (Figure 5 de la section 2.1.10 et données non montrées). À la lumière de toutes ces indications, il nous semble impératif de vérifier si la phosphorylation de Stau1 bloque son recrutement par Cdh1 ou Cdc20. Le cas échéant, nous pourrions alors considérer que la modulation de la phosphorylation de Stau1 représente un autre moyen de réguler finement l'expression de la protéine, à l'instar de son ubiquitination.

Conclusion

Au moment de se lancer dans les travaux qui ont fait l'objet de cette thèse, la composition des RNP dont fait partie Stau1 commençait à être bien documentée. De même, l'implication de Stau1 dans plusieurs aspect du contrôle post-transcriptionnel de l'expression génique avait été mise en évidence. Néanmoins, aucune étude n'avait encore fait état de mécanismes permettant la régulation de Stau1 et de ses fonctions.

Nous sommes parvenus à dévoiler l'existence de deux voies distinctes qui semblent être en mesure de moduler Stau1. D'une part, nous avons montré que l'APC/C joue un rôle prépondérant dans la dégradation de Stau1 durant la sortie de mitose. Cet événement qui entraîne une importante diminution des niveaux de Stau1 et qui nécessite vraisemblablement son ubiquitination a le potentiel d'affecter toutes les activités de la protéine. D'autre part, nous avons jeté les bases d'un processus qui requiert la phosphorylation de Stau1 et qui pourrait affecter spécifiquement sa capacité à induire la dégradation des ARNm qu'il lie, sans avoir d'impact significatif sur ses autres tâches. Malgré leurs différences évidentes, ces mécanismes présentent un point commun puisque tous deux impliquent la modification post-traductionnelle de Stau1.

L'importance de la première forme de modulation que nous avons découverte est soulignée par le fait que la surexpression de Stau1, même faible, ralentit considérablement la prolifération cellulaire. En considérant que la dérégulation Stau1 a des conséquences aussi marquées, nous pensons qu'il est possible que Stau1 exerce un contrôle sur un ou plusieurs régulateurs d'ARNm qui codent pour des protéines reliées à la progression dans le cycle cellulaire. Par ailleurs, les résultats que nous avons présentés dans le deuxième article illustrent que l'intégration de signaux par des protéines liant l'ARN pourrait se traduire par des changements rapides au niveau de la stabilité de certains transcrits. Somme toute, nous avons montré que Stau1 est régulé par des modifications post-traductionnelles, ce qui

pourrait avoir des répercussions directes sur l'expression des ARNm qui lui sont associés ainsi que sur des processus biologiques cruciaux tel que le cycle cellulaire.

Bibliographie

1. **Abdelmohsen, K., Y. Kuwano, H. H. Kim, and M. Gorospe.** 2008. Posttranscriptional gene regulation by RNA-binding proteins during oxidative stress: implications for cellular senescence. *Biological chemistry* **389**:243-255.
2. **Abdelmohsen, K., R. Pullmann, Jr., A. Lal, H. H. Kim, S. Galban, X. Yang, J. D. Blethrow, M. Walker, J. Shubert, D. A. Gillespie, H. Furneaux, and M. Gorospe.** 2007. Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Molecular cell* **25**:543-557.
3. **Abdelmohsen, K., S. Srikantan, X. Yang, A. Lal, H. H. Kim, Y. Kuwano, S. Galban, K. G. Becker, D. Kamara, R. de Cabo, and M. Gorospe.** 2009. Ubiquitin-mediated proteolysis of HuR by heat shock. *The EMBO journal* **28**:1271-1282.
4. **Ahlskog, J. K., J. K. Bjork, A. N. Elsing, C. Aspelin, M. Kallio, P. Roos-Mattjus, and L. Sistonen.** 2010. Anaphase-promoting complex/cyclosome participates in the acute response to protein-damaging stress. *Molecular and cellular biology* **30**:5608-5620.
5. **Ainger, K., D. Avossa, A. S. Diana, C. Barry, E. Barbarese, and J. H. Carson.** 1997. Transport and localization elements in myelin basic protein mRNA. *The Journal of cell biology* **138**:1077-1087.
6. **Ainger, K., D. Avossa, F. Morgan, S. J. Hill, C. Barry, E. Barbarese, and J. H. Carson.** 1993. Transport and localization of exogenous myelin basic protein mRNA microinjected into oligodendrocytes. *The Journal of cell biology* **123**:431-441.
7. **Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter.** 2002. *Molecular Biology of the Cell.* Garland Science, New York and London.
8. **Algire, M. A., and J. R. Lorsch.** 2006. Where to begin? The mechanism of translation initiation codon selection in eukaryotes. *Current opinion in chemical biology* **10**:480-486.
9. **Allison, R., K. Czaplinski, A. Git, E. Adegbenro, F. Stennard, E. Houliston, and N. Standart.** 2004. Two distinct Staufen isoforms in *Xenopus* are vegetally localized during oogenesis. *RNA (New York, N.Y)* **10**:1751-1763.
10. **Amrani, N., R. Ganesan, S. Kervestin, D. A. Mangus, S. Ghosh, and A. Jacobson.** 2004. A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* **432**:112-118.

11. **Amrani, N., M. S. Sachs, and A. Jacobson.** 2006. Early nonsense: mRNA decay solves a translational problem. *Nature reviews* **7**:415-425.
12. **Andersen, C. B., L. Ballut, J. S. Johansen, H. Chamieh, K. H. Nielsen, C. L. Oliveira, J. S. Pedersen, B. Seraphin, H. Le Hir, and G. R. Andersen.** 2006. Structure of the exon junction core complex with a trapped DEAD-box ATPase bound to RNA. *Science (New York, N.Y)* **313**:1968-1972.
13. **Anderson, J. R., D. Mukherjee, K. Muthukumaraswamy, K. C. Moraes, C. J. Wilusz, and J. Wilusz.** 2006. Sequence-specific RNA binding mediated by the RNase PH domain of components of the exosome. *RNA (New York, N.Y)* **12**:1810-1816.
14. **Anderson, J. S., and R. P. Parker.** 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. *The EMBO journal* **17**:1497-1506.
15. **Aragon, T., E. van Anken, D. Pincus, I. M. Serafimova, A. V. Korennykh, C. A. Rubio, and P. Walter.** 2009. Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signalling sites. *Nature* **457**:736-740.
16. **Ashraf, S. I., A. L. McLoon, S. M. Sclarsic, and S. Kunes.** 2006. Synaptic protein synthesis associated with memory is regulated by the RISC pathway in *Drosophila*. *Cell* **124**:191-205.
17. **Audic, Y., and R. S. Hartley.** 2004. Post-transcriptional regulation in cancer. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **96**:479-498.
18. **Bachand, F., I. Triki, and C. Autexier.** 2001. Human telomerase RNA-protein interactions. *Nucleic acids research* **29**:3385-3393.
19. **Bakheet, T., M. Frevel, B. R. Williams, W. Greer, and K. S. Khabar.** 2001. ARED: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins. *Nucleic acids research* **29**:246-254.
20. **Ballut, L., B. Marchadier, A. Baguet, C. Tomasetto, B. Seraphin, and H. Le Hir.** 2005. The exon junction core complex is locked onto RNA by inhibition of eIF4AIII ATPase activity. *Nature structural & molecular biology* **12**:861-869.

21. **Barbee, S. A., P. S. Estes, A. M. Cziko, J. Hillebrand, R. A. Luedeman, J. M. Collier, N. Johnson, I. C. Howlett, C. Geng, R. Ueda, A. H. Brand, S. F. Newbury, J. E. Wilhelm, R. B. Levine, A. Nakamura, R. Parker, and M. Ramaswami.** 2006. Staufen- and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies. *Neuron* **52**:997-1009.
22. **Barr, F. A., H. H. Sillje, and E. A. Nigg.** 2004. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nature reviews* **5**:429-440.
23. **Barreau, C., L. Paillard, and H. B. Osborne.** 2005. AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic acids research* **33**:7138-7150.
24. **Bashir, T., N. V. Dorrello, V. Amador, D. Guardavaccaro, and M. Pagano.** 2004. Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase. *Nature* **428**:190-193.
25. **Bashir, T., and M. Pagano.** 2004. Don't skip the G1 phase: how APC/CCdh1 keeps SCFSKP2 in check. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **3**:850-852.
26. **Bashirullah, A., S. R. Halsell, R. L. Cooperstock, M. Kloc, A. Karaiskakis, W. W. Fisher, W. Fu, J. K. Hamilton, L. D. Etkin, and H. D. Lipshitz.** 1999. Joint action of two RNA degradation pathways controls the timing of maternal transcript elimination at the midblastula transition in *Drosophila melanogaster*. *The EMBO journal* **18**:2610-2620.
27. **Bassell, G. J., and S. T. Warren.** 2008. Fragile X syndrome: loss of local mRNA regulation alters synaptic development and function. *Neuron* **60**:201-214.
28. **Battle, D. J., and J. A. Doudna.** 2001. The stem-loop binding protein forms a highly stable and specific complex with the 3' stem-loop of histone mRNAs. *RNA (New York, N.Y)* **7**:123-132.
29. **Bechara, E. G., M. C. Didiot, M. Melko, L. Davidovic, M. Bensaid, P. Martin, M. Castets, P. Pognonec, E. W. Khandjian, H. Moine, and B. Bardoni.** 2009. A novel function for fragile X mental retardation protein in translational activation. *PLoS biology* **7**:e16.
30. **Beckmann, K., M. Grskovic, F. Gebauer, and M. W. Hentze.** 2005. A dual inhibitory mechanism restricts msl-2 mRNA translation for dosage compensation in *Drosophila*. *Cell* **122**:529-540.

31. **Behm-Ansmant, I., D. Gatfield, J. Rehwinkel, V. Hilgers, and E. Izaurralde.** 2007. A conserved role for cytoplasmic poly(A)-binding protein 1 (PABPC1) in nonsense-mediated mRNA decay. *The EMBO journal* **26**:1591-1601.
32. **Behm-Ansmant, I., J. Rehwinkel, T. Doerks, A. Stark, P. Bork, and E. Izaurralde.** 2006. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes & development* **20**:1885-1898.
33. **Belanger, G., M. A. Stocksley, M. Vandromme, L. Schaeffer, L. Furic, L. DesGroseillers, and B. J. Jasmin.** 2003. Localization of the RNA-binding proteins Staufen1 and Staufen2 at the mammalian neuromuscular junction. *Journal of neurochemistry* **86**:669-677.
34. **Bell, S. P., and A. Dutta.** 2002. DNA replication in eukaryotic cells. *Annual review of biochemistry* **71**:333-374.
35. **Beltrao, P., V. Albanese, L. R. Kenner, D. L. Swaney, A. Burlingame, J. Villen, W. A. Lim, J. S. Fraser, J. Frydman, and N. J. Krogan.** 2012. Systematic functional prioritization of protein posttranslational modifications. *Cell* **150**:413-425.
36. **Benjamin, D., M. Schmidlin, L. Min, B. Gross, and C. Moroni.** 2006. BRF1 protein turnover and mRNA decay activity are regulated by protein kinase B at the same phosphorylation sites. *Molecular and cellular biology* **26**:9497-9507.
37. **Benmaamar, R., and M. Pagano.** 2005. Involvement of the SCF complex in the control of Cdh1 degradation in S-phase. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **4**:1230-1232.
38. **Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond, and G. J. Hannon.** 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**:363-366.
39. **Bertrand, E., P. Chartrand, M. Schaefer, S. M. Shenoy, R. H. Singer, and R. M. Long.** 1998. Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Molecular cell* **2**:437-445.
40. **Biggs, J. R., L. F. Peterson, Y. Zhang, A. S. Kraft, and D. E. Zhang.** 2006. AML1/RUNX1 phosphorylation by cyclin-dependent kinases regulates the degradation of AML1/RUNX1 by the anaphase-promoting complex. *Molecular and cellular biology* **26**:7420-7429.

41. **Black, D. L.** 2003. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annual review of biochemistry* **72**:291-336.
42. **Blaszczyk, J., J. Gan, J. E. Tropea, D. L. Court, D. S. Waugh, and X. Ji.** 2004. Noncatalytic assembly of ribonuclease III with double-stranded RNA. *Structure* **12**:457-466.
43. **Bloom, J., and F. R. Cross.** 2007. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nature reviews* **8**:149-160.
44. **Blower, M. D., E. Feric, K. Weis, and R. Heald.** 2007. Genome-wide analysis demonstrates conserved localization of messenger RNAs to mitotic microtubules. *The Journal of cell biology* **179**:1365-1373.
45. **Blower, M. D., M. Nachury, R. Heald, and K. Weis.** 2005. A Rae1-containing ribonucleoprotein complex is required for mitotic spindle assembly. *Cell* **121**:223-234.
46. **Bobola, N., R. P. Jansen, T. H. Shin, and K. Nasmyth.** 1996. Asymmetric accumulation of Ash1p in postanaphase nuclei depends on a myosin and restricts yeast mating-type switching to mother cells. *Cell* **84**:699-709.
47. **Boekhorst, J., B. van Breukelen, A. Heck, Jr., and B. Snel.** 2008. Comparative phosphoproteomics reveals evolutionary and functional conservation of phosphorylation across eukaryotes. *Genome biology* **9**:R144.
48. **Bohl, F., C. Kruse, A. Frank, D. Ferring, and R. P. Jansen.** 2000. She2p, a novel RNA-binding protein tethers ASH1 mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p. *The EMBO journal* **19**:5514-5524.
49. **Bollen, M., W. Peti, M. J. Ragusa, and M. Beullens.** 2010. The extended PP1 toolkit: designed to create specificity. *Trends in biochemical sciences* **35**:450-458.
50. **Bono, F., J. Ebert, E. Lorentzen, and E. Conti.** 2006. The crystal structure of the exon junction complex reveals how it maintains a stable grip on mRNA. *Cell* **126**:713-725.
51. **Bouwmeester, T., A. Bauch, H. Ruffner, P. O. Angrand, G. Bergamini, K. Croughton, C. Cruciat, D. Eberhard, J. Gagneur, S. Ghidelli, C. Hopf, B. Huhse, R. Mangano, A. M. Michon, M. Schirle, J. Schlegl, M. Schwab, M. A. Stein, A. Bauer, G. Casari, G. Drewes, A. C. Gavin, D. B. Jackson, G. Joberty, G. Neubauer, J. Rick, B. Kuster, and G. Superti-Furga.** 2004. A physical and

functional map of the human TNF- α /NF- κ B signal transduction pathway. *Nature cell biology* **6**:97-105.

52. **Bramham, C. R., and D. G. Wells.** 2007. Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat Rev Neurosci* **8**:776-789.
53. **Bramham, C. R., P. F. Worley, M. J. Moore, and J. F. Guzowski.** 2008. The immediate early gene *arc/arg3.1*: regulation, mechanisms, and function. *J Neurosci* **28**:11760-11767.
54. **Brendel, C., M. Rehbein, H. J. Kreienkamp, F. Buck, D. Richter, and S. Kindler.** 2004. Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *The Biochemical journal* **384**:239-246.
55. **Brendza, R. P., L. R. Serbus, J. B. Duffy, and W. M. Saxton.** 2000. A function for kinesin I in the posterior transport of oskar mRNA and Staufen protein. *Science (New York, N.Y)* **289**:2120-2122.
56. **Brennan, C. M., I. E. Gallouzi, and J. A. Steitz.** 2000. Protein ligands to HuR modulate its interaction with target mRNAs in vivo. *The Journal of cell biology* **151**:1-14.
57. **Brennan, C. M., and J. A. Steitz.** 2001. HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci* **58**:266-277.
58. **Brenner, H. R., V. Witzemann, and B. Sakmann.** 1990. Imprinting of acetylcholine receptor messenger RNA accumulation in mammalian neuromuscular synapses. *Nature* **344**:544-547.
59. **Briata, P., S. V. Forcales, M. Ponassi, G. Corte, C. Y. Chen, M. Karin, P. L. Puri, and R. Gherzi.** 2005. p38-dependent phosphorylation of the mRNA decay-promoting factor KSRP controls the stability of select myogenic transcripts. *Molecular cell* **20**:891-903.
60. **Brizard, F., M. Luo, and L. Desgroseillers.** 2000. Genomic organization of the human and mouse *stau* genes. *DNA and cell biology* **19**:331-339.
61. **Broadus, J., S. Fuerstenberg, and C. Q. Doe.** 1998. Staufen-dependent localization of prospero mRNA contributes to neuroblast daughter-cell fate. *Nature* **391**:792-795.
62. **Brook, M., C. R. Tchen, T. Santalucia, J. McIlrath, J. S. Arthur, J. Saklatvala, and A. R. Clark.** 2006. Posttranslational regulation of tristetraprolin subcellular localization and protein stability by p38 mitogen-activated protein kinase and

- extracellular signal-regulated kinase pathways. *Molecular and cellular biology* **26**:2408-2418.
63. **Browne, G. J., and C. G. Proud.** 2002. Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells. *European journal of biochemistry / FEBS* **269**:5360-5368.
 64. **Buchner, G., M. T. Bassi, G. Andolfi, A. Ballabio, and B. Franco.** 1999. Identification of a novel homolog of the *Drosophila* staufen protein in the chromosome 8q13-q21.1 region. *Genomics* **62**:113-118.
 65. **Burton, J. L., and M. J. Solomon.** 2001. D box and KEN box motifs in budding yeast Hsl1p are required for APC-mediated degradation and direct binding to Cdc20p and Cdh1p. *Genes & development* **15**:2381-2395.
 66. **Buschhorn, B. A., G. Petzold, M. Galova, P. Dube, C. Kraft, F. Herzog, H. Stark, and J. M. Peters.** 2011. Substrate binding on the APC/C occurs between the coactivator Cdh1 and the processivity factor Doc1. *Nature structural & molecular biology* **18**:6-13.
 67. **Bycroft, M., S. Grunert, A. G. Murzin, M. Proctor, and D. St Johnston.** 1995. NMR solution structure of a dsRNA binding domain from *Drosophila* staufen protein reveals homology to the N-terminal domain of ribosomal protein S5. *The EMBO journal* **14**:3563-3571.
 68. **Cammas, A., S. M. Lewis, S. Vagner, and M. Holcik.** 2008. Post-transcriptional control of gene expression through subcellular relocalization of mRNA binding proteins. *Biochemical pharmacology* **76**:1395-1403.
 69. **Carlberg, U., A. Nilsson, and O. Nygard.** 1990. Functional properties of phosphorylated elongation factor 2. *European journal of biochemistry / FEBS* **191**:639-645.
 70. **Carmena, M., and W. C. Earnshaw.** 2003. The cellular geography of aurora kinases. *Nature reviews* **4**:842-854.
 71. **Caudy, A. A., M. Myers, G. J. Hannon, and S. M. Hammond.** 2002. Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes & development* **16**:2491-2496.
 72. **Ceman, S., W. T. O'Donnell, M. Reed, S. Patton, J. Pohl, and S. T. Warren.** 2003. Phosphorylation influences the translation state of FMRP-associated polyribosomes. *Human molecular genetics* **12**:3295-3305.

73. **Chang, K. Y., and A. Ramos.** 2005. The double-stranded RNA-binding motif, a versatile macromolecular docking platform. *The FEBS journal* **272**:2109-2117.
74. **Chang, N., J. Yi, G. Guo, X. Liu, Y. Shang, T. Tong, Q. Cui, M. Zhan, M. Gorospe, and W. Wang.** 2010. HuR uses AUF1 as a cofactor to promote p16INK4 mRNA decay. *Molecular and cellular biology* **30**:3875-3886.
75. **Chang, T. C., A. Yamashita, C. Y. Chen, Y. Yamashita, W. Zhu, S. Durdan, A. Kahvejian, N. Sonenberg, and A. B. Shyu.** 2004. UNR, a new partner of poly(A)-binding protein, plays a key role in translationally coupled mRNA turnover mediated by the c-fos major coding-region determinant. *Genes & development* **18**:2010-2023.
76. **Chang, Y. F., J. S. Imam, and M. F. Wilkinson.** 2007. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annual review of biochemistry* **76**:51-74.
77. **Chartrand, P., X. H. Meng, S. Huttelmaier, D. Donato, and R. H. Singer.** 2002. Asymmetric sorting of ash1p in yeast results from inhibition of translation by localization elements in the mRNA. *Molecular cell* **10**:1319-1330.
78. **Chartrand, P., X. H. Meng, R. H. Singer, and R. M. Long.** 1999. Structural elements required for the localization of ASH1 mRNA and of a green fluorescent protein reporter particle in vivo. *Curr Biol* **9**:333-336.
79. **Chatel-Chaix, L., L. Abrahamyan, C. Frechina, A. J. Mouland, and L. DesGroseillers.** 2007. The host protein Staufen1 participates in human immunodeficiency virus type 1 assembly in live cells by influencing pr55Gag multimerization. *Journal of virology* **81**:6216-6230.
80. **Chatel-Chaix, L., K. Boulay, A. J. Mouland, and L. Desgroseillers.** 2008. The host protein Staufen1 interacts with the Pr55Gag zinc fingers and regulates HIV-1 assembly via its N-terminus. *Retrovirology* **5**:41.
81. **Chatel-Chaix, L., J. F. Clement, C. Martel, V. Beriault, A. Gatignol, L. DesGroseillers, and A. J. Mouland.** 2004. Identification of Staufen in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Molecular and cellular biology* **24**:2637-2648.
82. **Cheever, A., and S. Ceman.** 2009. Phosphorylation of FMRP inhibits association with Dicer. *RNA (New York, N.Y)* **15**:362-366.

83. **Chen, C. Y., R. Gherzi, S. E. Ong, E. L. Chan, R. Raijmakers, G. J. Pruijn, G. Stoecklin, C. Moroni, M. Mann, and M. Karin.** 2001. AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* **107**:451-464.
84. **Cheng, H., K. Dufu, C. S. Lee, J. L. Hsu, A. Dias, and R. Reed.** 2006. Human mRNA export machinery recruited to the 5' end of mRNA. *Cell* **127**:1389-1400.
85. **Cho, H., K. M. Kim, S. Han, J. Choe, S. G. Park, S. S. Choi, and Y. K. Kim.** 2012. Staufen1-mediated mRNA decay functions in adipogenesis. *Molecular cell* **46**:495-506.
86. **Cho, P. F., F. Poulin, Y. A. Cho-Park, I. B. Cho-Park, J. D. Chicoine, P. Lasko, and N. Sonenberg.** 2005. A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. *Cell* **121**:411-423.
87. **Choi, E., H. Choe, J. Min, J. Y. Choi, J. Kim, and H. Lee.** 2009. BubR1 acetylation at prometaphase is required for modulating APC/C activity and timing of mitosis. *The EMBO journal* **28**:2077-2089.
88. **Choudhary, C., C. Kumar, F. Gnad, M. L. Nielsen, M. Rehman, T. C. Walther, J. V. Olsen, and M. Mann.** 2009. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science (New York, N.Y)* **325**:834-840.
89. **Chow, C., N. Wong, M. Pagano, S. W. Lun, K. I. Nakayama, K. Nakayama, and K. W. Lo.** 2011. Regulation of APC/C(Cdc20) activity by RASSF1A-APC/C(Cdc20) circuitry. *Oncogene*.
90. **Ciechanover, A., and R. Ben-Saadon.** 2004. N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. *Trends in cell biology* **14**:103-106.
91. **Clute, P., and J. Pines.** 1999. Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nature cell biology* **1**:82-87.
92. **Cohen, N., M. Sharma, A. Kentsis, J. M. Perez, S. Strudwick, and K. L. Borden.** 2001. PML RING suppresses oncogenic transformation by reducing the affinity of eIF4E for mRNA. *The EMBO journal* **20**:4547-4559.
93. **Cohen, P.** 2000. The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends in biochemical sciences* **25**:596-601.
94. **Cohen, R. S.** 2005. The role of membranes and membrane trafficking in RNA localization. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **97**:5-18.

95. **Condeelis, J., and R. H. Singer.** 2005. How and why does beta-actin mRNA target? *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **97**:97-110.
96. **Conlon, I., and M. Raff.** 1999. Size control in animal development. *Cell* **96**:235-244.
97. **Conti, E., and E. Izaurralde.** 2005. Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Current opinion in cell biology* **17**:316-325.
98. **Cooper, T. A., L. Wan, and G. Dreyfuss.** 2009. RNA and disease. *Cell* **136**:777-793.
99. **Corbett, J., and M. J. Dunn.** 1993. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of membrane proteins. *Methods Mol Biol* **19**:219-227.
100. **Costinean, S., N. Zanesi, Y. Pekarsky, E. Tili, S. Volinia, N. Heerema, and C. M. Croce.** 2006. Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:7024-7029.
101. **Cui, Y., X. Cheng, C. Zhang, Y. Zhang, S. Li, C. Wang, and T. M. Guadagno.** 2010. Degradation of the human mitotic checkpoint kinase Mps1 is cell cycle-regulated by APC-cCdc20 and APC-cCdh1 ubiquitin ligases. *The Journal of biological chemistry* **285**:32988-32998.
102. **Culjkovic, B., I. Topisirovic, and K. L. Borden.** 2007. Controlling gene expression through RNA regulons: the role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **6**:65-69.
103. **Culjkovic, B., I. Topisirovic, L. Skrabanek, M. Ruiz-Gutierrez, and K. L. Borden.** 2006. eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation. *The Journal of cell biology* **175**:415-426.
104. **Culjkovic, B., I. Topisirovic, L. Skrabanek, M. Ruiz-Gutierrez, and K. L. Borden.** 2005. eIF4E promotes nuclear export of cyclin D1 mRNAs via an element in the 3'UTR. *The Journal of cell biology* **169**:245-256.
105. **da Fonseca, P. C., E. H. Kong, Z. Zhang, A. Schreiber, M. A. Williams, E. P. Morris, and D. Barford.** 2011. Structures of APC/C(Cdh1) with substrates identify Cdh1 and Apc10 as the D-box co-receptor. *Nature* **470**:274-278.

106. **Darnell, J. C., C. E. Fraser, O. Mostovetsky, G. Stefani, T. A. Jones, S. R. Eddy, and R. B. Darnell.** 2005. Kissing complex RNAs mediate interaction between the Fragile-X mental retardation protein KH2 domain and brain polyribosomes. *Genes & development* **19**:903-918.
107. **Davidovic, L., X. H. Jaglin, A. M. Lepagnol-Bestel, S. Tremblay, M. Simonneau, B. Bardoni, and E. W. Khandjian.** 2007. The fragile X mental retardation protein is a molecular adaptor between the neurospecific KIF3C kinesin and dendritic RNA granules. *Human molecular genetics* **16**:3047-3058.
108. **Davis, I.** 2004. A helicase that gets Oskar's message across. *Nature cell biology* **6**:285-287.
109. **De Benedetti, A., and A. L. Harris.** 1999. eIF4E expression in tumors: its possible role in progression of malignancies. *The international journal of biochemistry & cell biology* **31**:59-72.
110. **den Elzen, N., and J. Pines.** 2001. Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. *The Journal of cell biology* **153**:121-136.
111. **Deng, Y., R. H. Singer, and W. Gu.** 2008. Translation of ASH1 mRNA is repressed by Puf6p-Fun12p/eIF5B interaction and released by CK2 phosphorylation. *Genes & development* **22**:1037-1050.
112. **DesGroseillers, L., and N. Lemieux.** 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.
113. **Dever, T. E.** 2002. Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell* **108**:545-556.
114. **Di Fiore, B., and J. Pines.** 2007. Emi1 is needed to couple DNA replication with mitosis but does not regulate activation of the mitotic APC/C. *The Journal of cell biology* **177**:425-437.
115. **Diaz-Moreno, I., D. Hollingworth, T. A. Frenkiel, G. Kelly, S. Martin, S. Howell, M. Garcia-Mayoral, R. Gherzi, P. Briata, and A. Ramos.** 2009. Phosphorylation-mediated unfolding of a KH domain regulates KSRP localization via 14-3-3 binding. *Nature structural & molecular biology* **16**:238-246.
116. **Dictenberg, J. B., S. A. Swanger, L. N. Antar, R. H. Singer, and G. J. Bassell.** 2008. A direct role for FMRP in activity-dependent dendritic mRNA transport links

- filopodial-spine morphogenesis to fragile X syndrome. *Developmental cell* **14**:926-939.
117. **Diem, M. D., C. C. Chan, I. Younis, and G. Dreyfuss.** 2007. PYM binds the cytoplasmic exon-junction complex and ribosomes to enhance translation of spliced mRNAs. *Nature structural & molecular biology* **14**:1173-1179.
 118. **Diffley, J. F.** 2004. Regulation of early events in chromosome replication. *Curr Biol* **14**:R778-786.
 119. **Doller, A., S. Akool el, A. Huwiler, R. Muller, H. H. Radeke, J. Pfeilschifter, and W. Eberhardt.** 2008. Posttranslational modification of the AU-rich element binding protein HuR by protein kinase Cdelta elicits angiotensin II-induced stabilization and nuclear export of cyclooxygenase 2 mRNA. *Molecular and cellular biology* **28**:2608-2625.
 120. **Doller, A., A. Huwiler, R. Muller, H. H. Radeke, J. Pfeilschifter, and W. Eberhardt.** 2007. Protein kinase C alpha-dependent phosphorylation of the mRNA-stabilizing factor HuR: implications for posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2. *Molecular biology of the cell* **18**:2137-2148.
 121. **Doller, A., K. Schlepckow, H. Schwalbe, J. Pfeilschifter, and W. Eberhardt.** 2010. Tandem phosphorylation of serines 221 and 318 by protein kinase Cdelta coordinates mRNA binding and nucleocytoplasmic shuttling of HuR. *Molecular and cellular biology* **30**:1397-1410.
 122. **Dorin, D., M. C. Bonnet, S. Bannwarth, A. Gatignol, E. F. Meurs, and C. Vaquero.** 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. *The Journal of biological chemistry* **278**:4440-4448.
 123. **Dostie, J., and G. Dreyfuss.** 2002. Translation is required to remove Y14 from mRNAs in the cytoplasm. *Curr Biol* **12**:1060-1067.
 124. **Doyle, M., and M. F. Jantsch.** 2002. New and old roles of the double-stranded RNA-binding domain. *Journal of structural biology* **140**:147-153.
 125. **Dreyfuss, G., V. N. Kim, and N. Kataoka.** 2002. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nature reviews* **3**:195-205.

126. **Du, T. G., S. Jellbauer, M. Muller, M. Schmid, D. Niessing, and R. P. Jansen.** 2008. Nuclear transit of the RNA-binding protein She2 is required for translational control of localized ASH1 mRNA. *EMBO reports* **9**:781-787.
127. **Du, T. G., M. Schmid, and R. P. Jansen.** 2007. Why cells move messages: the biological functions of mRNA localization. *Seminars in cell & developmental biology* **18**:171-177.
128. **Dubnau, J., A. S. Chiang, L. Grady, J. Barditch, S. Gossweiler, J. McNeil, P. Smith, F. Buldoc, R. Scott, U. Certa, C. Broger, and T. Tully.** 2003. The stauflen/pumilio pathway is involved in Drosophila long-term memory. *Curr Biol* **13**:286-296.
129. **Duchaine, T., H. J. Wang, M. Luo, S. V. Steinberg, I. R. Nabi, and L. DesGroseillers.** 2000. A novel murine Staufen isoform modulates the RNA content of Staufen complexes. *Molecular and cellular biology* **20**:5592-5601.
130. **Duchaine, T. F., I. Hemraj, L. Furic, A. Deitinghoff, M. A. Kiebler, and L. DesGroseillers.** 2002. Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *Journal of cell science* **115**:3285-3295.
131. **Dugre-Brisson, S., G. Elvira, K. Boulay, L. Chatel-Chaix, A. J. Mouland, and L. DesGroseillers.** 2005. Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs. *Nucleic acids research* **33**:4797-4812.
132. **Duncan, K., J. G. Umen, and C. Guthrie.** 2000. A putative ubiquitin ligase required for efficient mRNA export differentially affects hnRNP transport. *Curr Biol* **10**:687-696.
133. **Dunckley, T., and R. Parker.** 1999. The DCP2 protein is required for mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae* and contains a functional MutT motif. *The EMBO journal* **18**:5411-5422.
134. **Dunn, E. F., C. M. Hammell, C. A. Hodge, and C. N. Cole.** 2005. Yeast poly(A)-binding protein, Pab1, and PAN, a poly(A) nuclease complex recruited by Pab1, connect mRNA biogenesis to export. *Genes & development* **19**:90-103.
135. **Dynes, J. L., and O. Steward.** 2007. Dynamics of bidirectional transport of Arc mRNA in neuronal dendrites. *The Journal of comparative neurology* **500**:433-447.

136. **Eberle, A. B., S. Lykke-Andersen, O. Muhlemann, and T. H. Jensen.** 2009. SMG6 promotes endonucleolytic cleavage of nonsense mRNA in human cells. *Nature structural & molecular biology* **16**:49-55.
137. **Eliscovich, C., I. Peset, I. Vernos, and R. Mendez.** 2008. Spindle-localized CPE-mediated translation controls meiotic chromosome segregation. *Nature cell biology* **10**:858-865.
138. **Engelbert, D., D. Schnerch, A. Baumgarten, and R. Wasch.** 2008. The ubiquitin ligase APC(Cdh1) is required to maintain genome integrity in primary human cells. *Oncogene* **27**:907-917.
139. **Eom, T., L. N. Antar, R. H. Singer, and G. J. Bassell.** 2003. Localization of a beta-actin messenger ribonucleoprotein complex with zipcode-binding protein modulates the density of dendritic filopodia and filopodial synapses. *J Neurosci* **23**:10433-10444.
140. **Ephrussi, A., L. K. Dickinson, and R. Lehmann.** 1991. Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell* **66**:37-50.
141. **Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, and E. Izaurralde.** 2007. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nature reviews* **8**:9-22.
142. **Fa-Hui, N., Y. Hai-Feng, Q. Rui-Feng, L. Xin, and W. Cai-Bin.** 2008. Characterization of a novel transcript variant of human STAU1 gene. *Acta biochimica Polonica* **55**:473-478.
143. **Fahling, M., R. Mrowka, A. Steege, K. M. Kirschner, E. Benko, B. Forstera, P. B. Persson, B. J. Thiele, J. C. Meier, and H. Scholz.** 2009. Translational regulation of the human achaete-scute homologue-1 by fragile X mental retardation protein. *The Journal of biological chemistry* **284**:4255-4266.
144. **Fan, X. C., and J. A. Steitz.** 1998. HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:15293-15298.
145. **Fan, X. C., and J. A. Steitz.** 1998. Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *The EMBO journal* **17**:3448-3460.
146. **Fang, G., H. Yu, and M. W. Kirschner.** 1998. Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Molecular cell* **2**:163-171.

147. **Ferrandon, D., L. Elphick, C. Nusslein-Volhard, and D. St Johnston.** 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.
148. **Fierro-Monti, I., and M. B. Mathews.** 2000. Proteins binding to duplexed RNA: one motif, multiple functions. *Trends in biochemical sciences* **25**:241-246.
149. **Finley, D., S. Sadis, B. P. Monia, P. Boucher, D. J. Ecker, S. T. Crooke, and V. Chau.** 1994. Inhibition of proteolysis and cell cycle progression in a multiubiquitination-deficient yeast mutant. *Molecular and cellular biology* **14**:5501-5509.
150. **Floyd, S., J. Pines, and C. Lindon.** 2008. APC/C Cdh1 targets aurora kinase to control reorganization of the mitotic spindle at anaphase. *Curr Biol* **18**:1649-1658.
151. **Forrest, K. M., and E. R. Gavis.** 2003. Live imaging of endogenous RNA reveals a diffusion and entrapment mechanism for nanos mRNA localization in *Drosophila*. *Curr Biol* **13**:1159-1168.
152. **Fortes, P., T. Inada, T. Preiss, M. W. Hentze, I. W. Mattaj, and A. B. Sachs.** 2000. The yeast nuclear cap binding complex can interact with translation factor eIF4G and mediate translation initiation. *Molecular cell* **6**:191-196.
153. **Franks, T. M., and J. Lykke-Andersen.** 2007. TTP and BRF proteins nucleate processing body formation to silence mRNAs with AU-rich elements. *Genes & development* **21**:719-735.
154. **Frohnhofer, H. G., and C. Nusslein-Volhard.** 1986. Organization of anterior pattern in the *Drosophila* embryo by the maternal gene bicoid. *Nature* **324**:120-125.
155. **Fuerstenberg, S., C. Y. Peng, P. Alvarez-Ortiz, T. Hor, and C. Q. Doe.** 1998. Identification of Miranda protein domains regulating asymmetric cortical localization, cargo binding, and cortical release. *Molecular and cellular neurosciences* **12**:325-339.
156. **Fukasawa, K.** 2007. Oncogenes and tumour suppressors take on centrosomes. *Nat Rev Cancer* **7**:911-924.
157. **Furic, L., M. Maher-Laporte, and L. DesGroseillers.** 2008. A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes. *RNA (New York, N.Y)* **14**:324-335.

158. **Furuno, N., N. den Elzen, and J. Pines.** 1999. Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. *The Journal of cell biology* **147**:295-306.
159. **Futcher, B.** 2002. Transcriptional regulatory networks and the yeast cell cycle. *Current opinion in cell biology* **14**:676-683.
160. **Gaasterland, T., and S. Bekiranov.** 2000. Making the most of microarray data. *Nature genetics* **24**:204-206.
161. **Gallouzi, I. E., and J. A. Steitz.** 2001. Delineation of mRNA export pathways by the use of cell-permeable peptides. *Science (New York, N.Y)* **294**:1895-1901.
162. **Gao, D., H. Inuzuka, A. Tseng, R. Y. Chin, A. Toker, and W. Wei.** 2009. Phosphorylation by Akt1 promotes cytoplasmic localization of Skp2 and impairs APCDdh1-mediated Skp2 destruction. *Nature cell biology* **11**:397-408.
163. **Gao, Y., V. Tatavarty, G. Korza, M. K. Levin, and J. H. Carson.** 2008. Multiplexed dendritic targeting of alpha calcium calmodulin-dependent protein kinase II, neurogranin, and activity-regulated cytoskeleton-associated protein RNAs by the A2 pathway. *Molecular biology of the cell* **19**:2311-2327.
164. **Garcia-Gras, E. A., P. Chi, and E. A. Thompson.** 2000. Glucocorticoid-mediated destabilization of cyclin D3 mRNA involves RNA-protein interactions in the 3'-untranslated region of the mRNA. *The Journal of biological chemistry* **275**:22001-22008.
165. **Garcia-Higuera, I., E. Manchado, P. Dubus, M. Canamero, J. Mendez, S. Moreno, and M. Malumbres.** 2008. Genomic stability and tumour suppression by the APC/C cofactor Cdh1. *Nature cell biology* **10**:802-811.
166. **Garneau, N. L., J. Wilusz, and C. J. Wilusz.** 2007. The highways and byways of mRNA decay. *Nature reviews* **8**:113-126.
167. **Gatfield, D., and E. Izaurralde.** 2004. Nonsense-mediated messenger RNA decay is initiated by endonucleolytic cleavage in *Drosophila*. *Nature* **429**:575-578.
168. **Gatfield, D., and E. Izaurralde.** 2002. REF1/Aly and the additional exon junction complex proteins are dispensable for nuclear mRNA export. *The Journal of cell biology* **159**:579-588.
169. **Gauci, S., A. O. Helbig, M. Slijper, J. Krijgsveld, A. J. Heck, and S. Mohammed.** 2009. Lys-N and trypsin cover complementary parts of the phosphoproteome in a refined SCX-based approach. *Anal Chem* **81**:4493-4501.

170. **Gautrey, H., J. McConnell, M. Lako, J. Hall, and J. Hesketh.** 2008. Staufen1 is expressed in preimplantation mouse embryos and is required for embryonic stem cell differentiation. *Biochimica et biophysica acta* **1783**:1935-1942.
171. **Gebauer, F., and M. W. Hentze.** 2004. Molecular mechanisms of translational control. *Nature reviews* **5**:827-835.
172. **Gehring, N. H., S. Lamprinaki, A. E. Kulozik, and M. W. Hentze.** 2009. Disassembly of exon junction complexes by PYM. *Cell* **137**:536-548.
173. **Geley, S., E. Kramer, C. Gieffers, J. Gannon, J. M. Peters, and T. Hunt.** 2001. Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint. *The Journal of cell biology* **153**:137-148.
174. **Ghaemmaghami, S., W. K. Huh, K. Bower, R. W. Howson, A. Belle, N. Dephoure, E. K. O'Shea, and J. S. Weissman.** 2003. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**:737-741.
175. **Gherzi, R., K. Y. Lee, P. Briata, D. Wegmuller, C. Moroni, M. Karin, and C. Y. Chen.** 2004. A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery. *Molecular cell* **14**:571-583.
176. **Gherzi, R., M. Trabucchi, M. Ponassi, T. Ruggiero, G. Corte, C. Moroni, C. Y. Chen, K. S. Khabar, J. S. Andersen, and P. Briata.** 2006. The RNA-binding protein KSRP promotes decay of beta-catenin mRNA and is inactivated by PI3K-AKT signaling. *PLoS biology* **5**:e5.
177. **Gilbert, W., and C. Guthrie.** 2004. The Glc7p nuclear phosphatase promotes mRNA export by facilitating association of Mex67p with mRNA. *Molecular cell* **13**:201-212.
178. **Gilbert, W., C. W. Siebel, and C. Guthrie.** 2001. Phosphorylation by Sky1p promotes Npl3p shuttling and mRNA dissociation. *RNA (New York, N.Y)* **7**:302-313.
179. **Giles, K. M., J. M. Daly, D. J. Beveridge, A. M. Thomson, D. C. Voon, H. M. Furneaux, J. A. Jazayeri, and P. J. Ledman.** 2003. The 3'-untranslated region of p21WAF1 mRNA is a composite cis-acting sequence bound by RNA-binding proteins from breast cancer cells, including HuR and poly(C)-binding protein. *The Journal of biological chemistry* **278**:2937-2946.

180. **Gingras, A. C., B. Raught, and N. Sonenberg.** 1999. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annual review of biochemistry* **68**:913-963.
181. **Giorgi, C., and M. J. Moore.** 2007. The nuclear nurture and cytoplasmic nature of localized mRNPs. *Seminars in cell & developmental biology* **18**:186-193.
182. **Giorgi, C., G. W. Yeo, M. E. Stone, D. B. Katz, C. Burge, G. Turrigiano, and M. J. Moore.** 2007. The EJC factor eIF4AIII modulates synaptic strength and neuronal protein expression. *Cell* **130**:179-191.
183. **Glisovic, T., J. L. Bachorik, J. Yong, and G. Dreyfuss.** 2008. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS letters* **582**:1977-1986.
184. **Glotzer, M., A. W. Murray, and M. W. Kirschner.** 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**:132-138.
185. **Goldstrohm, A. C., and M. Wickens.** 2008. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nature reviews* **9**:337-344.
186. **Gong, C., Y. K. Kim, C. F. Woeller, Y. Tang, and L. E. Maquat.** 2009. SMD and NMD are competitive pathways that contribute to myogenesis: effects on PAX3 and myogenin mRNAs. *Genes & development* **23**:54-66.
187. **Gong, C., and L. E. Maquat.** 2011. lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature* **470**:284-288.
188. **Gong, D., J. R. Pomerening, J. W. Myers, C. Gustavsson, J. T. Jones, A. T. Hahn, T. Meyer, and J. E. Ferrell, Jr.** 2007. Cyclin A2 regulates nuclear-envelope breakdown and the nuclear accumulation of cyclin B1. *Curr Biol* **17**:85-91.
189. **Gonzalez, I., S. B. Buonomo, K. Nasmyth, and U. von Ahsen.** 1999. ASH1 mRNA localization in yeast involves multiple secondary structural elements and Ash1 protein translation. *Curr Biol* **9**:337-340.
190. **Green, S. R., and M. B. Mathews.** 1992. Two RNA-binding motifs in the double-stranded RNA-activated protein kinase, DAI. *Genes & development* **6**:2478-2490.
191. **Greenbaum, D., C. Colangelo, K. Williams, and M. Gerstein.** 2003. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome biology* **4**:117.

192. **Groppo, R., and J. D. Richter.** 2009. Translational control from head to tail. *Current opinion in cell biology*.
193. **Grosset, C., C. Y. Chen, N. Xu, N. Sonenberg, H. Jacquemin-Sablon, and A. B. Shyu.** 2000. A mechanism for translationally coupled mRNA turnover: interaction between the poly(A) tail and a c-fos RNA coding determinant via a protein complex. *Cell* **103**:29-40.
194. **Gu, W., Y. Deng, D. Zenklusen, and R. H. Singer.** 2004. A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses ASH1 mRNA translation and is required for its localization. *Genes & development* **18**:1452-1465.
195. **Guardavaccaro, D., and M. Pagano.** 2006. Stabilizers and destabilizers controlling cell cycle oscillators. *Molecular cell* **22**:1-4.
196. **Guertin, D. A., S. Trautmann, and D. McCollum.** 2002. Cytokinesis in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**:155-178.
197. **Gurden, M. D., A. J. Holland, W. van Zon, A. Tighe, M. A. Vergnolle, D. A. Andres, H. P. Spielmann, M. Malumbres, R. M. Wolthuis, D. W. Cleveland, and S. S. Taylor.** 2010. Cdc20 is required for the post-anaphase, KEN-dependent degradation of centromere protein F. *Journal of cell science* **123**:321-330.
198. **Gutierrez, G. J., T. Tsuji, M. Chen, W. Jiang, and Z. A. Ronai.** 2010. Interplay between Cdh1 and JNK activity during the cell cycle. *Nature cell biology* **12**:686-695.
199. **Guzowski, J. F., G. L. Lyford, G. D. Stevenson, F. P. Houston, J. L. McGaugh, P. F. Worley, and C. A. Barnes.** 2000. Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* **20**:3993-4001.
200. **Gwizdek, C., M. Hobeika, B. Kus, B. Ossareh-Nazari, C. Dargemont, and M. S. Rodriguez.** 2005. The mRNA nuclear export factor Hpr1 is regulated by Rsp5-mediated ubiquitylation. *The Journal of biological chemistry* **280**:13401-13405.
201. **Gwizdek, C., N. Iglesias, M. S. Rodriguez, B. Ossareh-Nazari, M. Hobeika, G. Divita, F. Stutz, and C. Dargemont.** 2006. Ubiquitin-associated domain of Mex67 synchronizes recruitment of the mRNA export machinery with transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:16376-16381.

202. **Gygi, S. P., Y. Rochon, B. R. Franza, and R. Aebersold.** 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and cellular biology* **19**:1720-1730.
203. **Haber, J. E.** 1998. Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual review of genetics* **32**:561-599.
204. **Hachet, O., and A. Ephrussi.** 2004. Splicing of oskar RNA in the nucleus is coupled to its cytoplasmic localization. *Nature* **428**:959-963.
205. **Hartman, T. R., S. Qian, C. Bolinger, S. Fernandez, D. R. Schoenberg, and K. Boris-Lawrie.** 2006. RNA helicase A is necessary for translation of selected messenger RNAs. *Nature structural & molecular biology* **13**:509-516.
206. **Hartwell, L. H., J. Culotti, J. R. Pringle, and B. J. Reid.** 1974. Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science (New York, N.Y)* **183**:46-51.
207. **Hentze, M. W., M. U. Muckenthaler, and N. C. Andrews.** 2004. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* **117**:285-297.
208. **Herold, A., M. Suyama, J. P. Rodrigues, I. C. Braun, U. Kutay, M. Carmo-Fonseca, P. Bork, and E. Izaurralde.** 2000. TAP (NXF1) belongs to a multigene family of putative RNA export factors with a conserved modular architecture. *Molecular and cellular biology* **20**:8996-9008.
209. **Hershko, A., and A. Ciechanover.** 1998. The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry* **67**:425-479.
210. **Hertel, K. J.** 2008. Combinatorial control of exon recognition. *The Journal of biological chemistry* **283**:1211-1215.
211. **Hicke, L.** 2001. Protein regulation by monoubiquitin. *Nature reviews* **2**:195-201.
212. **Hitti, E., T. Iakovleva, M. Brook, S. Deppenmeier, A. D. Gruber, D. Radzioch, A. R. Clark, P. J. Blackshear, A. Kotlyarov, and M. Gaestel.** 2006. Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element. *Molecular and cellular biology* **26**:2399-2407.
213. **Hogan, D. J., D. P. Riordan, A. P. Gerber, D. Herschlag, and P. O. Brown.** 2008. Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *PLoS biology* **6**:e255.

214. **Holcik, M., and N. Sonenberg.** 2005. Translational control in stress and apoptosis. *Nature reviews* **6**:318-327.
215. **Hollien, J., and J. S. Weissman.** 2006. Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science (New York, N.Y)* **313**:104-107.
216. **Holt, L. J., A. N. Krutchinsky, and D. O. Morgan.** 2008. Positive feedback sharpens the anaphase switch. *Nature* **454**:353-357.
217. **Hong, K. U., Y. S. Park, Y. S. Seong, D. Kang, C. D. Bae, and J. Park.** 2007. Functional importance of the anaphase-promoting complex-Cdh1-mediated degradation of TMAP/CKAP2 in regulation of spindle function and cytokinesis. *Molecular and cellular biology* **27**:3667-3681.
218. **House, A. E., and K. W. Lynch.** 2008. Regulation of alternative splicing: more than just the ABCs. *The Journal of biological chemistry* **283**:1217-1221.
219. **Hsu, C. L., and A. Stevens.** 1993. Yeast cells lacking 5'→3' exoribonuclease 1 contain mRNA species that are poly(A) deficient and partially lack the 5' cap structure. *Molecular and cellular biology* **13**:4826-4835.
220. **Hsu, J. Y., J. D. Reimann, C. S. Sorensen, J. Lukas, and P. K. Jackson.** 2002. E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1). *Nature cell biology* **4**:358-366.
221. **Huang, X., M. K. Summers, V. Pham, J. R. Lill, J. Liu, G. Lee, D. S. Kirkpatrick, P. K. Jackson, G. Fang, and V. M. Dixit.** 2011. Deubiquitinase USP37 is activated by CDK2 to antagonize APC(CDH1) and promote S phase entry. *Molecular cell* **42**:511-523.
222. **Huang, Y., R. Gattoni, J. Stevenin, and J. A. Steitz.** 2003. SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export. *Molecular cell* **11**:837-843.
223. **Huang, Y., T. A. Yario, and J. A. Steitz.** 2004. A molecular link between SR protein dephosphorylation and mRNA export. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:9666-9670.
224. **Hughes, J. R., S. L. Bullock, and D. Ish-Horowicz.** 2004. Inscuteable mRNA localization is dynein-dependent and regulates apicobasal polarity and spindle length in *Drosophila* neuroblasts. *Curr Biol* **14**:1950-1956.

225. **Hung, M. L., P. Chao, and K. Y. Chang.** 2003. dsRBM1 and a proline-rich domain of RNA helicase A can form a composite binder to recognize a specific dsDNA. *Nucleic acids research* **31**:5741-5753.
226. **Hunter, T.** 2007. The age of crosstalk: phosphorylation, ubiquitination, and beyond. *Molecular cell* **28**:730-738.
227. **Huntzinger, E., I. Kashima, M. Fauser, J. Sauliere, and E. Izaurralde.** 2008. SMG6 is the catalytic endonuclease that cleaves mRNAs containing nonsense codons in metazoan. *RNA (New York, N.Y)* **14**:2609-2617.
228. **Huttelmaier, S., D. Zenklusen, M. Lederer, J. Dictenberg, M. Lorenz, X. Meng, G. J. Bassell, J. Condeelis, and R. H. Singer.** 2005. Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* **438**:512-515.
229. **Hutten, S., and R. H. Kehlenbach.** 2007. CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. *Trends in cell biology* **17**:193-201.
230. **Hutvagner, G., J. McLachlan, A. E. Pasquinelli, E. Balint, T. Tuschl, and P. D. Zamore.** 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science (New York, N.Y)* **293**:834-838.
231. **Hwang, H. C., and B. E. Clurman.** 2005. Cyclin E in normal and neoplastic cell cycles. *Oncogene* **24**:2776-2786.
232. **Ideker, T., V. Thorsson, J. A. Ranish, R. Christmas, J. Buhler, J. K. Eng, R. Bumgarner, D. R. Goodlett, R. Aebersold, and L. Hood.** 2001. Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science (New York, N.Y)* **292**:929-934.
233. **Irie, K., T. Tadauchi, P. A. Takizawa, R. D. Vale, K. Matsumoto, and I. Herskowitz.** 2002. The Khd1 protein, which has three KH RNA-binding motifs, is required for proper localization of ASH1 mRNA in yeast. *The EMBO journal* **21**:1158-1167.
234. **Ishigaki, Y., X. Li, G. Serin, and L. E. Maquat.** 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.
235. **Ishizuka, A., M. C. Siomi, and H. Siomi.** 2002. A *Drosophila* fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes & development* **16**:2497-2508.

236. **Isken, O., Y. K. Kim, N. Hosoda, G. L. Mayeur, J. W. Hershey, and L. E. Maquat.** 2008. Upf1 phosphorylation triggers translational repression during nonsense-mediated mRNA decay. *Cell* **133**:314-327.
237. **Isken, O., and L. E. Maquat.** 2008. The multiple lives of NMD factors: balancing roles in gene and genome regulation. *Nat Rev Genet.*
238. **Izawa, D., and J. Pines.** 2011. How APC/C-Cdc20 changes its substrate specificity in mitosis. *Nature cell biology* **13**:223-233.
239. **Jacob, F., and J. Monod.** 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of molecular biology* **3**:318-356.
240. **Jeffery, C. J.** 1999. Moonlighting proteins. *Trends in biochemical sciences* **24**:8-11.
241. **Jensen, O. N.** 2006. Interpreting the protein language using proteomics. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**:391-403.
242. **Jin, L., A. Williamson, S. Banerjee, I. Philipp, and M. Rape.** 2008. Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex. *Cell* **133**:653-665.
243. **Jing, Q., S. Huang, S. Guth, T. Zarubin, A. Motoyama, J. Chen, F. Di Padova, S. C. Lin, H. Gram, and J. Han.** 2005. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell* **120**:623-634.
244. **Johnson, B. A., J. R. Stehn, M. B. Yaffe, and T. K. Blackwell.** 2002. Cytoplasmic localization of tristetraprolin involves 14-3-3-dependent and -independent mechanisms. *The Journal of biological chemistry* **277**:18029-18036.
245. **Jorgensen, P., and M. Tyers.** 2004. How cells coordinate growth and division. *Curr Biol* **14**:R1014-1027.
246. **Jurica, M. S., and M. J. Moore.** 2003. Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Molecular cell* **12**:5-14.
247. **Kahvejian, A., Y. V. Svitkin, R. Sukarieh, M. N. M'Boutchou, and N. Sonenberg.** 2005. Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes & development* **19**:104-113.

248. **Kanai, Y., N. Dohmae, and N. Hirokawa.** 2004. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* **43**:513-525.
249. **Kang, Y., and B. R. Cullen.** 1999. The human Tap protein is a nuclear mRNA export factor that contains novel RNA-binding and nucleocytoplasmic transport sequences. *Genes & development* **13**:1126-1139.
250. **Kapasi, P., S. Chaudhuri, K. Vyas, D. Baus, A. A. Komar, P. L. Fox, W. C. Merrick, and B. Mazumder.** 2007. L13a blocks 48S assembly: role of a general initiation factor in mRNA-specific translational control. *Molecular cell* **25**:113-126.
251. **Kapp, L. D., and J. R. Lorsch.** 2004. The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annual review of biochemistry* **73**:657-704.
252. **Kashima, I., A. Yamashita, N. Izumi, N. Kataoka, R. Morishita, S. Hoshino, M. Ohno, G. Dreyfuss, and S. Ohno.** 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 & development* **20**:355-367.
253. **Katahira, J., K. Strasser, A. Podtelejnikov, M. Mann, J. U. Jung, and E. Hurt.** 1999. The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. *The EMBO journal* **18**:2593-2609.
254. **Ke, P. Y., Y. Y. Kuo, C. M. Hu, and Z. F. Chang.** 2005. Control of dTTP pool size by anaphase promoting complex/cyclosome is essential for the maintenance of genetic stability. *Genes & development* **19**:1920-1933.
255. **Kedersha, N., G. Stoecklin, M. Ayodele, P. Yacono, J. Lykke-Andersen, M. J. Fritzler, D. Scheuner, R. J. Kaufman, D. E. Golan, and P. Anderson.** 2005. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *The Journal of cell biology* **169**:871-884.
256. **Keene, J. D.** 2001. Ribonucleoprotein infrastructure regulating the flow of genetic information between the genome and the proteome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:7018-7024.
257. **Keene, J. D.** 2007. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet* **8**:533-543.
258. **Keene, J. D.** 1999. Why is Hu where? Shuttling of early-response-gene messenger RNA subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**:5-7.

259. **Keene, J. D., and P. J. Lager.** 2005. Post-transcriptional operons and regulons coordinating gene expression. *Chromosome Res* **13**:327-337.
260. **Keene, J. D., and S. A. Tenenbaum.** 2002. Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. *Molecular cell* **9**:1161-1167.
261. **Kerscher, O., R. Felberbaum, and M. Hochstrasser.** 2006. Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annual review of cell and developmental biology* **22**:159-180.
262. **Kharrat, A., M. J. Macias, T. J. Gibson, M. Nilges, and A. Pastore.** 1995. Structure of the dsRNA binding domain of E. coli RNase III. *The EMBO journal* **14**:3572-3584.
263. **Kiebler, M. A., and G. J. Bassell.** 2006. Neuronal RNA granules: movers and makers. *Neuron* **51**:685-690.
264. **Kiebler, M. A., I. Hemraj, P. Verkade, M. Kohrmann, P. Fortes, R. M. Marion, J. Ortin, and C. G. Dotti.** 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.
265. **Kim, H. H., K. Abdelmohsen, A. Lal, R. Pullmann, Jr., X. Yang, S. Galban, S. Srikantan, J. L. Martindale, J. Blethrow, K. M. Shokat, and M. Gorospe.** 2008. Nuclear HuR accumulation through phosphorylation by Cdk1. *Genes & development* **22**:1804-1815.
266. **Kim, J. H., K. Y. Paek, K. Choi, T. D. Kim, B. Hahm, K. T. Kim, and S. K. Jang.** 2003. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C modulates translation of c-myc mRNA in a cell cycle phase-dependent manner. *Molecular and cellular biology* **23**:708-720.
267. **Kim, U., Y. Wang, T. Sanford, Y. Zeng, and K. Nishikura.** 1994. Molecular cloning of cDNA for double-stranded RNA adenosine deaminase, a candidate enzyme for nuclear RNA editing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**:11457-11461.
268. **Kim, Y. K., L. Furic, L. Desgroseillers, and L. E. Maquat.** 2005. Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* **120**:195-208.

269. **Kim, Y. K., L. Furic, M. Parisien, F. Major, L. DesGroseillers, and L. E. Maquat.** 2007. Staufen1 regulates diverse classes of mammalian transcripts. *The EMBO journal* **26**:2670-2681.
270. **Kindler, S., H. Wang, D. Richter, and H. Tiedge.** 2005. RNA transport and local control of translation. *Annual review of cell and developmental biology* **21**:223-245.
271. **Kinoshita, E., E. Kinoshita-Kikuta, K. Takiyama, and T. Koike.** 2006. Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **5**:749-757.
272. **Kislauskis, E. H., X. Zhu, and R. H. Singer.** 1994. Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype. *The Journal of cell biology* **127**:441-451.
273. **Klann, E., and T. E. Dever.** 2004. Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* **5**:931-942.
274. **Kloc, M., and L. D. Etkin.** 2005. RNA localization mechanisms in oocytes. *Journal of cell science* **118**:269-282.
275. **Kobayashi, H., S. Yamamoto, T. Maruo, and F. Murakami.** 2005. Identification of a cis-acting element required for dendritic targeting of activity-regulated cytoskeleton-associated protein mRNA. *The European journal of neuroscience* **22**:2977-2984.
276. **Koegl, M., T. Hoppe, S. Schlenker, H. D. Ulrich, T. U. Mayer, and S. Jentsch.** 1999. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* **96**:635-644.
277. **Kohler, A., and E. Hurt.** 2007. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nature reviews* **8**:761-773.
278. **Kohrmann, M., M. Luo, C. Kaether, L. DesGroseillers, C. G. Dotti, and M. A. Kiebler.** 1999. Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons. *Molecular biology of the cell* **10**:2945-2953.
279. **Koseoglu, M. M., L. M. Graves, and W. F. Marzluff.** 2008. Phosphorylation of threonine 61 by cyclin a/Cdk1 triggers degradation of stem-loop binding protein at the end of S phase. *Molecular and cellular biology* **28**:4469-4479.

280. **Kosturko, L. D., M. J. Maggipinto, G. Korza, J. W. Lee, J. H. Carson, and E. Barbarese.** 2006. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) E1 binds to hnRNP A2 and inhibits translation of A2 response element mRNAs. *Molecular biology of the cell* **17**:3521-3533.
281. **Kozak, M.** 1991. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *The Journal of biological chemistry* **266**:19867-19870.
282. **Kramer, E. R., N. Scheuringer, A. V. Podtelejnikov, M. Mann, and J. M. Peters.** 2000. Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Molecular biology of the cell* **11**:1555-1569.
283. **Krichevsky, A. M., and K. S. Kosik.** 2001. Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron* **32**:683-696.
284. **Lai, M. C., and W. Y. Tarn.** 2004. Hypophosphorylated ASF/SF2 binds TAP and is present in messenger ribonucleoproteins. *The Journal of biological chemistry* **279**:31745-31749.
285. **Lai, W. S., E. Carballo, J. R. Strum, E. A. Kennington, R. S. Phillips, and P. J. Blackshear.** 1999. Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA. *Molecular and cellular biology* **19**:4311-4323.
286. **Lal, A., K. Mazan-Mamczarz, T. Kawai, X. Yang, J. L. Martindale, and M. Gorospe.** 2004. Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *The EMBO journal* **23**:3092-3102.
287. **Landry, C. R., E. D. Levy, and S. W. Michnick.** 2009. Weak functional constraints on phosphoproteomes. *Trends Genet* **25**:193-197.
288. **Lange, S., Y. Katayama, M. Schmid, O. Burkacky, C. Brauchle, D. C. Lamb, and R. P. Jansen.** 2008. Simultaneous transport of different localized mRNA species revealed by live-cell imaging. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **9**:1256-1267.
289. **Laoukili, J., M. Alvarez-Fernandez, M. Stahl, and R. H. Medema.** 2008. FoxM1 is degraded at mitotic exit in a Cdh1-dependent manner. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **7**:2720-2726.

290. **Lareau, L. F., M. Inada, R. E. Green, J. C. Wengrod, and S. E. Brenner.** 2007. Unproductive splicing of SR genes associated with highly conserved and ultraconserved DNA elements. *Nature* **446**:926-929.
291. **Laroia, G., R. Cuesta, G. Brewer, and R. J. Schneider.** 1999. Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science (New York, N.Y)* **284**:499-502.
292. **Laroia, G., B. Sarkar, and R. J. Schneider.** 2002. Ubiquitin-dependent mechanism regulates rapid turnover of AU-rich cytokine mRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:1842-1846.
293. **Larsson, O., D. M. Perlman, D. Fan, C. S. Reilly, M. Peterson, C. Dahlgren, Z. Liang, S. Li, V. A. Polunovsky, C. Wahlestedt, and P. B. Bitterman.** 2006. Apoptosis resistance downstream of eIF4E: posttranscriptional activation of an anti-apoptotic transcript carrying a consensus hairpin structure. *Nucleic acids research* **34**:4375-4386.
294. **Latham, V. M., Jr., E. H. Kislauskis, R. H. Singer, and A. F. Ross.** 1994. Beta-actin mRNA localization is regulated by signal transduction mechanisms. *The Journal of cell biology* **126**:1211-1219.
295. **Le Hir, H., D. Gatfield, E. Izaurralde, and M. J. Moore.** 2001. The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *The EMBO journal* **20**:4987-4997.
296. **Le Hir, H., E. Izaurralde, L. E. Maquat, and M. J. Moore.** 2000. The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *The EMBO journal* **19**:6860-6869.
297. **Le Hir, H., M. J. Moore, and L. E. Maquat.** 2000. Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions. *Genes & development* **14**:1098-1108.
298. **Le, S., R. Sternglanz, and C. W. Greider.** 2000. Identification of two RNA-binding proteins associated with human telomerase RNA. *Molecular biology of the cell* **11**:999-1010.
299. **Lebeau, G., M. Maher-Laporte, L. Topolnik, C. E. Laurent, W. Sossin, L. Desgroseillers, and J. C. Lacaille.** 2008. Staufeni1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells. *Molecular and cellular biology* **28**:2896-2907.

300. **Lecuyer, E., H. Yoshida, and H. M. Krause.** 2009. Global implications of mRNA localization pathways in cellular organization. *Current opinion in cell biology* **21**:409-415.
301. **Lecuyer, E., H. Yoshida, N. Parthasarathy, C. Alm, T. Babak, T. Cerovina, T. R. Hughes, P. Tomancak, and H. M. Krause.** 2007. Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. *Cell* **131**:174-187.
302. **Lee, J. E., and T. A. Cooper.** 2009. Pathogenic mechanisms of myotonic dystrophy. *Biochemical Society transactions* **37**:1281-1286.
303. **Lee, Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim, and V. N. Kim.** 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**:415-419.
304. **Lejeune, F., Y. Ishigaki, X. Li, and L. E. Maquat.** 2002. The exon junction complex is detected on CBP80-bound but not eIF4E-bound mRNA in mammalian cells: dynamics of mRNP remodeling. *The EMBO journal* **21**:3536-3545.
305. **Lejeune, F., and L. E. Maquat.** 2005. Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Current opinion in cell biology* **17**:309-315.
306. **Lemm, I., and J. Ross.** 2002. Regulation of c-myc mRNA decay by translational pausing in a coding region instability determinant. *Molecular and cellular biology* **22**:3959-3969.
307. **Li, P., X. Yang, M. Wasser, Y. Cai, and W. Chia.** 1997. Inscuteable and Staufen mediate asymmetric localization and segregation of prospero RNA during *Drosophila* neuroblast cell divisions. *Cell* **90**:437-447.
308. **Lienhard, G. E.** 2008. Non-functional phosphorylations? *Trends in biochemical sciences* **33**:351-352.
309. **Lin, S., W. Wang, G. M. Wilson, X. Yang, G. Brewer, N. J. Holbrook, and M. Gorospe.** 2000. Down-regulation of cyclin D1 expression by prostaglandin A(2) is mediated by enhanced cyclin D1 mRNA turnover. *Molecular and cellular biology* **20**:7903-7913.
310. **Lindon, C., and J. Pines.** 2004. Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells. *The Journal of cell biology* **164**:233-241.

311. **Lindqvist, A., V. Rodriguez-Bravo, and R. H. Medema.** 2009. The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *The Journal of cell biology* **185**:193-202.
312. **Ling, L., Z. Cao, and D. V. Goeddel.** 1998. NF-kappaB-inducing kinase activates IKK-alpha by phosphorylation of Ser-176. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:3792-3797.
313. **Linker, K., A. Pautz, M. Fechir, T. Hubrich, J. Greeve, and H. Kleinert.** 2005. Involvement of KSRP in the post-transcriptional regulation of human iNOS expression-complex interplay of KSRP with TTP and HuR. *Nucleic acids research* **33**:4813-4827.
314. **Listovsky, T., Y. S. Oren, Y. Yudkovsky, H. M. Mahbubani, A. M. Weiss, M. Lebediker, and M. Brandeis.** 2004. Mammalian Cdh1/Fzr mediates its own degradation. *The EMBO journal* **23**:1619-1626.
315. **Littlepage, L. E., and J. V. Ruderman.** 2002. Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes & development* **16**:2274-2285.
316. **Long, R. M., W. Gu, E. Lorimer, R. H. Singer, and P. Chartrand.** 2000. She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to ASH1 mRNA. *The EMBO journal* **19**:6592-6601.
317. **Long, R. M., R. H. Singer, X. Meng, I. Gonzalez, K. Nasmyth, and R. P. Jansen.** 1997. Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA. *Science (New York, N.Y)* **277**:383-387.
318. **Lopez-Aviles, S., O. Kapuy, B. Novak, and F. Uhlmann.** 2009. Irreversibility of mitotic exit is the consequence of systems-level feedback. *Nature* **459**:592-595.
319. **Lopez de Heredia, M., and R. P. Jansen.** 2004. mRNA localization and the cytoskeleton. *Current opinion in cell biology* **16**:80-85.
320. **Lu, J., G. Getz, E. A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B. L. Ebert, R. H. Mak, A. A. Ferrando, J. R. Downing, T. Jacks, H. R. Horvitz, and T. R. Golub.** 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**:834-838.
321. **Lu, R., H. Wang, Z. Liang, L. Ku, T. O'Donnell W, W. Li, S. T. Warren, and Y. Feng.** 2004. The fragile X protein controls microtubule-associated protein 1B

- translation and microtubule stability in brain neuron development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:15201-15206.
322. **Luo, M., T. F. Duchaine, and L. DesGroseillers.** 2002. Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association. *The Biochemical journal* **365**:817-824.
 323. **Luo, M. J., and R. Reed.** 1999. Splicing is required for rapid and efficient mRNA export in metazoans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**:14937-14942.
 324. **Luo, W., R. J. Slebos, S. Hill, M. Li, J. Brabek, R. Amanchy, R. Chaerkady, A. Pandey, A. J. Ham, and S. K. Hanks.** 2008. Global impact of oncogenic Src on a phosphotyrosine proteome. *J Proteome Res* **7**:3447-3460.
 325. **Lykke-Andersen, J., and E. Wagner.** 2005. Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1. *Genes & development* **19**:351-361.
 326. **Ma, X. M., and J. Blenis.** 2009. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nature reviews.*
 327. **Ma, X. M., S. O. Yoon, C. J. Richardson, K. Julich, and J. Blenis.** 2008. SKAR links pre-mRNA splicing to mTOR/S6K1-mediated enhanced translation efficiency of spliced mRNAs. *Cell* **133**:303-313.
 328. **Maag, D., C. A. Fekete, Z. Gryczynski, and J. R. Lorsch.** 2005. A conformational change in the eukaryotic translation preinitiation complex and release of eIF1 signal recognition of the start codon. *Molecular cell* **17**:265-275.
 329. **MacDougall, N., A. Clark, E. MacDougall, and I. Davis.** 2003. *Drosophila* gurken (TGFalpha) mRNA localizes as particles that move within the oocyte in two dynein-dependent steps. *Developmental cell* **4**:307-319.
 330. **Maderazo, A. B., J. P. Belk, F. He, and A. Jacobson.** 2003. Nonsense-containing mRNAs that accumulate in the absence of a functional nonsense-mediated mRNA decay pathway are destabilized rapidly upon its restitution. *Molecular and cellular biology* **23**:842-851.
 331. **Mailand, N., and J. F. Diffley.** 2005. CDKs promote DNA replication origin licensing in human cells by protecting Cdc6 from APC/C-dependent proteolysis. *Cell* **122**:915-926.

332. **Mallardo, M., A. Deitinghoff, J. Muller, B. Goetze, P. Macchi, C. Peters, and M. A. Kiebler.** 2003. Isolation and characterization of Staufen-containing ribonucleoprotein particles from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:2100-2105.
333. **Malumbres, M., and M. Barbacid.** 2005. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in biochemical sciences* **30**:630-641.
334. **Malumbres, M., and M. Barbacid.** 2001. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* **1**:222-231.
335. **Mamane, Y., E. Petroulakis, Y. Martineau, T. A. Sato, O. Larsson, V. K. Rajasekhar, and N. Sonenberg.** 2007. Epigenetic activation of a subset of mRNAs by eIF4E explains its effects on cell proliferation. *PLoS ONE* **2**:e242.
336. **Manchado, E., M. Eguren, and M. Malumbres.** 2010. The anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C): cell-cycle-dependent and -independent functions. *Biochemical Society transactions* **38**:65-71.
337. **Mangus, D. A., M. C. Evans, and A. Jacobson.** 2003. Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome biology* **4**:223.
338. **Mansfield, K. D., and J. D. Keene.** 2009. The ribonome: a dominant force in coordinating gene expression. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **101**:169-181.
339. **Margottin-Goguet, F., J. Y. Hsu, A. Loktev, H. M. Hsieh, J. D. Reimann, and P. K. Jackson.** 2003. Prophase destruction of Emi1 by the SCF(betaTrCP/Slimb) ubiquitin ligase activates the anaphase promoting complex to allow progression beyond prometaphase. *Developmental cell* **4**:813-826.
340. **Marion, R. M., P. Fortes, A. Beloso, C. Dotti, and J. Ortin.** 1999. A human sequence homologue of Staufen is an RNA-binding protein that is associated with polysomes and localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Molecular and cellular biology* **19**:2212-2219.
341. **Martel, C., P. Macchi, L. Furic, M. A. Kiebler, and L. Desgroseillers.** 2006. Staufen1 is imported into the nucleolus via a bipartite nuclear localization signal and several modulatory determinants. *The Biochemical journal* **393**:245-254.
342. **Marzluff, W. F.** 2005. Metazoan replication-dependent histone mRNAs: a distinct set of RNA polymerase II transcripts. *Current opinion in cell biology* **17**:274-280.

343. **Marzluff, W. F., E. J. Wagner, and R. J. Duronio.** 2008. Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nat Rev Genet* **9**:843-854.
344. **Matlin, A. J., F. Clark, and C. W. Smith.** 2005. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nature reviews* **6**:386-398.
345. **Matsumoto, M. L., K. E. Wickliffe, K. C. Dong, C. Yu, I. Bosanac, D. Bustos, L. Phu, D. S. Kirkpatrick, S. G. Hymowitz, M. Rape, R. F. Kelley, and V. M. Dixit.** 2010. K11-linked polyubiquitination in cell cycle control revealed by a K11 linkage-specific antibody. *Molecular cell* **39**:477-484.
346. **Matsuzaki, F., T. Ohshiro, H. Ikeshima-Kataoka, and H. Izumi.** 1998. miranda localizes stau68 and prospero asymmetrically in mitotic neuroblasts and epithelial cells in early *Drosophila* embryogenesis. *Development (Cambridge, England)* **125**:4089-4098.
347. **Matyskiela, M. E., and D. O. Morgan.** 2009. Analysis of activator-binding sites on the APC/C supports a cooperative substrate-binding mechanism. *Molecular cell* **34**:68-80.
348. **Mazan-Mamczarz, K., S. Galban, I. Lopez de Silanes, J. L. Martindale, U. Atasoy, J. D. Keene, and M. Gorospe.** 2003. RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:8354-8359.
349. **Mazumder, B., V. Seshadri, and P. L. Fox.** 2003. Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends in biochemical sciences* **28**:91-98.
350. **McBride, A. E., J. T. Cook, E. A. Stemmler, K. L. Rutledge, K. A. McGrath, and J. A. Rubens.** 2005. Arginine methylation of yeast mRNA-binding protein Npl3 directly affects its function, nuclear export, and intranuclear protein interactions. *The Journal of biological chemistry* **280**:30888-30898.
351. **Mendez, R., D. Barnard, and J. D. Richter.** 2002. Differential mRNA translation and meiotic progression require Cdc2-mediated CPEB destruction. *The EMBO journal* **21**:1833-1844.
352. **Meurs, E., K. Chong, J. Galabru, N. S. Thomas, I. M. Kerr, B. R. Williams, and A. G. Hovanessian.** 1990. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* **62**:379-390.

353. **Meyer, H. J., and M. Rape.** 2011. Processive ubiquitin chain formation by the anaphase-promoting complex. *Seminars in cell & developmental biology*.
354. **Michlewski, G., J. R. Sanford, and J. F. Caceres.** 2008. The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1. *Molecular cell* **30**:179-189.
355. **Micklem, D. R., J. Adams, S. Grunert, and D. St Johnston.** 2000. Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. *The EMBO journal* **19**:1366-1377.
356. **Miller, J. J., M. K. Summers, D. V. Hansen, M. V. Nachury, N. L. Lehman, A. Loktev, and P. K. Jackson.** 2006. Emi1 stably binds and inhibits the anaphase-promoting complex/cyclosome as a pseudosubstrate inhibitor. *Genes & development* **20**:2410-2420.
357. **Miller, S., M. Yasuda, J. K. Coats, Y. Jones, M. E. Martone, and M. Mayford.** 2002. Disruption of dendritic translation of CaMKIIalpha impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuron* **36**:507-519.
358. **Mitchell, P., E. Petfalski, A. Shevchenko, M. Mann, and D. Tollervey.** 1997. The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'-->5' exoribonucleases. *Cell* **91**:457-466.
359. **Miyashiro, K. Y., A. Beckel-Mitchener, T. P. Purk, K. G. Becker, T. Barret, L. Liu, S. Carbonetto, I. J. Weiler, W. T. Greenough, and J. Eberwine.** 2003. RNA cargoes associating with FMRP reveal deficits in cellular functioning in Fmr1 null mice. *Neuron* **37**:417-431.
360. **Monshausen, M., N. H. Gehring, and K. S. Kosik.** 2004. The mammalian RNA-binding protein Staufen2 links nuclear and cytoplasmic RNA processing pathways in neurons. *Neuromolecular medicine* **6**:127-144.
361. **Monshausen, M., U. Putz, M. Rehbein, M. Schweizer, L. DesGroseillers, D. Kuhl, D. Richter, and S. Kindler.** 2001. Two rat brain staufen isoforms differentially bind RNA. *Journal of neurochemistry* **76**:155-165.
362. **Monshausen, M., M. Rehbein, D. Richter, and S. Kindler.** 2002. The RNA-binding protein Staufen from rat brain interacts with protein phosphatase-1. *Journal of neurochemistry* **81**:557-564.
363. **Montanaro, L., and P. P. Pandolfi.** 2004. Initiation of mRNA translation in oncogenesis: the role of eIF4E. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **3**:1387-1389.

364. **Moore, M. J.** 2005. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* (New York, N.Y) **309**:1514-1518.
365. **Mouland, A. J., J. Mercier, M. Luo, L. Bernier, L. DesGroseillers, and E. A. Cohen.** 2000. The double-stranded RNA-binding protein Staufen is incorporated in human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in genomic RNA encapsidation. *Journal of virology* **74**:5441-5451.
366. **Mueller, P. R., T. R. Coleman, A. Kumagai, and W. G. Dunphy.** 1995. Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* (New York, N.Y) **270**:86-90.
367. **Mukhopadhyay, R., P. S. Ray, A. Arif, A. K. Brady, M. Kinter, and P. L. Fox.** 2008. DAPK-ZIPK-L13a axis constitutes a negative-feedback module regulating inflammatory gene expression. *Molecular cell* **32**:371-382.
368. **Musacchio, A., and E. D. Salmon.** 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature reviews* **8**:379-393.
369. **Muslimov, I. A., M. Titmus, E. Koenig, and H. Tiedge.** 2002. Transport of Neuronal BC1 RNA in Mauthner Axons. *J Neurosci* **22**:4293-4301.
370. **Nakamura, A., K. Sato, and K. Hanyu-Nakamura.** 2004. Drosophila cup is an eIF4E binding protein that associates with Bruno and regulates oskar mRNA translation in oogenesis. *Developmental cell* **6**:69-78.
371. **Nakayama, K. I., and K. Nakayama.** 2006. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* **6**:369-381.
372. **Napoli, I., V. Mercaldo, P. P. Boyl, B. Eleuteri, F. Zalfa, S. De Rubeis, D. Di Marino, E. Mohr, M. Massimi, M. Falconi, W. Witke, M. Costa-Mattioli, N. Sonenberg, T. Achsel, and C. Bagni.** 2008. The fragile X syndrome protein represses activity-dependent translation through CYFIP1, a new 4E-BP. *Cell* **134**:1042-1054.
373. **Narayanan, U., V. Nalavadi, M. Nakamoto, G. Thomas, S. Ceman, G. J. Bassell, and S. T. Warren.** 2008. S6K1 phosphorylates and regulates fragile X mental retardation protein (FMRP) with the neuronal protein synthesis-dependent mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling cascade. *The Journal of biological chemistry* **283**:18478-18482.

374. **Neumann, S., E. Petfalski, B. Brugger, H. Grosshans, F. Wieland, D. Tollervey, and E. Hurt.** 2003. Formation and nuclear export of tRNA, rRNA and mRNA is regulated by the ubiquitin ligase Rsp5p. *EMBO reports* **4**:1156-1162.
375. **Nilson, L. A., and T. Schupbach.** 1999. EGF receptor signaling in *Drosophila* oogenesis. *Current topics in developmental biology* **44**:203-243.
376. **Nishikura, K.** 2006. Editor meets silencer: crosstalk between RNA editing and RNA interference. *Nature reviews* **7**:919-931.
377. **Nott, A., H. Le Hir, and M. J. Moore.** 2004. Splicing enhances translation in mammalian cells: an additional function of the exon junction complex. *Genes & development* **18**:210-222.
378. **O'Donnell, W. T., and S. T. Warren.** 2002. A decade of molecular studies of fragile X syndrome. *Annual review of neuroscience* **25**:315-338.
379. **O'Donovan, K. J., J. Diedler, G. C. Couture, J. J. Fak, and R. B. Darnell.** 2010. The onconeural antigen cdr2 is a novel APC/C target that acts in mitosis to regulate c-myc target genes in mammalian tumor cells. *PLoS ONE* **5**:e10045.
380. **Obenauer, J. C., L. C. Cantley, and M. B. Yaffe.** 2003. Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic acids research* **31**:3635-3641.
381. **Ohashi, S., K. Koike, A. Omori, S. Ichinose, S. Ohara, S. Kobayashi, T. A. Sato, and K. Anzai.** 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. *The Journal of biological chemistry* **277**:37804-37810.
382. **Oleynikov, Y., and R. H. Singer.** 2003. Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization. *Curr Biol* **13**:199-207.
383. **Olsen, J. V., M. Vermeulen, A. Santamaria, C. Kumar, M. L. Miller, L. J. Jensen, F. Gnad, J. Cox, T. S. Jensen, E. A. Nigg, S. Brunak, and M. Mann.** 2010. Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci Signal* **3**:ra3.
384. **Orphanides, G., and D. Reinberg.** 2002. A unified theory of gene expression. *Cell* **108**:439-451.

385. **Ostareck-Lederer, A., D. H. Ostareck, C. Cans, G. Neubauer, K. Bomsztyk, G. Superti-Furga, and M. W. Hentze.** 2002. c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs. *Molecular and cellular biology* **22**:4535-4543.
386. **Ostareck, D. H., A. Ostareck-Lederer, I. N. Shatsky, and M. W. Hentze.** 2001. Lipoxigenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining. *Cell* **104**:281-290.
387. **Paillard, L., V. Legagneux, D. Maniey, and H. B. Osborne.** 2002. c-Jun ARE targets mRNA deadenylation by an EDEN-BP (embryo deadenylation element-binding protein)-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry* **277**:3232-3235.
388. **Palacios, I. M.** 2007. How does an mRNA find its way? Intracellular localisation of transcripts. *Seminars in cell & developmental biology* **18**:163-170.
389. **Palacios, I. M., D. Gatfield, D. St Johnston, and E. Izaurralde.** 2004. An eIF4AIII-containing complex required for mRNA localization and nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* **427**:753-757.
390. **Paquin, N., and P. Chartrand.** 2008. Local regulation of mRNA translation: new insights from the bud. *Trends in cell biology* **18**:105-111.
391. **Paquin, N., M. Menade, G. Poirier, D. Donato, E. Drouet, and P. Chartrand.** 2007. Local activation of yeast ASH1 mRNA translation through phosphorylation of Khd1p by the casein kinase Yck1p. *Molecular cell* **26**:795-809.
392. **Pardee, A. B.** 1974. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **71**:1286-1290.
393. **Park, H. J., R. H. Costa, L. F. Lau, A. L. Tyner, and P. Raychaudhuri.** 2008. Anaphase-promoting complex/cyclosome-CDH1-mediated proteolysis of the forkhead box M1 transcription factor is critical for regulated entry into S phase. *Molecular and cellular biology* **28**:5162-5171.
394. **Parker, R., and U. Sheth.** 2007. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Molecular cell* **25**:635-646.
395. **Patel, R. C., and G. C. Sen.** 1992. Identification of the double-stranded RNA-binding domain of the human interferon-inducible protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **267**:7671-7676.

396. **Peng, J., D. Schwartz, J. E. Elias, C. C. Thoreen, D. Cheng, G. Marsischky, J. Roelofs, D. Finley, and S. P. Gygi.** 2003. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nature biotechnology* **21**:921-926.
397. **Pestova, T. V., S. I. Borukhov, and C. U. Hellen.** 1998. Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* **394**:854-859.
398. **Pestova, T. V., and V. G. Kolupaeva.** 2002. The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes & development* **16**:2906-2922.
399. **Pestova, T. V., I. B. Lomakin, J. H. Lee, S. K. Choi, T. E. Dever, and C. U. Hellen.** 2000. The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* **403**:332-335.
400. **Peters, J. M.** 2006. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature reviews* **7**:644-656.
401. **Petersen, B. O., C. Wagener, F. Marinoni, E. R. Kramer, M. Melixetian, E. Lazzerini Denchi, C. Gieffers, C. Matteucci, J. M. Peters, and K. Helin.** 2000. Cell cycle- and cell growth-regulated proteolysis of mammalian CDC6 is dependent on APC-CDH1. *Genes & development* **14**:2330-2343.
402. **Petroski, M. D., and R. J. Deshaies.** 2005. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nature reviews* **6**:9-20.
403. **Pfleger, C. M., and M. W. Kirschner.** 2000. The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes & development* **14**:655-665.
404. **Pickart, C. M.** 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual review of biochemistry* **70**:503-533.
405. **Pickart, C. M., and D. Fushman.** 2004. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Current opinion in chemical biology* **8**:610-616.
406. **Pines, J.** 2011. Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**:427-438.
407. **Pines, J.** 2006. Mitosis: a matter of getting rid of the right protein at the right time. *Trends in cell biology* **16**:55-63.
408. **Pines, J., and C. L. Rieder.** 2001. Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nature cell biology* **3**:E3-6.

409. **Pisarev, A. V., C. U. Hellen, and T. V. Pestova.** 2007. Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell* **131**:286-299.
410. **Pisareva, V. P., A. V. Pisarev, A. A. Komar, C. U. Hellen, and T. V. Pestova.** 2008. Translation initiation on mammalian mRNAs with structured 5'UTRs requires DExH-box protein DHX29. *Cell* **135**:1237-1250.
411. **Potapova, T. A., J. R. Daum, K. S. Byrd, and G. J. Gorbsky.** 2009. Fine tuning the cell cycle: activation of the Cdk1 inhibitory phosphorylation pathway during mitotic exit. *Molecular biology of the cell* **20**:1737-1748.
412. **Prechtel, A. T., J. Chemnitz, S. Schirmer, C. Ehlers, I. Langbein-Detsch, J. Stulke, M. C. Dabauvalle, R. H. Kehlenbach, and J. Hauber.** 2006. Expression of CD83 is regulated by HuR via a novel cis-active coding region RNA element. *The Journal of biological chemistry* **281**:10912-10925.
413. **Prinz, S., E. S. Hwang, R. Visintin, and A. Amon.** 1998. The regulation of Cdc20 proteolysis reveals a role for APC components Cdc23 and Cdc27 during S phase and early mitosis. *Curr Biol* **8**:750-760.
414. **Proudfoot, N. J., A. Furger, and M. J. Dye.** 2002. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* **108**:501-512.
415. **Pullmann, R., Jr., H. H. Kim, K. Abdelmohsen, A. Lal, J. L. Martindale, X. Yang, and M. Gorospe.** 2007. Analysis of turnover and translation regulatory RNA-binding protein expression through binding to cognate mRNAs. *Molecular and cellular biology* **27**:6265-6278.
416. **Pyhtila, B., T. Zheng, P. J. Lager, J. D. Keene, M. C. Reedy, and C. V. Nicchitta.** 2008. Signal sequence- and translation-independent mRNA localization to the endoplasmic reticulum. *RNA (New York, N.Y)* **14**:445-453.
417. **Pyronnet, S., J. Dostie, and N. Sonenberg.** 2001. Suppression of cap-dependent translation in mitosis. *Genes & development* **15**:2083-2093.
418. **Queralt, E., and F. Uhlmann.** 2008. Cdk-counteracting phosphatases unlock mitotic exit. *Current opinion in cell biology* **20**:661-668.
419. **Ramasamy, S., H. Wang, H. N. Quach, and K. Sampath.** 2006. Zebrafish *Staufen1* and *Staufen2* are required for the survival and migration of primordial germ cells. *Developmental biology* **292**:393-406.

420. **Ramos, A., S. Grunert, J. Adams, D. R. Micklem, M. R. Proctor, S. Freund, M. Bycroft, D. St Johnston, and G. Varani.** 2000. RNA recognition by a Staufen double-stranded RNA-binding domain. *The EMBO journal* **19**:997-1009.
421. **Rape, M., and M. W. Kirschner.** 2004. Autonomous regulation of the anaphase-promoting complex couples mitosis to S-phase entry. *Nature* **432**:588-595.
422. **Rape, M., S. K. Reddy, and M. W. Kirschner.** 2006. The processivity of multiubiquitination by the APC determines the order of substrate degradation. *Cell* **124**:89-103.
423. **Ravel-Chapuis, A., G. Belanger, R. S. Yadava, M. S. Mahadevan, L. DesGroseillers, J. Cote, and B. J. Jasmin.** 2012. The RNA-binding protein Staufen1 is increased in DM1 skeletal muscle and promotes alternative pre-mRNA splicing. *The Journal of cell biology* **196**:699-712.
424. **Reed, R., and E. Hurt.** 2002. A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell* **108**:523-531.
425. **Reed, S. I.** 2003. Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nature reviews* **4**:855-864.
426. **Reichert, V. L., H. Le Hir, M. S. Jurica, and M. J. Moore.** 2002. 5' exon interactions within the human spliceosome establish a framework for exon junction complex structure and assembly. *Genes & development* **16**:2778-2791.
427. **Reverte, C. G., M. D. Ahearn, and L. E. Hake.** 2001. CPEB degradation during *Xenopus* oocyte maturation requires a PEST domain and the 26S proteasome. *Developmental biology* **231**:447-458.
428. **Rodier, G., P. Coulombe, P. L. Tanguay, C. Boutonnet, and S. Meloche.** 2008. Phosphorylation of Skp2 regulated by CDK2 and Cdc14B protects it from degradation by APC(Cdh1) in G1 phase. *The EMBO journal* **27**:679-691.
429. **Rodnina, M. V., and W. Wintermeyer.** 2009. Recent mechanistic insights into eukaryotic ribosomes. *Current opinion in cell biology*.
430. **Rodrigo-Brenni, M. C., and D. O. Morgan.** 2007. Sequential E2s drive polyubiquitin chain assembly on APC targets. *Cell* **130**:127-139.
431. **Rodriguez, A. J., S. M. Shenoy, R. H. Singer, and J. Condeelis.** 2006. Visualization of mRNA translation in living cells. *The Journal of cell biology* **175**:67-76.

432. **Rodriguez, M. S., C. Gwizdek, R. Haguenaer-Tsapis, and C. Dargemont.** 2003. The HECT ubiquitin ligase Rsp5p is required for proper nuclear export of mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **4**:566-575.
433. **Rongo, C., E. R. Gavis, and R. Lehmann.** 1995. Localization of oskar RNA regulates oskar translation and requires Oskar protein. *Development (Cambridge, England)* **121**:2737-2746.
434. **Ross, A. F., Y. Oleynikov, E. H. Kislauskis, K. L. Taneja, and R. H. Singer.** 1997. Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Molecular and cellular biology* **17**:2158-2165.
435. **Ruegsegger, U., J. H. Leber, and P. Walter.** 2001. Block of HAC1 mRNA translation by long-range base pairing is released by cytoplasmic splicing upon induction of the unfolded protein response. *Cell* **107**:103-114.
436. **Ruggiero, T., M. Trabucchi, M. Ponassi, G. Corte, C. Y. Chen, L. al-Haj, K. S. Khabar, P. Briata, and R. Gherzi.** 2007. Identification of a set of KSRP target transcripts upregulated by PI3K-AKT signaling. *BMC molecular biology* **8**:28.
437. **Ryazanov, A. G., E. A. Shestakova, and P. G. Natapov.** 1988. Phosphorylation of elongation factor 2 by EF-2 kinase affects rate of translation. *Nature* **334**:170-173.
438. **Ryter, J. M., and S. C. Schultz.** 1998. Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA. *The EMBO journal* **17**:7505-7513.
439. **Sancar, A., L. A. Lindsey-Boltz, K. Unsal-Kacmaz, and S. Linn.** 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual review of biochemistry* **73**:39-85.
440. **Saunders, L. R., and G. N. Barber.** 2003. The dsRNA binding protein family: critical roles, diverse cellular functions. *Faseb J* **17**:961-983.
441. **Savkur, R. S., A. V. Philips, and T. A. Cooper.** 2001. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nature genetics* **29**:40-47.
442. **Schaeffer, D., B. Tsanova, A. Barbas, F. P. Reis, E. G. Dastidar, M. Sanchez-Rotunno, C. M. Arraiano, and A. van Hoof.** 2009. The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nature structural & molecular biology* **16**:56-62.

443. **Schmidlin, M., M. Lu, S. A. Leuenberger, G. Stoecklin, M. Mallaun, B. Gross, R. Gherzi, D. Hess, B. A. Hemmings, and C. Moroni.** 2004. The ARE-dependent mRNA-destabilizing activity of BRF1 is regulated by protein kinase B. *The EMBO journal* **23**:4760-4769.
444. **Schnorrer, F., K. Bohmann, and C. Nusslein-Volhard.** 2000. The molecular motor dynein is involved in targeting swallow and bicoid RNA to the anterior pole of *Drosophila* oocytes. *Nature cell biology* **2**:185-190.
445. **Schuldt, A. J., J. H. Adams, C. M. Davidson, D. R. Micklem, J. Haseloff, D. St Johnston, and A. H. Brand.** 1998. Miranda mediates asymmetric protein and RNA localization in the developing nervous system. *Genes & development* **12**:1847-1857.
446. **Schupbach, T., and E. Wieschaus.** 1986. Germline autonomy of maternal-effect mutations altering the embryonic body pattern of *Drosophila*. *Developmental biology* **113**:443-448.
447. **Schupbach, T., and E. Wieschaus.** 1986. Maternal-effect mutations altering the anterior-posterior pattern of the *Drosophila* embryo. *Roux's Archives of Developmental Biology* **195**:302-317.
448. **Schutz, S., J. Chemnitz, C. Spillner, M. Frohme, J. Hauber, and R. H. Kehlenbach.** 2006. Stimulated expression of mRNAs in activated T cells depends on a functional CRM1 nuclear export pathway. *Journal of molecular biology* **358**:997-1009.
449. **Schwanhausser, B., D. Busse, N. Li, G. Dittmar, J. Schuchhardt, J. Wolf, W. Chen, and M. Selbach.** 2011. Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* **473**:337-342.
450. **Schwartz, D. C., and M. Hochstrasser.** 2003. A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends in biochemical sciences* **28**:321-328.
451. **Segref, A., K. Sharma, V. Doye, A. Hellwig, J. Huber, R. Luhrmann, and E. Hurt.** 1997. Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)⁺ RNA and nuclear pores. *The EMBO journal* **16**:3256-3271.
452. **Seki, A., and G. Fang.** 2007. CKAP2 is a spindle-associated protein degraded by APC/C-Cdh1 during mitotic exit. *The Journal of biological chemistry* **282**:15103-15113.

453. **Senger, B., G. Simos, F. R. Bischoff, A. Podtelejnikov, M. Mann, and E. Hurt.** 1998. Mtr10p functions as a nuclear import receptor for the mRNA-binding protein Npl3p. *The EMBO journal* **17**:2196-2207.
454. **Setoyama, D., M. Yamashita, and N. Sagata.** 2007. Mechanism of degradation of CPEB during *Xenopus* oocyte maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**:18001-18006.
455. **Shah, Y. M., K. Morimura, Q. Yang, T. Tanabe, M. Takagi, and F. J. Gonzalez.** 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates a microRNA-mediated signaling cascade responsible for hepatocellular proliferation. *Molecular and cellular biology* **27**:4238-4247.
456. **Shen, C. P., J. A. Knoblich, Y. M. Chan, M. M. Jiang, L. Y. Jan, and Y. N. Jan.** 1998. Miranda as a multidomain adapter linking apically localized Inscuteable and basally localized Staufen and Prospero during asymmetric cell division in *Drosophila*. *Genes & development* **12**:1837-1846.
457. **Shen, E. C., M. F. Henry, V. H. Weiss, S. R. Valentini, P. A. Silver, and M. S. Lee.** 1998. Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. *Genes & development* **12**:679-691.
458. **Shen, Z., N. Paquin, A. Forget, and P. Chartrand.** 2009. Nuclear shuttling of She2p couples ASH1 mRNA localization to its translational repression by recruiting Loc1p and Puf6p. *Molecular biology of the cell* **20**:2265-2275.
459. **Shin, C., and J. L. Manley.** 2004. Cell signalling and the control of pre-mRNA splicing. *Nature reviews* **5**:727-738.
460. **Shirayama, M., W. Zachariae, R. Ciosk, and K. Nasmyth.** 1998. The Polo-like kinase Cdc5p and the WD-repeat protein Cdc20p/fizzy are regulators and substrates of the anaphase promoting complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* **17**:1336-1349.
461. **Shyu, A. B., J. G. Belasco, and M. E. Greenberg.** 1991. Two distinct destabilizing elements in the c-fos message trigger deadenylation as a first step in rapid mRNA decay. *Genes & development* **5**:221-231.
462. **Shyu, A. B., M. F. Wilkinson, and A. van Hoof.** 2008. Messenger RNA regulation: to translate or to degrade. *The EMBO journal* **27**:471-481.

463. **Sidrauski, C., and P. Walter.** 1997. The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* **90**:1031-1039.
464. **Sigl, R., C. Wandke, V. Rauch, J. Kirk, T. Hunt, and S. Geley.** 2009. Loss of the mammalian APC/C activator FZR1 shortens G1 and lengthens S phase but has little effect on exit from mitosis. *Journal of cell science* **122**:4208-4217.
465. **Sil, A., and I. Herskowitz.** 1996. Identification of asymmetrically localized determinant, Ash1p, required for lineage-specific transcription of the yeast HO gene. *Cell* **84**:711-722.
466. **Simon, A. M., P. Hoppe, and S. J. Burden.** 1992. Spatial restriction of AChR gene expression to subsynaptic nuclei. *Development (Cambridge, England)* **114**:545-553.
467. **Simpson-Lavy, K. J., Y. S. Oren, O. Feine, J. Sajman, T. Listovsky, and M. Brandeis.** 2010. Fifteen years of APC/cyclosome: a short and impressive biography. *Biochemical Society transactions* **38**:78-82.
468. **Siomi, M. C., K. Higashijima, A. Ishizuka, and H. Siomi.** 2002. Casein kinase II phosphorylates the fragile X mental retardation protein and modulates its biological properties. *Molecular and cellular biology* **22**:8438-8447.
469. **Sivan, G., N. Kedersha, and O. Elroy-Stein.** 2007. Ribosomal slowdown mediates translational arrest during cellular division. *Molecular and cellular biology* **27**:6639-6646.
470. **Skotheim, J. M., S. Di Talia, E. D. Siggia, and F. R. Cross.** 2008. Positive feedback of G1 cyclins ensures coherent cell cycle entry. *Nature* **454**:291-296.
471. **Sonenberg, N., and A. G. Hinnebusch.** 2009. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* **136**:731-745.
472. **Song, L., and M. Rape.** 2010. Regulated degradation of spindle assembly factors by the anaphase-promoting complex. *Molecular cell* **38**:369-382.
473. **Sossin, W. S., and L. DesGroseillers.** 2006. Intracellular trafficking of RNA in neurons. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **7**:1581-1589.
474. **St Johnston, D.** 1995. The intracellular localization of messenger RNAs. *Cell* **81**:161-170.

475. **St Johnston, D.** 2005. Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nature reviews* **6**:363-375.
476. **St Johnston, D., D. Beuchle, and C. Nusslein-Volhard.** 1991. Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* **66**:51-63.
477. **St Johnston, D., N. H. Brown, J. G. Gall, and M. Jantsch.** 1992. A conserved double-stranded RNA-binding domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**:10979-10983.
478. **St Johnston, D., W. Driever, T. Berleth, S. Richstein, and C. Nusslein-Volhard.** 1989. Multiple steps in the localization of bicoid RNA to the anterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Development (Cambridge, England)* **107 Suppl**:13-19.
479. **Stamm, S.** 2008. Regulation of alternative splicing by reversible protein phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **283**:1223-1227.
480. **Stevaux, O., and N. J. Dyson.** 2002. A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function. *Current opinion in cell biology* **14**:684-691.
481. **Steward, O., and W. B. Levy.** 1982. Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J Neurosci* **2**:284-291.
482. **Steward, O., and E. M. Schuman.** 2001. Protein synthesis at synaptic sites on dendrites. *Annual review of neuroscience* **24**:299-325.
483. **Steward, O., C. S. Wallace, G. L. Lyford, and P. F. Worley.** 1998. Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* **21**:741-751.
484. **Stoecklin, G., T. Stubbs, N. Kedersha, S. Wax, W. F. Rigby, T. K. Blackwell, and P. Anderson.** 2004. MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *The EMBO journal* **23**:1313-1324.
485. **Stoecklin, G., S. A. Tenenbaum, T. Mayo, S. V. Chittur, A. D. George, T. E. Baroni, P. J. Blackshear, and P. Anderson.** 2008. Genome-wide analysis identifies interleukin-10 mRNA as target of tristetraprolin. *The Journal of biological chemistry* **283**:11689-11699.
486. **Stutz, F., and E. Izaurralde.** 2003. The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export. *Trends in cell biology* **13**:319-327.

487. **Sudakin, V., G. K. Chan, and T. J. Yen.** 2001. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *The Journal of cell biology* **154**:925-936.
488. **Sullivan, M., and D. O. Morgan.** 2007. Finishing mitosis, one step at a time. *Nature reviews* **8**:894-903.
489. **Sundell, C. L., and R. H. Singer.** 1991. Requirement of microfilaments in sorting of actin messenger RNA. *Science (New York, N.Y)* **253**:1275-1277.
490. **Sutton, M. A., A. M. Taylor, H. T. Ito, A. Pham, and E. M. Schuman.** 2007. Postsynaptic decoding of neural activity: eEF2 as a biochemical sensor coupling miniature synaptic transmission to local protein synthesis. *Neuron* **55**:648-661.
491. **Tadros, W., J. T. Westwood, and H. D. Lipshitz.** 2007. The mother-to-child transition. *Developmental cell* **12**:847-849.
492. **Tai, H. C., and E. M. Schuman.** 2008. Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci* **9**:826-838.
493. **Takizawa, P. A., A. Sil, J. R. Swedlow, I. Herskowitz, and R. D. Vale.** 1997. Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast. *Nature* **389**:90-93.
494. **Tan, W., A. S. Zolotukhin, I. Tretyakova, J. Bear, S. Lindtner, S. V. Smulevitch, and B. K. Felber.** 2005. Identification and characterization of the mouse nuclear export factor (Nxf) family members. *Nucleic acids research* **33**:3855-3865.
495. **Tang, S. J., D. Meulemans, L. Vazquez, N. Colaco, and E. Schuman.** 2001. A role for a rat homolog of stauferin in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron* **32**:463-475.
496. **Tange, T. O., T. Shibuya, M. S. Jurica, and M. J. Moore.** 2005. Biochemical analysis of the EJC reveals two new factors and a stable tetrameric protein core. *RNA (New York, N.Y)* **11**:1869-1883.
497. **Taylor, D. J., J. Nilsson, A. R. Merrill, G. R. Andersen, P. Nissen, and J. Frank.** 2007. Structures of modified eEF2 80S ribosome complexes reveal the role of GTP hydrolysis in translocation. *The EMBO journal* **26**:2421-2431.

498. **Tharun, S., W. He, A. E. Mayes, P. Lennertz, J. D. Beggs, and R. Parker.** 2000. Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay. *Nature* **404**:515-518.
499. **Tharun, S., and R. Parker.** 2001. Targeting an mRNA for decapping: displacement of translation factors and association of the Lsm1p-7p complex on deadenylated yeast mRNAs. *Molecular cell* **8**:1075-1083.
500. **Thomas, G.** 2000. An encore for ribosome biogenesis in the control of cell proliferation. *Nature cell biology* **2**:E71-72.
501. **Thomas, M. G., L. J. Martinez Tosar, M. Loschi, J. M. Pasquini, J. Correale, S. Kindler, and G. L. Boccaccio.** 2005. Staufen recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes. *Molecular biology of the cell* **16**:405-420.
502. **Thomas, M. G., L. J. Tosar, M. A. Desbats, C. C. Leishman, and G. L. Boccaccio.** 2009. Mammalian Staufen 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly. *Journal of cell science* **122**:563-573.
503. **Thornton, B. R., and D. P. Toczyski.** 2006. Precise destruction: an emerging picture of the APC. *Genes & development* **20**:3069-3078.
504. **Thrower, J. S., L. Hoffman, M. Rechsteiner, and C. M. Pickart.** 2000. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO journal* **19**:94-102.
505. **Tian, B., P. C. Bevilacqua, A. Diegelman-Parente, and M. B. Mathews.** 2004. The double-stranded-RNA-binding motif: interference and much more. *Nature reviews* **5**:1013-1023.
506. **Tian, Q., S. B. Stepaniants, M. Mao, L. Weng, M. C. Feetham, M. J. Doyle, E. C. Yi, H. Dai, V. Thorsson, J. Eng, D. Goodlett, J. P. Berger, B. Gunter, P. S. Linseley, R. B. Stoughton, R. Aebersold, S. J. Collins, W. A. Hanlon, and L. E. Hood.** 2004. Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells. *Mol Cell Proteomics* **3**:960-969.
507. **Tiruchinapalli, D. M., Y. Oleynikov, S. Kelic, S. M. Shenoy, A. Hartley, P. K. Stanton, R. H. Singer, and G. J. Bassell.** 2003. Activity-dependent trafficking and dynamic localization of zipcode binding protein 1 and beta-actin mRNA in dendrites and spines of hippocampal neurons. *J Neurosci* **23**:3251-3261.
508. **Topisirovic, I., N. Siddiqui, V. L. Lapointe, M. Trost, P. Thibault, C. Bangeranye, S. Pinol-Roma, and K. L. Borden.** 2009. Molecular dissection of the

- eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) export-competent RNP. *The EMBO journal* **28**:1087-1098.
509. **Topisirovic, I., N. Siddiqui, S. Orolicki, L. A. Skrabanek, M. Tremblay, T. Hoang, and K. L. Borden.** 2009. Stability of eukaryotic translation initiation factor 4E mRNA is regulated by HuR, and this activity is dysregulated in cancer. *Molecular and cellular biology* **29**:1152-1162.
 510. **Torrisani, J., A. Unterberger, S. R. Tendulkar, K. Shikimi, and M. Szyf.** 2007. AUF1 cell cycle variations define genomic DNA methylation by regulation of DNMT1 mRNA stability. *Molecular and cellular biology* **27**:395-410.
 511. **Triqueneaux, G., M. Velten, P. Franzon, F. Dautry, and H. Jacquemin-Sablon.** 1999. RNA binding specificity of Unr, a protein with five cold shock domains. *Nucleic acids research* **27**:1926-1934.
 512. **Tsai, N. P., J. Bi, and L. N. Wei.** 2007. The adaptor Grb7 links netrin-1 signaling to regulation of mRNA translation. *The EMBO journal* **26**:1522-1531.
 513. **Tucker, M., M. A. Valencia-Sanchez, R. R. Staples, J. Chen, C. L. Denis, and R. Parker.** 2001. The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **104**:377-386.
 514. **Ubersax, J. A., and J. E. Ferrell, Jr.** 2007. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nature reviews* **8**:530-541.
 515. **Valencia, P., A. P. Dias, and R. Reed.** 2008. Splicing promotes rapid and efficient mRNA export in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**:3386-3391.
 516. **Vander Heiden, M. G., L. C. Cantley, and C. B. Thompson.** 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y)* **324**:1029-1033.
 517. **Vessey, J. P., P. Macchi, J. M. Stein, M. Mikl, K. N. Hawker, P. Vogelsang, K. Wiczorek, G. Vendra, J. Riefler, F. Tubing, S. A. Aparicio, T. Abel, and M. A. Kiebler.** 2008. A loss of function allele for murine *Staufen1* leads to impairment of dendritic *Staufen1*-RNP delivery and dendritic spine morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**:16374-16379.

518. **Villace, P., R. M. Marion, and J. Ortin.** 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 research* **32**:2411-2420.
519. **Vyas, K., S. Chaudhuri, D. W. Leaman, A. A. Komar, A. Musiyenko, S. Barik, and B. Mazumder.** 2009. Genome-wide polysome profiling reveals an inflammation-responsive posttranscriptional operon in gamma interferon-activated monocytes. *Molecular and cellular biology* **29**:458-470.
520. **Wang, H., D. Liu, Y. Wang, J. Qin, and S. J. Elledge.** 2001. Pds1 phosphorylation in response to DNA damage is essential for its DNA damage checkpoint function. *Genes & development* **15**:1361-1372.
521. **Wang, W., M. C. Caldwell, S. Lin, H. Furneaux, and M. Gorospe.** 2000. HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation. *The EMBO journal* **19**:2340-2350.
522. **Wang, W., H. Furneaux, H. Cheng, M. C. Caldwell, D. Hutter, Y. Liu, N. Holbrook, and M. Gorospe.** 2000. HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light. *Molecular and cellular biology* **20**:760-769.
523. **Wang, Y., and Q. Zhan.** 2007. Cell cycle-dependent expression of centrosomal ninein-like protein in human cells is regulated by the anaphase-promoting complex. *The Journal of biological chemistry* **282**:17712-17719.
524. **Wang, Z. F., M. L. Whitfield, T. C. Ingledue, 3rd, Z. Dominski, and W. F. Marzluff.** 1996. The protein that binds the 3' end of histone mRNA: a novel RNA-binding protein required for histone pre-mRNA processing. *Genes & development* **10**:3028-3040.
525. **Warner, J. R.** 1999. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends in biochemical sciences* **24**:437-440.
526. **Wasch, R., J. A. Robbins, and F. R. Cross.** 2010. The emerging role of APC/CCdh1 in controlling differentiation, genomic stability and tumor suppression. *Oncogene* **29**:1-10.
527. **Wei, W., N. G. Ayad, Y. Wan, G. J. Zhang, M. W. Kirschner, and W. G. Kaelin, Jr.** 2004. Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature* **428**:194-198.
528. **Weidensdorfer, D., N. Stohr, A. Baude, M. Lederer, M. Kohn, A. Schierhorn, S. Buchmeier, E. Wahle, and S. Huttelmaier.** 2009. Control of c-myc mRNA

- stability by IGF2BP1-associated cytoplasmic RNPs. *RNA* (New York, N.Y) **15**:104-115.
529. **Weil, T. T., K. M. Forrest, and E. R. Gavis.** 2006. Localization of bicoid mRNA in late oocytes is maintained by continual active transport. *Developmental cell* **11**:251-262.
530. **White, R., C. Gonsior, E. M. Kramer-Albers, N. Stohr, S. Huttelmaier, and J. Trotter.** 2008. Activation of oligodendroglial Fyn kinase enhances translation of mRNAs transported in hnRNP A2-dependent RNA granules. *The Journal of cell biology* **181**:579-586.
531. **Wickham, L., T. Duchaine, M. Luo, I. R. Nabi, and L. DesGroseillers.** 1999. Mammalian stau1 is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Molecular and cellular biology* **19**:2220-2230.
532. **Wickham, L., T. Duchaine, M. Luo, I. R. Nabi, and L. DesGroseillers.** 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.
533. **Wiegand, H. L., S. Lu, and B. R. Cullen.** 2003. Exon junction complexes mediate the enhancing effect of splicing on mRNA expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:11327-11332.
534. **Williamson, A., S. Banerjee, X. Zhu, I. Philipp, A. T. Iavarone, and M. Rape.** 2011. Regulation of ubiquitin chain initiation to control the timing of substrate degradation. *Molecular cell* **42**:744-757.
535. **Wilson, T., and R. Treisman.** 1988. Removal of poly(A) and consequent degradation of c-fos mRNA facilitated by 3' AU-rich sequences. *Nature* **336**:396-399.
536. **Wirth, K. G., R. Ricci, J. F. Gimenez-Abian, S. Taghybeeglu, N. R. Kudo, W. Jochum, M. Vasseur-Cognet, and K. Nasmyth.** 2004. Loss of the anaphase-promoting complex in quiescent cells causes unscheduled hepatocyte proliferation. *Genes & development* **18**:88-98.
537. **Woodruff, J. B., D. G. Drubin, and G. Barnes.** 2011. Spindle assembly requires complete disassembly of spindle remnants from the previous cell cycle. *Molecular biology of the cell*.

538. **Wu, H., A. Henras, G. Chanfreau, and J. Feigon.** 2004. Structural basis for recognition of the AGNN tetraloop RNA fold by the double-stranded RNA-binding domain of Rnt1p RNase III. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:8307-8312.
539. **Wu, L., J. Fan, and J. G. Belasco.** 2006. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:4034-4039.
540. **Wu, S., W. Wang, X. Kong, L. M. Congdon, K. Yokomori, M. W. Kirschner, and J. C. Rice.** 2010. Dynamic regulation of the PR-Set7 histone methyltransferase is required for normal cell cycle progression. *Genes & development* **24**:2531-2542.
541. **Xu, C., and M. F. Henry.** 2004. Nuclear export of hnRNP Hrp1p and nuclear export of hnRNP Npl3p are linked and influenced by the methylation state of Npl3p. *Molecular and cellular biology* **24**:10742-10756.
542. **Xu, P., D. M. Duong, N. T. Seyfried, D. Cheng, Y. Xie, J. Robert, J. Rush, M. Hochstrasser, D. Finley, and J. Peng.** 2009. Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* **137**:133-145.
543. **Yam, C. H., T. K. Fung, and R. Y. Poon.** 2002. Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci* **59**:1317-1326.
544. **Yamaguchi, Y., R. Oohinata, T. Naiki, and K. Irie.** 2008. Stau1 negatively regulates myogenic differentiation in C2C12 cells. *Genes Cells* **13**:583-592.
545. **Yamashita, A., T. C. Chang, Y. Yamashita, W. Zhu, Z. Zhong, C. Y. Chen, and A. B. Shyu.** 2005. Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nature structural & molecular biology* **12**:1054-1063.
546. **Yang, F., Y. Peng, and D. R. Schoenberg.** 2004. Endonuclease-mediated mRNA decay requires tyrosine phosphorylation of polysomal ribonuclease 1 (PMR1) for the targeting and degradation of polyribosome-bound substrate mRNA. *The Journal of biological chemistry* **279**:48993-49002.
547. **Yang, J., H. P. Bogerd, P. J. Wang, D. C. Page, and B. R. Cullen.** 2001. Two closely related human nuclear export factors utilize entirely distinct export pathways. *Molecular cell* **8**:397-406.

548. **Yoshimura, A., R. Fujii, Y. Watanabe, S. Okabe, K. Fukui, and T. Takumi.** 2006. Myosin-Va facilitates the accumulation of mRNA/protein complex in dendritic spines. *Curr Biol* **16**:2345-2351.
549. **Zeitelhofer, M., D. Karra, P. Macchi, M. Tolino, S. Thomas, M. Schwarz, M. Kiebler, and R. Dahm.** 2008. Dynamic interaction between P-bodies and transport ribonucleoprotein particles in dendrites of mature hippocampal neurons. *J Neurosci* **28**:7555-7562.
550. **Zhang, H. L., T. Eom, Y. Oleynikov, S. M. Shenoy, D. A. Liebelt, J. B. Dichtenberg, R. H. Singer, and G. J. Bassell.** 2001. Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNP complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron* **31**:261-275.
551. **Zhang, S., and F. Grosse.** 1997. Domain structure of human nuclear DNA helicase II (RNA helicase A). *The Journal of biological chemistry* **272**:11487-11494.
552. **Zhang, S., and F. Grosse.** 2004. Multiple functions of nuclear DNA helicase II (RNA helicase A) in nucleic acid metabolism. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **36**:177-183.
553. **Zhao, W. M., J. A. Coppinger, A. Seki, X. L. Cheng, J. R. Yates, 3rd, and G. Fang.** 2008. RCS1, a substrate of APC/C, controls the metaphase to anaphase transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**:13415-13420.
554. **Zimyanin, V. L., K. Belaya, J. Pecreaux, M. J. Gilchrist, A. Clark, I. Davis, and D. St Johnston.** 2008. In vivo imaging of oskar mRNA transport reveals the mechanism of posterior localization. *Cell* **134**:843-853.
555. **Zur, A., and M. Brandeis.** 2001. Securin degradation is mediated by fzy and fzr, and is required for complete chromatid separation but not for cytokinesis. *The EMBO journal* **20**:792-801.

Annexes

Annexe I: Liste des contributions à d'autres articles que ceux inclus dans cette thèse.

Martel C*, Dugré-Brisson S*, **Boulay K***, Breton B, Lapointe G, Armando S, Trépanier V, Duchaine T, Bouvier M and Desgroseillers L.

*Contribution équivalente des auteurs

Multimerization of Staufen1 in live cells.

RNA (2010) 3, p.585-97

Chatel-Chaix L, **Boulay K**, Mouland AJ and Desgroseillers L.

The host protein Staufen1 interacts with the Pr55Gag zinc fingers and regulates HIV-1 assembly via its N-terminus.

Retrovirology (2008) 5:41

Dugré-Brisson S, Elvira G, Boulay K, Chatel-Chaix L, Mouland AJ, DesGroseillers L.

Interaction of Staufen1 with the 5' end of mRNA facilitates translation of these RNAs.

Nucleic Acids Research (2005) 15, p.4797-812

Annexe II: Article

Multimerization of Staufen1 in live cells.

*Catherine Martel*1, Samuel Dugré-Brisson*, Karine Boulay*, Billy Breton, Gabriel Lapointe, Sylvain Armando, Véronique Trépanier, Thomas Duchaine2, Michel Bouvier and Luc DesGroseillers‡*

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

Running title: Staufen1 organizes ribonucleoprotein complexes

Keywords: Staufen, ribonucleoprotein, mRNA transport, mRNA granule, mRNA particle.

* The first three authors contributed equally to this work.

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

Abstract

Transport of mRNA is an efficient mechanism to target proteins to specific regions of a cell. Although it is well documented that mRNA are transported in ribonucleoprotein (RNP) complexes, several of the mechanisms involved in complex formation and localization are poorly understood. Staufen (Stau) 1, a double-stranded RNA-binding protein is a well accepted marker of mRNA transport complexes. In this manuscript, we provide evidence that Stau1 self-associates in live cells using immunoprecipitation and bioluminescence resonance energy transfer (BRET) assays. The double-stranded RNA-binding domains dsRBD3 and dsRBD4 contributed for about half of the signal suggesting that Stau1 RNA-binding activity is involved in Stau1 self-association. Protein-protein interaction also occurred, via dsRBD5 and dsRBD2, as shown by in vitro pull-down, yeast two-hybrid and BRET assays in live cells. Interestingly, Stau1 self-association contributes to the formation of oligomeric complexes as evidenced by the co-expression of split *Renilla* luciferase halves covalently linked to Stau1 in a protein complementation assay (PCA) combined with BRET assay with Stau1-YFP. Moreover, we showed that these high-order Stau1-containing complexes carry RNAs when the RNA-stain SYTO 14 was used as the energy acceptor in the PCA/BRET assay. The oligomeric composition of Stau1-containing complexes and the presence of specific mRNAs have been confirmed by biochemical approaches involving two successive immunoprecipitations of Stau1-tagged molecules followed by qRT-PCR amplification. Altogether, these results indicate that Stau1 self-associates in mRNPs via its multiple functional domains that can select mRNAs to be transported and establish protein-protein interaction.

Introduction

Cytoplasmic mRNA transport and local translation to defined subcellular domains allow efficient spatial and temporal restriction of genetic expression (Sossin and DesGroseillers 2006; Rodriguez et al. 2008; Martin and Ephrussi 2009). This phenomenon is observed in a large variety of cell types and organisms and has been shown to play an important role in processes such as learning and memory, synaptic transmission, axis formation during development, cell motility, and asymmetric cell division. Evidence supports a model in which the differential delivery of new mRNAs to subcellular domains occurs in motile ribonucleoprotein (RNP) structures. A compelling framework was suggested about how mRNA localization could be achieved in an ordered, multi-step pathway. It predicted (a) the formation of mRNPs as a functional complex, (b) the transport of these particles to their destination via cytoskeletal elements and motor proteins and (c) the de-repression of translation of the localized mRNAs. RNA-binding proteins (RBP) become associated with mRNAs either in the nucleus or during re-modeling of the complex in the cytoplasm forming a heterogeneous population of transport complexes. While the composition of mRNA transport complexes begins to be elucidated, less is known about the role(s) of these various RBPs in the mechanism of transport.

Staufen is a member of the double-stranded RNA-binding protein (dsRBP) family. It was first described in *Drosophila melanogaster* where it is required during development for the localization of the *oskar* and *bicoid* transcripts at the posterior and anterior poles of the oocytes, respectively (St Johnston et al. 1991). Staufen was also shown to be required for translational derepression of *osk* mRNA once properly localized (Kim-Ha et al. 1995; Micklem et al. 2000). In mammals, two homologous Staufen genes, *Stau1* and *Stau2*, were identified (DesGroseillers and Lemieux 1996; Buchner et al. 1999; Kiebler et al. 1999; Marion et al. 1999; Wickham et al. 1999; Duchaine et al. 2002). *Stau1* is a multi-functional protein involved in different pathways of RNA metabolism. In neurons, *Stau1* is required for the transport and localization of specific mRNAs to dendrites (Kiebler et al. 1999; Kanai et al. 2004; Vessey et al. 2008). Disruption of Staufen blocks transcription-dependent forms of synaptic plasticity/memory in *Drosophila* (Dubnau et al. 2003), *Aplysia* (Liu et al.

2006) and rodents (Lebeau et al. 2008). In addition to its role in mRNA transport, Stau1 plays additional roles in the regulation of post-transcriptional mRNA expression. When bound to the 3'UTR of mRNAs, Stau1 recruits the non-sense mediated decay (NMD) factor Upf1 and triggers degradation of the bound mRNAs (Kim et al. 2005; Kim et al. 2007). In contrast to the NMD pathway that recognizes and degrades mRNAs with a premature termination codon, Stau1-mediated mRNA decay is not a quality control mechanism but rather a *bona fide* mechanism of regulation of gene expression modulating the stability of natural mRNAs. In contrast, when bound to the 5'UTR of mRNAs, Stau1 enhances their translational efficiency (Dugre-Brisson et al. 2005).

Stau1 is a modular protein characterized by the presence of two conserved consensus amino acid sequences that fold into a domain involved in double-stranded RNA binding (dsRBD3, dsRBD4) (Marion et al. 1999; Wickham et al. 1999). The α - β - β - β - α structure of this domain interacts with the phosphate-backbone of the double helix RNA in its minor and major grooves (Ryter and Schultz 1998; Ramos et al. 2000). Stau1 also contains 2 truncated dsRBDs (dsRBD2, dsRBD5) in which amino acid sequence conservation is restricted to the C-terminal half of the consensus (Lunde et al. 2007). These domains are unable to bind RNA. A tubulin-binding domain (TBD) is located between dsRBD4 and dsRBD5 and is believed to be involved in mRNA transport on the cytoskeleton (Wickham et al. 1999). Proteomic and cell biological experiments have clearly established that Stau1 is a component of ribonucleoprotein complexes in several cell types (Krichevsky and Kosik 2001; Mallardo et al. 2003; Brendel et al. 2004; Villace et al. 2004).

Although it is well accepted that Stau1 is a marker of mRNA transport complexes and a crucial player for mRNA transport (Kanai et al. 2004; Sossin and DesGroseillers 2006; Vessey et al. 2008), its exact roles within RNPs are still unclear. It is known that several proteins of the dsRBP family such as TRBP2, XlrpA, ADAR2, PACT and Rnt1p have the capacity to dimerize through their dsRBDs (Daher et al. 2001; Peters et al. 2001; Valente and Nishikura 2007). For many of these proteins, structural rearrangements resulting from homo- and/or hetero-dimerization are required for functional activation and therefore dimerization may serve as a molecular regulator. Therefore, we tested whether

Stau1, in addition to its other roles in mRNA processing, organizes Stau1-containing mRNPs through self-multimerization. In this manuscript, we provide evidence that Stau1 self-interacts in live cells to form multimeric structures and identify the molecular determinants involved in this property. We further show that these complexes contain specific RNAs.

Results

Differentially tagged-Stau1 are found in common complexes *in vivo*

To determine whether Stau1 forms complexes in mammalian cells, we used immunoprecipitation of differentially-tagged Stau1 proteins. HEK293T cells were co-transfected with plasmids coding for Stau1-HA3 and either poly(A)-binding protein (PABP)-YFP, Stau1-YFP or YFP. Western blot experiments indicated that transfected proteins were well expressed and that the levels of expression of Stau1-HA3 and Stau1-YFP were close to that of endogenous Stau1 (Fig. 1A). Proteins in the cell extracts were then immunoprecipitated using anti-GFP antibody and co-immunoprecipitated proteins were analysed by western blotting (Fig. 1A). In these conditions, Stau1-HA3 was co-immunoprecipitated with Stau1-YFP and to lesser extent with PABP-YFP. In contrast, Stau1-HA3 was not co-immunoprecipitated when co-expressed with YFP. Interestingly, endogenous Stau155 was also found in the precipitates revealing the biological relevance of these interactions. Treatment of the cell extracts with RNase A before immunoprecipitation did not abolish Stau1/Stau1 interactions but prevented PABP-YFP/Stau1-HA3 interaction. These results show that endogenous and differentially-tagged Stau1 are found in common complexes and that, if they are bound to RNA, their association is close enough to be protected from RNase degradation in contrast to that of Stau1-PABP.

To determine if Stau1 monomers can self-associate in these complexes, we used an *in vitro* pull-down assay. Bacterially expressed and purified his₆-Stau1 and his₆-NEP, used as negative control, were loaded on Ni-NTA columns. *In vitro* synthesized ³⁵S-labeled Stau1 was loaded on the his₆-Stau1 and his₆-NEP columns. After several washing steps, his₆-Stau1 and his₆-NEP were eluted from the columns and the co-eluted ³⁵S-labeled Stau1 was detected by SDS-PAGE and autoradiography (Fig. 1B). Whereas ³⁵S-labeled Stau1 was retained on the his₆-Stau1 column, it was absent from the his₆-NEP column showing that Stau1 interacts with itself in this assay. The Stau1-Stau1 interaction was done in the presence of RNase A (50 µg/ml). In these conditions, ³⁵S-labeled Stau1 still interacted with his₆-Stau1. These results indicate that Stau1 has the capacity to dimerize if not oligomerize and that protein-protein interactions contribute at least in part to Stau1 self-interaction.

Stau1 self-associates in live cells

Our results indicate that several Stau1 monomers are found in common complexes in vivo and that direct interaction may contribute to complex formation. In order to confirm the proximity (or interaction) of Stau1 molecules within mRNPs in live cells, BRET assays were used (Fig. 2A). In this technique, one candidate interacting protein is fused to *Renilla* luciferase, a luminescent energy donor, and the other to YFP, a fluorescent energy acceptor. The two fusion proteins are then coexpressed in the same cells. If the two proteins interact, their close proximity allows nonradiative energy transfer (BRET) between the luciferase and the YFP. BRET does not occur if the two proteins are separated by more than 100 Å, making the technique ideal for monitoring protein-protein interactions in biological systems. Therefore, Rluc and YFP were fused at the C-terminus of Stau1. Fixed amounts of Stau1-Rluc were transfected in combination with increasing amounts of Stau1-YFP (Fig. 2B), PABP-YFP or YFP to generate BRET saturation curves (Fig. 2C). Co-expression of Stau1-Rluc and Stau1-YFP produced a strong BRET signal in live cells comparable to that of proteins known to form obligatory dimers (Fig. 2C -GABA_B receptors) suggesting a close proximity between these two proteins. In contrast, Stau1-Rluc only produced a negligible BRET signal when co-expressed with PABP-YFP or YFP, confirming the specificity of the Stau1-Rluc/Stau1-YFP BRET signal and suggesting that the binding of two RNA-binding proteins on RNA molecules is not sufficient to induce a strong BRET signal. The BRET assay was then performed with cell extracts allowing us to determine whether the interaction is sensitive to RNase treatment or not. Cells were lysed and the resulting cell extracts were incubated in the presence or absence of RNase A at room temperature for 15 minutes before fluorescence measurement. There was no significant difference in Stau1-Rluc/Stau1-YFP BRET signals between RNase A-treated and untreated extracts (Fig. 2D).

RNA-binding activity contributes to Stau1 self-association in live cells

Although Stau1 self-association is resistant to RNase treatment and can occur with purified proteins in vitro, it is possible that an RNA molecule may be required during an initial step that triggers Stau1 self-association or that a linker RNA is protected from RNase

A degradation by bound Stau1 molecules. To determine whether Stau1 RNA-binding activity is involved in Stau1 self-association, RNA-binding defective Stau1 mutants were fused to YFP and used in the BRET assay described above to determine their ability to interact with the wild-type Stau1-Rluc. Mutations were introduced in Stau1 dsRBD3, a domain shown to carry the major Stau1 RNA-binding activity, and in dsRBD4, a domain carrying a weak RNA-binding activity *in vitro* (Wickham et al. 1999)(Fig. 3A). Four mutants were generated by either deletion of the complete dsRBD3 (Stau1 Δ 3-YFP) or dsRBD4 (Stau1 Δ 4-YFP) or through point mutations in amino acids required for RNA binding in dsRBD3 (Stau1KK-YFP) or in both dsRBD3 and dsRBD4 (Stau14K-YFP). In these mutants, lysines 153 and 154 in dsRBD3 and lysines 256 and 257 in dsRBD4 were mutated to alanines. HEK293T cells were co-transfected with plasmids coding for Stau1-Rluc and either one of the mutated fusion proteins (Fig. 3B). BRET signals were calculated in live cells 24 h post-transfection. Following expression of mutants in dsRBD3 alone (Stau1KK and Stau1 Δ 3), the BRET ratio was weakly affected being only reduced by about 20% ($77\% \pm 10\%$ and $77,5 \pm 0,9\%$, respectively) as compared to the BRET activity generated with the wild type Stau1-YFP (Fig. 3C). When mutations were introduced in both dsRBD3 and dsRBD4 (Stau14K), the BRET ratio was further reduced to 51,8% ($\pm 0,4\%$) of the one obtained with Stau1-YFP. These results indicate that Stau1 RNA-binding activity contributes to Stau1 self-association and may be required to select mRNAs in Stau1-containing mRNPs and/or help to initiate or stabilize protein-protein interaction. Nevertheless, protein-protein interaction seems to also contribute to Stau1 self-association in live cells.

Characterization of the protein-protein determinants required for Stau1 self-association

To identify the molecular determinants involved in protein interaction, we first expressed different combinations of wild type and Stau1 deletion mutants (Fig. 4A-B) fused to either Rluc or YFP and measured their BRET activity in live cells (Fig. 4C-E). When co-expressed with wild type Stau1, Stau1 Δ 2 or Stau1 Δ 5 expression reduced the BRET activity by about 20% and 50%, respectively, as compared to that obtained with wild

X

type Stau1 (Fig. 4C). These results suggest that dsRBD5 and dsRBD2 are major and minor determinants involved in the protein-protein aspect of Stau1 self-association, respectively. To further characterize these interactions, we then calculated BRET activity following co-expression of these two fusion proteins: Stau1 Δ 5-Rluc/Stau1 Δ 2-YFP, Stau1 Δ 2-Rluc/Stau1 Δ 2-YFP, Stau1 Δ 5-Rluc/Stau1 Δ 5-YFP and Stau1 Δ 2-Rluc/Stau1 Δ 5-YFP. As shown in Figure 4D, co-expression of Stau1 Δ 5-Rluc and Stau1 Δ 5-YFP showed a BRET activity that was reduced to 51,3% (\pm 0,1%) consistent with a significant role of dsRBD5 in Stau1 association. In contrast, co-expression of Stau1 Δ 2-Rluc and Stau1 Δ 2-YFP generated a BRET signal that was similar to that obtained with Stau1-Rluc and Stau1-YFP. Finally, BRET signals generated by the co-expression of the Stau1 Δ 5-Rluc/Stau1 Δ 2-YFP or Stau1 Δ 2-Rluc/Stau1 Δ 5-YFP pairs were highly reduced being only about 25% (32,8% \pm 0,2% and 24,3% \pm 0,4%, respectively) of the BRET activity generated by the Stau1 wild-type pair (Fig. 4D). Consistently, a Stau1 mutant that only carried the dsRBD4 and tubulin-binding domains (RBD4/TBD) did not generate BRET signal when expressed with wild-type Stau1 (Fig. 4E). Altogether, these results indicate that dsRBD5 is clearly involved in Stau1 self-interaction in live cells whereas the role of dsRBD2 is less clear.

To confirm that dsRBD5 and dsRBD2 are the molecular determinants involved in Stau1-Stau1 protein interaction, the yeast two-hybrid system was used. The full-length Stau1 protein was fused to the B42 transcription activator whereas each of the four dsRBDs of Stau1 and the tubulin-binding domain (TBD) were individually fused to the LexA DNA-binding domain. After selection for the presence of both plasmids in the yeast strains, cells were plated on a Ura-, His-, Trp-, Leu- medium with galactose and X-Gal. Our results showed that only yeast cells expressing the dsRBD2- and dsRBD5-LexA fusion proteins grew on the selective medium and produced β -galactosidase activity (Fig. 4F). Therefore, both dsRBD2 and dsRBD5 can interact with the full-length Stau1 protein in this assay.

Sub-cellular distribution of Stau1 and Stau1 mutants

To determine whether the differential BRET responses obtained with the Stau1 mutants may be explained by major defects in the sub-cellular distribution of these proteins, Stau1-YFP and Stau1-YFP mutants were expressed in COS-7 cells and their sub-cellular

distribution observed by fluorescence microscopy. HEK293T cells were not used in this assay because of the small size of their cytoplasm. As previously shown (Marion et al. 1999; Wickham et al. 1999), Stau1-YFP showed a granular distribution in the cytoplasm and nuclear exclusion. Stau1 Δ 5-YFP, a mutant that produced weak BRET signals (Fig. 4), had a sub-cellular distribution similar to that of Stau1-YFP (Fig. 5). As compared to Stau1-YFP, Stau1KK-YFP showed an additional weak nucleolar distribution and mutants in the RNA-binding domains dsRBD3 and dsRBD4 showed cytosolic granules that are lightly bigger than those observed with Stau1-YFP. However, this cannot explain the difference in the BRET response of Stau14K-YFP as compared to the others (Fig. 3C). The distribution of 4/TBD-YFP is random and similar to that of YFP alone as previously described (Luo et al. 2002).

Stau1 forms oligomers in live cells

Knowing that Stau1 is present in large mRNP complexes, we assess the capacity of Stau1 to form higher order structures in live cells. To this end, we combined protein complementation (PCA) and BRET assays (Fig. 6A). For the PCA assay, *Rluc* is cut into two non-functional half (*RlucF1* and *RlucF2*). Each half of the split luciferase protein cannot by itself generate light when express into cells. However, their fusion to proteins that interact via protein-protein interaction allows the reconstitution of a functional luciferase and light emission. Therefore, the N-terminal half (Stau1-*RlucF1*) and the C-terminal half (Stau1-*RlucF2*) of a split *Rluc* protein were fused at the C-terminus of Stau1. Consistent with the BRET assay, co-expression of Stau1-*RlucF1* and Stau1-*RlucF2* reconstituted a functional luciferase that produced light (8293 ± 1341 arbitrary units (AU)) via Stau1-Stau1 interaction whereas expression of either fusion protein alone did not (580 ± 87 and 529 ± 41 AU, respectively). Then, to determine whether additional Stau1 molecules can interact with this complex in live cells, the PCA assay with Stau1-*RlucF1* and Stau1-*RlucF2* was repeated in the presence of increasing concentration of Stau1-YFP for BRET measurement. If Stau1 induces the formation of large complexes, a complete Stau1-Stau1-*Rluc* will be reconstituted and will transfer energy to the Stau1-YFP that will be present in the same complex. As shown in figure 6B, co-expression of Stau1-*RlucF1* and Stau1-

RlucF2 and *Stau1-YFP* produced a strong BRET saturation curve, suggesting that at least three *Stau1* molecules associate in these complexes. These interactions between *Stau1* molecules were resistant to RNase treatment (Fig. 6C), consistent with results shown in Fig. 2D. In contrast, *Stau1-RlucF1* and *Stau1-RlucF2* did not produce BRET activity when co-expressed with YFP or PABP-YFP (Fig. 6B). Other controls were done with CXCR4, a protein that does not interact with *Stau1*. *Stau1-RlucF1* and CXCR4-*RlucF2* as well as *Stau1-RlucF2* and CXCR4-*RlucF1* did not produce significant luciferase activity when co-expressed (533 ± 59 and 613 ± 19 AU, respectively); CXCR4-*RlucF1* and CXCR4-*RlucF2* two proteins known to interact in live cells (Hamdan et al. 2006) did not transfer energy to *Stau1-YFP* in the BRET assay (data not shown).

Stau1-containing oligomeric complexes contain RNAs

To determine whether *Stau1*-containing oligomeric complexes contain RNAs, we modified the live cells assay that combined PCA and BRET to detect RNA-protein interaction (Fig. 7A). In this assay, *Stau1-RlucF1* and *Stau1-RlucF2* were co-expressed to reconstitute luciferase activity while SYTO 14, a dye that stains RNA was used as the energy acceptor. If *Stau1*-containing oligomers associate with RNA, BRET signal will be generated as a consequence of the close proximity between the reconstituted *Rluc* and SYTO 14. As shown in Figure 7B, expression of both *Stau1-Rluc* and the split *Stau1-RlucF1* and *Stau1-RlucF2* generated BRET signals when RNA was stained with SYTO 14 indicating that RNAs are present in the *Stau1*-containing complex. In contrast, *Rluc* activity resulting from interaction of the split protein kinase A (PKA) regulatory subunit-*RlucF1* and PKA catalytic subunit-*RlucF2* did not induce BRET signal in the presence of SYTO 14. Whereas luciferase activity generated by interaction of the split *Rluc* fusion proteins was not impaired by RNase treatment (data not shown and Fig. 6C), the observed *Stau1-Stau1-Rluc/SYTO 14* BRET signal was sensitive to RNase treatment indicating that *Stau1*-containing complexes indeed contain RNAs (Fig. 7C).

To confirm the formation of RNA-containing *Stau1*-oligomers, a biochemical approach involving two successive immunoprecipitation steps was used. HEK293T cells were transfected with plasmids coding for *Stau1-HA3* and either YFP, *Stau1-YFP* and/or

Stau1-FLAG (Fig. 8A). The level of expression of these proteins was evaluated by western blotting. First, Stau1-containing complexes were immunoprecipitated with anti-FLAG antibodies and eluted with the FLAG peptide. The resulting complexes contained Stau1-HA3 and Stau1-YFP when co-expressed. Then, Stau1-FLAG-containing complexes were re-immunoprecipitated using anti-GFP antibody. The resulting pellet also contained Stau1-HA3 and Stau1-FLAG indicating that the three tagged-Stau1 proteins were present in the same complexes. As controls, other combinations of transfected Stau1-tagged molecules lacking either Stau1-FLAG or Stau1-GFP did not bring down Stau1-HA3.

To determine whether the Stau1-containing oligomeric complexes contain RNAs, immunoprecipitates obtained from the successive-IPs were treated with Trizol reagent to isolate putative RNAs and the resulting material was analyzed by qRT-PCR. Arf1 and PAICS mRNAs, two known Stau1-bound mRNAs (Kim et al. 2005) were specifically amplified from samples of the two successive IPs and were absent from other controls IPs (Fig. 8B). A major enrichment of Arf1 and PAICS mRNAs was observed in the multimeric complexes as compared to controls.

Discussion

Many proteins self-associate to generate dimers and/or oligomers and this structural reorganization is essential to control their function, structure and/or regulation (Marianayagam et al. 2004). Enzymatic regulation, cell signalling, DNA binding and regulation of gene expression are a few examples among all the molecular activities that are regulated by protein self-interaction. Especially, proteins of the dsRBP family such as PKR, TRBP2, XlrpA, ADAR2, PACT and Rnt1p are known to form homo- and/or heterodimers (Lamontagne et al. 2000; Daher et al. 2001; Peters et al. 2001; Hitti et al. 2004; Lemaire et al. 2005; Valente and Nishikura 2007). The structural rearrangement resulting from dimerization is required for their functional activation and therefore dimerization serves as a molecular regulator (Daher et al. 2001; Peters et al. 2001; Valente and Nishikura 2007). In this paper, we show that Stau1, as other members of the dsRBP family, self-associates. Using novel approaches in live cells, we further showed that Stau1 generates multimeric complexes through both RNA-binding activity and protein-protein self-interaction and that these complexes contain specific RNAs. Our results suggest that Stau1 has the potential to act as a scaffolding protein that organizes mRNAs into functional mRNPs.

Molecular determinants for mRNP formation

Our BRET assays indicate that Stau1 RNA binding activity or intact dsRBD3 and dsRBD4 contributes for about 50% of the Stau1 self-association (Fig. 3). Several biochemical studies (Nanduri et al. 2000) as well as NMR and crystallographic structures of bacterially expressed dsRBDs (Bycroft et al. 1995; Kharrat et al. 1995; Ryter and Schultz 1998; Nanduri et al. 2000; Ramos et al. 2000) indicate that RNA-binding competent dsRBDs behave as monomeric forms. Therefore, it is likely that the contribution of these domains to Stau1 self-interaction depends on their capability to bind RNA and not on putative protein-protein interaction. In addition, our observation that protein interactions occur via other domains that do not bind RNAs *in vitro* (Wickham et al. 1999) supports a model in which dsRBD3 and dsRBD4 are free to interact with mRNAs. Stau1 RNA-binding activity may then be used to recognize and select mRNAs to be included in

mRNPs. Subsequently, it may facilitate the association of Stau1 monomers on a dsRNA structure and then facilitate the recognition, formation and/or maintenance of protein-protein interaction mediated by dsRBD5 and dsRBD2.

The RNA-binding activity is nevertheless not essential for subsequent protein-protein interaction. Indeed, about 50% of the BRET activity is still detectable when RNA-binding deficient Stau1 mutants are expressed in vivo (Fig. 3). Accordingly, Stau1 self-association can be detected in vitro using purified proteins in the presence of RNase (Fig. 1B) revealing the intrinsic property of Stau1 to self-associate. This is consistent with previous studies in which dsRBPs form dimers through both dsRBDs and other domains not involved in RNA-binding (Lamontagne et al. 2000; Daher et al. 2001; Peters et al. 2001; Hitti et al. 2004; Valente and Nishikura 2007). Our results identified dsRBD5 as the major determinant for protein-protein interaction, contributing for about 50% of the Stau1 self-interaction (Fig. 4C). Homophilic interaction between dsRBD5s may contribute to stabilize particle formation on mRNAs. The role of dsRBD2 is less clear. Although it can interact with Stau1 in the yeast assay (Fig. 4F), its deletion has no impact on the BRET signal in live cells (Fig. 4C). Interestingly, heterophilic interactions between dsRBD5 and the N-terminal end of Stau1 (including dsRBD2) were observed in the yeast two-hybrid assay (unpublished data). This observation would permit to generate large multimeric complexes through homo- and heterophilic interactions between dsRBDs. Moreover, it opens the additional possibility that Stau1 structure and/or functions may be regulated by intra-molecular interaction between the N-terminal domain and dsRBD5. A similar regulatory mechanism has been described for Rnt1p, a member of the dsRBP family in yeast, in which an N-terminal domain established intra-molecular interaction with the C-terminal dsRBD (Lamontagne et al. 2000). Competition between intra-molecular Nter-dsRBD5 interaction and inter-molecular homophilic binding of dsRBD5 may control Stau1 self-association and, as a consequence, Stau1 structure/functions. Alternatively, deletion of dsRBD2 may somehow destabilize dsRBD3-mediated RNA-binding activity. This may not be crucial in the presence of functional dsRBD5 (Fig. 4C,D – Stau1-Stau1 Δ 2, Stau1 Δ 2-

Stau1 Δ 2) but it may explain why Stau1 Δ 2 and Stau1 Δ 5 only poorly interact in live cells (Fig. 4D) when dsRBD5-mediated protein-protein interactions are prevented.

Stau1 and the organization of mRNP complexes

The involvement of both Stau1 RNA-binding activity and protein-protein interaction for Stau1 self-multimerization suggests that Stau1 may act as an organizer of mRNP formation. In this model, Stau1 recognizes and binds specific mRNAs to be transported via its RNA-binding domains and organizes these mRNAs into functional mRNP complexes through protein-protein interaction involving dsRBD5 and likely dsRBD2. Interestingly, two of the known Stau1 RNA substrates are known to form homodimers: *bicoid* mRNAs in *Drosophila* (Ferrandon et al. 1997) and HIV-1 genomic RNA in humans (Darlix et al. 1990). Therefore, complexes may be formed through both Stau1 and RNA self-association. This novel function of Stau1 in complex formation would be complementary to other known downstream functions of Stau1 in mRNA transport, translation and decay. Moreover, Stau1 was shown to make direct protein-protein interaction with tubulin (Wickham et al. 1999), ribosomes (Luo et al. 2002; Brendel et al. 2004), the non-sense mediated factor Upf1 (Kim et al. 2005; Gong et al. 2009) and protein phosphatase I (Monshausen et al. 2002), proteins known to be present in Stau1-containing mRNPs. Therefore, not only Stau1 can organize mRNPs through self-association, it can also attract additional RNP-associated proteins through direct interaction. Interestingly, all these interactions were mapped within the Stau1 TBD domain, a region that is not involved in RNA-binding or Stau1 self-association. Therefore, Stau1 has the capability to select mRNAs, organize multimeric mRNA-protein structures and attract additional proteins to form functional mRNPs.

Several data in the literature are consistent with this model. First, Stau1 is known to co-localize with mRNAs in mRNP complexes (Kiebler et al. 1999; Duchaine et al. 2000; Monshausen et al. 2001; Mallardo et al. 2003; Kanai et al. 2004; Furic et al. 2008) and directly bind mRNAs through a specific cis-acting element (Wickham et al. 1999; Kim et al. 2007) indicating that Stau1 has the capability to select mRNAs to be transported and form functional mRNPs. Second, biochemical and proteomic studies have shown that Stau1

is a component of large complexes that contain mRNA and protein cofactors (Krichevsky and Kosik 2001; Mallardo et al. 2003; Brendel et al. 2004; Villace et al. 2004). Its capacity to bind both mRNAs and specific mRNP-associated proteins via protein-protein interaction (see above) will facilitate the coordination between the fate of Stau1-bound mRNAs and proteins required to fulfil the functions. Third, relatively few Stau1 molecules were detected as monomers or dimers (Mallardo et al. 2003) indicating that Stau1 forms higher order structures. The biochemical and BRET/PCA results (Fig. 6,7,8) that show the ability of Stau1 to form oligomers in live cells support this conclusion. Fourth, in situ hybridization using Stau1-bound mRNA sequences as probes revealed that, as a consequence of Stau1 down-regulation the amount of granules containing these specific mRNAs is reduced in dendrites (Kanai et al. 2004; Vessey et al. 2008). Although these data can be interpreted as an indication that Stau1 down-regulation impairs mRNA transport, it may also indicate that Stau1 down-regulation also impairs mRNPs formation. Finally, the oligomeric nature of Stau1-containing particles in dendrites was exemplified in mouse with a loss of function allele for Stau1 (*Stau1^{tm1Apa}*). Whereas a transport-defective Δ Stau1-YFP was not properly transported in dendrites following transfection in hippocampal neurons derived from *Stau1^{tm1Apa}* mouse, it was normally transported in neurons from wild type mouse (Vessey et al. 2008). This result indicates that wild type Stau1 can rescue the transport of Δ Stau1 likely through interaction that forms functional mRNPs to be transported in dendrites. A similar mechanism can be used to control the functions of mRNP complexes. Of particular interest is Stau1i, a Stau1 isoform that contains an insertion of 6 amino acids in dsRBD3 that impairs its ability to bind RNA and causes the formation of RNA-binding defective particles (Duchaine et al. 2000; Monshausen et al. 2001). Its association with Stau1 in mRNPs modulates the RNA content of Stau1-containing mRNPs and their functions.

In conclusion, our results suggest that the formation of large Stau1-containing mRNP complexes may be initiated by Stau1 itself through both RNA-binding and homophilic and heterophilic protein-protein interactions. This mechanism may represent a first step for the regulation of downstream Stau1 functions such as mRNA transport and

localization (Kanai et al. 2004), nuclear transit (Martel et al. 2006), translation regulation (Dugre-Brisson et al. 2005), interaction with the cytoskeleton (Wickham et al. 1999) and Stau1-mediated mRNA decay (Kim et al. 2005; Kim et al. 2007). Using sensitive and novel approaches, we were able for the first time to show that Stau1 dimers and most likely oligomers are associated with mRNAs. These techniques will contribute to our understanding of mRNA particle formation and transport and of how their misregulation may impair Stau1-mediated cellular functions.

Materials and methods

Antibodies and reagents

Goat polyclonal and mouse monoclonal anti-GFP antibodies were obtained from Rockland and Roche Applied Science, respectively, mouse monoclonal anti- β -actin clone AC-74 and mouse monoclonal anti-FLAG M2 from Sigma-Aldrich. The mouse monoclonal anti-Stau1 (clone 11C6) and anti-HA (clone 12CA5) antibodies were previously described (Dugre-Brisson et al. 2005). Anti-mouse and anti-goat polyclonal antibodies conjugated to horseradish peroxidase were obtained from DakoCytomation. X-gal and imidazole were purchased from Bioshop. Western blot signals were detected using Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences).

cDNA constructions

YFP-fused Stau1 mutants (Luo et al. 2002), Stau1-Rluc (Chatel-Chaix et al. 2004), Stau1-HA3, Stau1 Δ 2-his6 plasmids (Wickham et al. 1999), GABABR1-YFP, GABABR2-Rluc (Perroy et al. 2003) and PKAreg-RlucF1 and PKAcatRlucF2 (Stefan et al. 2007) were previously described. Stau1 Δ 2-Rluc and Stau1 Δ 5-Rluc were constructed from Stau1-Rluc by the all-around technique. Oligonucleotides used to generate these constructs are listed in Table I. The 4K mutant was constructed from the 2K mutant (Dugre-Brisson et al. 2005) by the all-around technique (Table I). The PCR fragment corresponding to PABP was digested with BamHI and cloned in pCMV-YFP-topaz (Packard Bioscience/PerkinElmer LifeSciences).

PCR fragments corresponding to dsRBD2, dsRBD3, dsRBD4 and dsRBD5 of Stau1 (Table I) were digested with EcoRI and XhoI enzymes and cloned into pLexA pre-digested with EcoRI and XhoI. PCR fragment corresponding to TBD domain was digested with MunI and XhoI and cloned into pLexA pre-digested with EcoRI and XhoI. Full length Stau1 was obtained by PCR amplification (Table I) and digested with XhoI enzyme. This fragment was cloned into pB42AD pre-digested with XhoI enzyme.

Recombinant protein production and purification

Bacterially expressed his6-Stau1 and neutral endopeptidase his6-NEP were purified as previously described (Wickham et al. 1999). Aliquots of the purified proteins were stored at -80°C until use. Protein concentration was determined by the BioRad dye reagent and BSA as a standard. For the pull-down assays, his6-Stau1 and his6-NEP (as control) were immobilized on a Ni-NTA-agarose matrix and *in vitro* translated 35S-labelled Stau1 was loaded onto the column. After extensive washings, bound proteins were eluted with 300 mM imidazole and three elution successive fractions were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. In parallel, the *in vitro* translated 35S-Stau1 extract was treated with 20 pg/ml RNase A for 1 hour prior to loading.

Yeast two-hybrid assay

The EGY48 strain was transformed with the pLexA or pB42 plasmids containing the Stau1 fragments of interest. Yeast cells were grown in either synthetic growth media lacking the nutrients indicated or rich media.

Cell culture, transfection and BRET assay

Human embryonic kidney (HEK) 293T cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (Invitrogen) supplemented with 10% cosmic calf serum (HyClone). Transfections were carried out with the Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen). BRET experiments were carried out as described (Chatel-Chaix et al. 2004; Chatel-Chaix et al. 2007). Briefly, cells were plated into 12 well plates at 120 000 cells per well. 24 hours later, cells were transfected with constant amounts of plasmids coding for *Rluc*-tagged fusion protein (10 ng) and increasing amounts of plasmids coding for YFP-tagged proteins (0 to 500 ng) as indicated. BRET assays were performed 24 hours post-transfection in live cells. Cells were washed twice with phosphate buffered saline (PBS) at room temperature and diluted to 10⁶ cells per ml. Coelenterazine H (NanoLight Technology) was added to 90 µL

of cells at a final concentration of 5 μ M. A saturation curve can be drawn when the *Rluc*-tagged protein becomes saturated by YFP-tagged proteins, and an optimal BRET ratio can be calculated at saturation for a specific protein-protein interaction. Luminescence (440- to 500-nm) as well as total and transmitted fluorescence (510- to 590-nm) emissions were measured using a Fusion -FP apparatus (Perkin-Elmer). The BRET ratio was defined as $[(\text{emission at 510 to 590 nm}) - (\text{emission at 440 to 500 nm}) \times C_f] / (\text{emission at 440 to 500 nm})$, where C_f corresponds to $(\text{emission at 510 to 590 nm}) / (\text{emission at 440 to 500 nm})$ when *Rluc*-fused protein is expressed alone. The total YFP activity/*Rluc* activity ratio reflects the relative levels of activity of the two fusion proteins in the cells. When BRET was carried out in cell extracts, cells were lysed in 200 μ L of lysis buffer (0.1 M Tris-Cl, pH 7.9, 0.5% NonidetP40 and 1mM DTT) and incubated at room temperature for 15 minutes with or without 30 μ g/ml of RNase A (Fermentas).

For BRET between *Stau1-Rluc* and RNA, 1 μ L of SYTO 14 (Invitrogen), an RNA selective fluorescence dye used as energy acceptor, was added to 100 000 cells or to cell extracts and was incubated for 20 minutes at room temperature. Because the emission of SYTO14 is shifted to the red compared to that of YFP, a 550 longpass filter (Chroma) was used as acceptor filter. The BRET ratio was calculated as described before by making the ratio of the acceptor filter over the donor filter.

Microscopy

COS-7 cells were transfected with plasmids (500 ng) coding for different *Stau1* mutants using PEI as previously described (Guerra-Crespo et al. 2003). Cells were fixed in a freshly made 4 % paraformaldehyde solution in PBS for 20 min at room temperature and permeabilized with 0,1 % Triton X-100 in PBS. Cover-slips were mounted on microscope slides using DAKO fluorescent medium and images were taken on a Nikon TE2000U equipped with a CoolSnap fx CCD camera, a 60X objective (Pan Apo, N.A. 1,4) and a YFP filter cube (Chroma #41028). Images were treated in ImageJ 1.43d. The YFP channel

were gamma corrected (0.5), the black level was subtracted (modal value) and the brightness and contrast was set to 0,5 % saturation.

Immunoprecipitation and qRT-PCR

HEK293T cells transfected with the indicated plasmids were harvested twenty four post-transfection, washed 3 times in ice-cold PBS and lysed in buffer (50 mM Tris-Cl pH 7.5, 1% Triton X-100, 15 mM EGTA, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail [Roche Applied Science]) supplemented or not with RNaseOUT RNase inhibitor [Invitrogen]. Lysates were cleared by centrifugation at 17 000 g for 15 minutes. The supernatant was incubated with or without 30 µg/ml of RNase A for 10 minutes at 37°C and then pre-cleared with protein G-sepharose (GE Healthcare) for 45 minutes at 4°C. After centrifugation, the supernatant was incubated with goat polyclonal anti-GFP antibodies for two hours at 4°C and then with protein G-sepharose for 90 minutes at 4°C. Immune complexes were washed three times with the lysis buffer and eluted from the resin by heating at 95°C for 5 minutes in 2X protein loading buffer (125 mM Tris-Cl pH 6.8, 10% glycerol, 3.3% SDS, 0,2M DTT and 0.04% bromophenol blue). Proteins were analysed by SDS-PAGE and Western blotting using monoclonal antibodies against the indicated proteins.

For the successive immunoprecipitation experiments, lysates were prepared as described above except that DTT and RNase inhibitor were omitted. The first immunoprecipitation was carried out with anti-FLAG M2 affinity gel (Sigma-Aldrich) and eluted with the FLAG peptide (Sigma-Aldrich) as described previously (Chatel-Chaix et al. 2008). The eluate was then pre-cleared with protein G-sepharose and the second immunoprecipitation was performed with polyclonal anti-GFP as described above. One third of the immune complex was analysed by SDS-PAGE and Western blotting and the two third was used for qRT-PCR analysis. To this end, RNA was isolated from the immunoprecipitates using the TRIZOL Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's procedure. RNA was resuspended in 50 µL water and digested with DNase

using the TURBO DNA-free kit (Ambion). Reverse transcription reactions were done with 4 μ L of RNA using the MuLV RT enzyme from the GeneAmp RNA PCR kit (Applied Biosystems), according to the manufacturer's procedure. Specific antisense primers used to produce the cDNAs were 5'-AGATCAGGCCTTGTGTGTTCTGGA-3' for Arf1 and 5'-TTGAACAGCCAAGACCACTGGGTA-3' for PAICS. Resulting cDNAs were qPCR amplified using the LightCycler 480 SYBR Green I Master kit (Roche) and the LightCycler 480 instrument (Roche). Sense and antisense primers are described in Table I.

Acknowledgements

We thank the technical assistance of Francis Goyette, Phu Vinh On, Monique Vasseur, Louise Cournoyer and Linda Huang. CM, TD, VT and SDB were supported by studentships from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and KB received studentships from the Fonds de Recherche en Santé du Québec. This work was supported by a grant from NSERC to LDG.

References

- Brendel, C., Rehbein, M., Kreienkamp, H.J., Buck, F., Richter, D., and Kindler, S. 2004. Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *The Biochemical journal* **384**(Pt 2): 239-246.
- Buchner, G., Bassi, M.T., Andolfi, G., Ballabio, A., and Franco, B. 1999. Identification of a novel homolog of the *Drosophila* staufen protein in the chromosome 8q13-q21.1 region. *Genomics* **62**(1): 113-118.
- Bycroft, M., Grunert, S., Murzin, A.G., Proctor, M., and St Johnston, D. 1995. NMR solution structure of a dsRNA binding domain from *Drosophila* staufen protein reveals homology to the N-terminal domain of ribosomal protein S5. *The EMBO journal* **14**(14): 3563-3571.
- Chatel-Chaix, L., Abrahamyan, L., Frechina, C., Mouland, A.J., and Desgroseillers, L. 2007. The host protein Staufen1 participates in HIV-1 assembly in live cells by influencing pr55Gag multimerization. *Journal of virology*.
- Chatel-Chaix, L., Boulay, K., Mouland, A.J., and Desgroseillers, L. 2008. The host protein Staufen1 interacts with the Pr55Gag zinc fingers and regulates HIV-1 assembly via its N-terminus. *Retrovirology* **5**: 41.
- Chatel-Chaix, L., Clement, J.F., Martel, C., Beriault, V., Gatignol, A., DesGroseillers, L., and Mouland, A.J. 2004. Identification of Staufen in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Molecular and cellular biology* **24**(7): 2637-2648.
- Daher, A., Longuet, M., Dorin, D., Bois, F., Segeral, E., Bannwarth, S., Battisti, P.L., Purcell, D.F., Benarous, R., Vaquero, C. et al. 2001. Two dimerization domains in the trans-activation response RNA-binding protein (TRBP) individually reverse the protein kinase R inhibition of HIV-1 long terminal repeat expression. *The Journal of biological chemistry* **276**(36): 33899-33905.
- Darlix, J.L., Gabus, C., Nugeyre, M.T., Clavel, F., and Barre-Sinoussi, F. 1990. Cis elements and trans-acting factors involved in the RNA dimerization of the human immunodeficiency virus HIV-1. *Journal of molecular biology* **216**(3): 689-699.
- 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**(3): 527-529.
- Dubnau, J., Chiang, A.S., Grady, L., Barditch, J., Gossweiler, S., McNeil, J., Smith, P., Buldoc, F., Scott, R., Certa, U. et al. 2003. The staufen/pumilio pathway is involved in *Drosophila* long-term memory. *Curr Biol* **13**(4): 286-296.

- 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. *Molecular and cellular biology* **20**(15): 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. *Journal of cell science* **115**(Pt 16): 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 research* **33**(15): 4797-4812.
- 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. *The EMBO journal* **16**(7): 1751-1758.
- Furic, L., Maher-Laporte, M., and DesGroseillers, L. 2008. A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes. *RNA (New York, NY)* **14**(2): 324-335.
- Gong, C., Kim, Y.K., Woeller, C.F., Tang, Y., and Maquat, L.E. 2009. SMD and NMD are competitive pathways that contribute to myogenesis: effects on PAX3 and myogenin mRNAs. *Genes & development* **23**(1): 54-66.
- Guerra-Crespo, M., Charli, J.L., Rosales-Garcia, V.H., Pedraza-Alva, G., and Perez-Martinez, L. 2003. Polyethylenimine improves the transfection efficiency of primary cultures of post-mitotic rat fetal hypothalamic neurons. *J Neurosci Methods* **127**(2): 179-192.
- Hamdan, F.F., Percherancier, Y., Breton, B., and Bouvier, M. 2006. Monitoring protein-protein interactions in living cells by bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Curr Protoc Neurosci* **Chapter 5**: Unit 5 23.
- Hitti, E.G., Sallacz, N.B., Schoft, V.K., and Jantsch, M.F. 2004. Oligomerization activity of a double-stranded RNA-binding domain. *FEBS letters* **574**(1-3): 25-30.
- Kanai, Y., Dohmae, N., and Hirokawa, N. 2004. Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* **43**(4): 513-525.
- Kharrat, A., Macias, M.J., Gibson, T.J., Nilges, M., and Pastore, A. 1995. Structure of the dsRNA binding domain of E. coli RNase III. *The EMBO journal* **14**(14): 3572-3584.
- 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**(1): 288-297.

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**(3): 403-412.

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**(2): 195-208.

Kim, Y.K., Furic, L., Parisien, M., Major, F., Desgroseillers, L., and Maquat, L.E. 2007. Staufen1 regulates diverse classes of mammalian transcripts. *The EMBO journal* **26**(11): 2670-2681.

Krichevsky, A.M. and Kosik, K.S. 2001. Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron* **32**(4): 683-696.

Lamontagne, B., Tremblay, A., and Abou Elela, S. 2000. The N-terminal domain that distinguishes yeast from bacterial RNase III contains a dimerization signal required for efficient double-stranded RNA cleavage. *Molecular and cellular biology* **20**(4): 1104-1115.

Lebeau, G., Maher-Laporte, M., Topolnik, L., Laurent, C.E., Sossin, W., Desgroseillers, L., and Lacaille, J.C. 2008. Staufen1 regulation of protein synthesis-dependent long-term potentiation and synaptic function in hippocampal pyramidal cells. *Molecular and cellular biology* **28**(9): 2896-2907.

Lemaire, P.A., Lary, J., and Cole, J.L. 2005. Mechanism of PKR activation: dimerization and kinase activation in the absence of double-stranded RNA. *Journal of molecular biology* **345**(1): 81-90.

Liu, J., Hu, J.Y., Wu, F., Schwartz, J.H., and Schacher, S. 2006. Two mRNA-binding proteins regulate the distribution of syntaxin mRNA in Aplysia sensory neurons. *J Neurosci* **26**(19): 5204-5214.

Lunde, B.M., Moore, C., and Varani, G. 2007. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(6): 479-490.

Luo, M., Duchaine, T.F., and DesGroseillers, L. 2002. Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association. *The Biochemical journal* **365**(Pt 3): 817-824.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(4): 2100-2105.

- Marianayagam, N.J., Sunde, M., and Matthews, J.M. 2004. The power of two: protein dimerization in biology. *Trends in biochemical sciences* **29**(11): 618-625.
- 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. *Molecular and cellular biology* **19**(3): 2212-2219.
- Martel, C., Macchi, P., Furic, L., Kiebler, M.A., and Desgroseillers, L. 2006. Staufen1 is imported into the nucleolus via a bipartite nuclear localization signal and several modulatory determinants. *The Biochemical journal* **393**(Pt 1): 245-254.
- Martin, K.C. and Ephrussi, A. 2009. mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell* **136**(4): 719-730.
- 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. *The EMBO journal* **19**(6): 1366-1377.
- 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. *Journal of neurochemistry* **76**(1): 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. *Journal of neurochemistry* **81**(3): 557-564.
- Nanduri, S., Rahman, F., Williams, B.R., and Qin, J. 2000. A dynamically tuned double-stranded RNA binding mechanism for the activation of antiviral kinase PKR. *The EMBO journal* **19**(20): 5567-5574.
- Perroy, J., Adam, L., Qanbar, R., Chenier, S., and Bouvier, M. 2003. Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *The EMBO journal* **22**(15): 3816-3824.
- Peters, G.A., Hartmann, R., Qin, J., and Sen, G.C. 2001. Modular structure of PACT: distinct domains for binding and activating PKR. *Molecular and cellular biology* **21**(6): 1908-1920.
- 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. *The EMBO journal* **19**(5): 997-1009.

- Rodriguez, A.J., Czaplinski, K., Condeelis, J.S., and Singer, R.H. 2008. Mechanisms and cellular roles of local protein synthesis in mammalian cells. *Current opinion in cell biology* **20**(2): 144-149.
- 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. *The EMBO journal* **17**(24): 7505-7513.
- Sossin, W.S. and DesGroseillers, L. 2006. Intracellular trafficking of RNA in neurons. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **7**(12): 1581-1589.
- St Johnston, D., Beuchle, D., and Nusslein-Volhard, C. 1991. Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the Drosophila egg. *Cell* **66**(1): 51-63.
- Stefan, E., Aquin, S., Berger, N., Landry, C.R., Nyfeler, B., Bouvier, M., and Michnick, S.W. 2007. Quantification of dynamic protein complexes using Renilla luciferase fragment complementation applied to protein kinase A activities in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(43): 16916-16921.
- Valente, L. and Nishikura, K. 2007. RNA binding-independent dimerization of adenosine deaminases acting on RNA and dominant negative effects of nonfunctional subunits on dimer functions. *The Journal of biological chemistry* **282**(22): 16054-16061.
- Vessey, J.P., Macchi, P., Stein, J.M., Mikl, M., Hawker, K.N., Vogelsang, P., Wiczorek, K., Vendra, G., Riefler, J., Tubing, F. et al. 2008. A loss of function allele for murine Staufen1 leads to impairment of dendritic Staufen1-RNP delivery and dendritic spine morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(42): 16374-16379.
- 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 research* **32**(8): 2411-2420.
- 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. *Molecular and cellular biology* **19**(3): 2220-2230.

Table I
Primers used for PCR amplification

Domain	Orientation	Restriction	Sequence
Stm1 ⁴⁰ -fluc	Sense	-	5'-GAGGTGAATGGAAGAGAATCCGAA-3'
	Antisense	-	5'-CATAAGCTTGATATCTGCAGACG-3'
Stm1 ⁴³ -fluc	Sense	-	5'-ATCCACCCGGCTAGAGCCACC-3'
	Antisense	-	5'-CTCAGAGGGTCTGTGAGAGG-3'
Stm1 ⁴⁶ -fluc	Sense	-	5'-GCACCAACGGGGGGTGGCCA-3'
	Antisense	-	5'-TGGCCACCGCCGGTGGTGC-3'
Stm1-fluc ^{F1/F2}	Sense	NotI	5'-TAGCATGGGCGGCATGAAACTTGGAAAAAACC-3'
	Antisense	ChfI	5'-AGAGATATCGATGCACCTCCACACACA-3'
PABP-YFP	Sense	BamHI	5'-ACAAGGATCCGCCACCATGAAACCCAGTGCC-3'
	Antisense	BamHI	5'-TTGTGGATCCGCAACAGTTGGAACACCGGT-3'
dsRBD1-pLexA	Sense	EcoRI	5'-TAGATATCGAATTCGCCGCCATGGGATACCCATTCCAG-3'
	Antisense	XhoI	5'-TATACTCGAGGATATCCAGGATCCTCAA-3'
dsRBD3-pLexA	Sense	EcoRI	5'-TAGATATCGAATTCGCCGCCATGGGAAAATCTGAAATAAGT-3'
	Antisense	XhoI	5'-TATAACTCGAGGATATCAACTGCAGTGCAGG-3'
dsRBD4-pLexA	Sense	EcoRI	5'-TAGATATCGAATTCGCCGCCATGGGAAATCCGATTAGC-3'
	Antisense	XhoI	5'-TATACTCGAGGATATCAAGGATCCTCCAG-3'
dsRBD5-pLexA	Sense	EcoRI	5'-TAGATATCGAATTCGCCGCCATGGGACCCTCTGAGCAA-3'
	Antisense	XhoI	5'-TATACTCGAGGATATGCACCTCCACACAC-3'
TBD-pLexA	Sense	MunI	5'-TAGATATCCAATTCGCCGCCATGGGAAAACCCGCCACT-3'
	Antisense	XhoI	5'-TATACTCGAGGATATGGCAGTTACCGTGGC-3'
Stm1-pB42AD	Sense	XhoI	5'-GATGCTCGAGATGAAACTTGGAAAAAACC-3'
	Antisense	XhoI	5'-TATACTCGAGGATATGCACCTCCACACAC-3'
Arl1	Sense	-	5'-TCAACGTGGAAACCGTGGAGTACA-3'
	Antisense	-	5'-AGATCAGGCCTTGTGTCTTCTGGA-3'
PAICS	Sense	-	5'-TTTGGGACCAGTGATGTCCTGGAA-3'
	Antisense	-	5'-TTGAACAGCCAAGACCACTGGGTA-3'

Figure legends

Figure 1. Differentially tagged-Stau1s are found in common complexes *in vivo*. (A) HEK293T cells were mock transfected or co-transfected with Stau1-HA3 expressor and either YFP, PABP-YFP or Stau1-YFP expressors in the absence or presence of RNase A as indicated. An aliquot of the proteins in the cell extracts was separated by SDS-PAGE (left panels - input) and the remaining extracts were immunoprecipitated using anti-GFP antibody (right panels – IP GFP). Proteins were analysed by western blotting using anti-Stau1, anti-GFP and anti-HA antibodies, as indicated. Anti- β -actin antibody was used as a loading control. Molecular weight markers are indicated on the left side of the gels. As control for RNase A digestion, total RNAs were isolated and separated on agarose gel. Ribosomal RNAs (rRNA) were detected by ethidium bromide staining. (B) Bacterially expressed his6-Stau1 or his6-NEP (as control) fusion proteins were fixed on a Ni-NTA column and extensively washed. *In vitro* synthesized ³⁵S-Stau1 was loaded onto the columns. Columns were washed and then his6-Stau1 and his6-NEP were eluted and collected in three successively fractions (lanes 1,2,3). The co-eluted ³⁵S-Stau1 protein was separated by SDS-PAGE and visualized by autoradiography. In parallel, his6-Stau1 and ³⁵S-Stau1 preparations were treated with RNase A before loading onto the columns. An aliquot of ³⁵S-Stau1 was also loaded on the gel (lane: load) to control for its synthesis and size.

Figure 2. Stau1 self-associates in live cells as measured by BRET. (A) Schematic representation of the BRET assay. Black and grey boxes represent the double-stranded RNA-binding domains with major (dsRBD3) and minor (dsRBD4) dsRNA-binding activity, respectively; white boxes represent domains with no demonstrated RNA-binding activity (dsRBD2 and dsRBD5) and the hatched boxes represent the tubulin binding domain (TBD). The sun and cylinder represent *Rluc* and YFP, respectively. (B-C) Plasmids coding for Stau1-*Rluc* were co-transfected in HEK293T cells with various amounts of Stau1-YFP, PABP or YFP expressors. Expression of Stau1-*Rluc* and Stau1-YFP proteins is shown in (B) using western blotting with anti-Stau1 antibody. β -actin antibody was used as a loading control. (C) BRET saturation curves were generated to provide evidence of

specific interactions between the proteins in live cells. BRET ratios were defined as described in Materials and Methods and plotted as a function of the excited YFP activity to total *Renilla* luciferase activity ratio. **(Left)** Comparison of BRET saturation curves when Stau1-Rluc was co-expressed with Stau1-YFP, PABP-YFP or YFP. Error bars correspond to standard deviation. **(Right)** GABAB receptor 2-Rluc and GABAB receptor 1-YFP, two proteins known to form strong functional dimer, were used as a BRET positive control. **(D)** HEK293T cells were co-transfected with Stau1-Rluc and either Stau1-YFP or PABP-YFP expressors as described in B. Cells were lysed and cell extracts were incubated in the presence or absence of RNase A at room temperature for 15 minutes. BRET ratios at saturation in the presence (+) or absence (-) of RNase are shown. $n = 3$. Error bars correspond to standard deviation.

Figure 3. Stau1 RNA-binding activity is involved in complex formation. **(A)** Schematic representation of Stau1 mutants. Symbols are described in the legend of figure 2. Stau1KK, mutations K153A and K154A in dsRBD3. Stau14K mutant, mutations K153A and K154A in dsRBD3 and K256A and K257A in dsRBD4. **(B)** Plasmids coding for Stau1-YFP and Stau1-YFP mutants were transfected in HEK293T cells and protein expression was monitored by Western blotting using anti-GFP antibody. Anti- β -actin antibody was used as loading control. Numbers above each lane correspond to those in (A). **(C)** HEK293T cells were co-transfected with Stau1-Rluc and either Stau1-YFP, Stau1 Δ 3-YFP, Stau14K-YFP or Stau1KK-YFP expressors. BRET ratios of wild type Stau1 and RNA-binding defective Stau1 mutants were calculated as in figure 2 and relative BRET ratios were generated with the Stau1-Rluc/Stau1-YFP BRET ratio arbitrarily fixed to 1. $n = 3$. Error bars correspond to standard deviation.

Figure 4. Characterization of Stau1 protein-protein interaction in live cells. **(A)** Schematic representation of Stau1 and mutants. Symbols are described in the legend of figure 2. **(B)** Plasmids coding for Stau1-YFP and Stau1-YFP mutants were transfected in HEK293T cells and protein expression was monitored by Western blotting using anti-GFP antibody. Anti- β -actin antibody was used as loading control. Numbers above each lane

correspond to those in (A). **(C-E)** Cells were co-transfected with different combinations of Stau1 and Stau1 deletion mutants fused to either *Rluc* or YFP as indicated. BRET ratios were calculated as in figure 2 and relative BRET ratios were generated with the Stau1-*Rluc*/Stau1-YFP BRET ratio arbitrarily fixed to 1. $n = 3$. Error bars correspond to standard deviation. **(F)** Yeast cells were co-transformed with a plasmid coding for Stau1-B42 and different expressors of Stau1 domains fused to LexA, as indicated. Cells were screened for growth on selective medium and β -galactosidase expression. Stau1-B42 interacts (+) with Stau1 dsRBD2 and dsRBD5 but not (-) with dsRBD3, dsRBD4 or TBD fused to LexA in a two-hybrid assay.

Figure 5. Sub-cellular distribution of Stau1 and Stau1 mutants. COS-7 cells were transfected with plasmids coding for Stau1-YFP or Stau1-YFP mutants as indicated. YFP expression was observed 24 h later by fluorescence microscopy. Both differential interference contrast microscopy (DIC) and the YFP constructs are shown.

Figure 6. Stau1 forms oligomers in live cells. **(A)** Schematic representation of the BRET-PCA assay. Stau1 was fused to either the N-terminal (*Rluc*_{F1}) or the C-terminal (*Rluc*_{F2}) of *Rluc*. Formation of Stau1 dimers will bring together the two *Rluc* halves through protein complementation (PCA) and reconstitute a functional luciferase. This enzyme will transfer energy and generate BRET signal if Stau1-YFP is also present in close proximity suggesting formation of oligomers. **(B)** HEK293T cells were co-transfected with constant amounts of plasmids coding for Stau1-*Rluc*_{F1} and Stau1-*Rluc*_{F2} and increasing amounts of plasmids coding for either Stau1-YFP, PABP-YFP or YFP. The saturation curves provide evidence of specific interactions between at least three Stau1 proteins in live cells. BRET ratios were calculated as in figure 2. Error bars correspond to standard deviation. **(C)** Plasmids were transfected as in B. Cells were lysed and cell extracts were treated with RNase (+ RNase) or the buffer alone (- RNase) before BRET calculation.

Figure 7. Stau1 oligomers contain RNA in live cells. **(A)** Schematic representation of the PCA-BRET assay for protein-RNA interaction. As described in figure 7, Stau1-*Rluc*_{F1} and

Stau1-*Rluc*_{F2} were transfected in HEK293T cells to reconstitute a functional luciferase as a consequence of Stau1-Stau1 interaction. Then cells were treated with SYTO 14, a fluorescent dye that stains RNA. Energy transfer can occur from the reconstituted *Rluc* to SYTO 14 if in close proximity and generate BRET signal. **(B)** BRET ratios at saturation are indicated for each association between monomeric (*Rluc*, Stau1-*Rluc*) or split (Stau1-*Rluc*_{F1} + Stau1-*Rluc*_{F2}, PKA reg-*Rluc*_{F1} + PKA cat-*Rluc*_{F2}) *Rluc* and SYTO 14. Error bars are standard deviation. **P < 0.01 (ANOVA and post test Dunnett). **(C)** Transfected HEK293T cells were lysed and cell extracts were treated with RNase (+ RNase) or the buffer alone (Ctl) before adding SYTO 14 for the BRET assay. ***P < 0.001 (T test). Note that the BRET values are higher in cell extracts than those in live cells probably due to the better availability of SYTO 14 in cell extracts.

Figure 8. Stau1 form RNA-containing high-order complexes. **(A)** HEK293T cells were mock transfected or co-transfected with Stau1-HA₃ expressor and either YFP, Stau1-YFP or Stau1-FLAG expressors as indicated. Proteins in the cell extracts were separated by SDS-PAGE (left panels - input) or successively immunoprecipitated using first, anti-FLAG antibody (middle panels – 1st IP:FLAG) and second, anti-GFP antibody (right panels – 2nd IP:GFP). Proteins were analysed by western blotting using anti-Stau1, anti-FLAG, anti-YFP and anti-HA antibodies, as indicated. Anti-β-actin antibody was used as a loading control. Molecular weight markers are indicated on the left side of the gels. **(B)** Immunoprecipitates obtained after the second round of immunoprecipitation were treated with Trizol reagent to isolate putative Stau1-bound RNAs. RNAs were qRT-PCR amplified using oligonucleotide primers for ARF1 and PAICS mRNAs, two known Stau1-bound mRNAs (Kim et al. 2005; Furic et al. 2008). This figure is representative of 3 independent experiments.

Figure 1

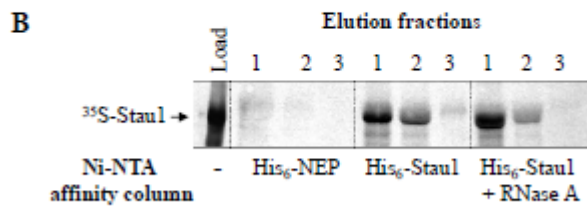
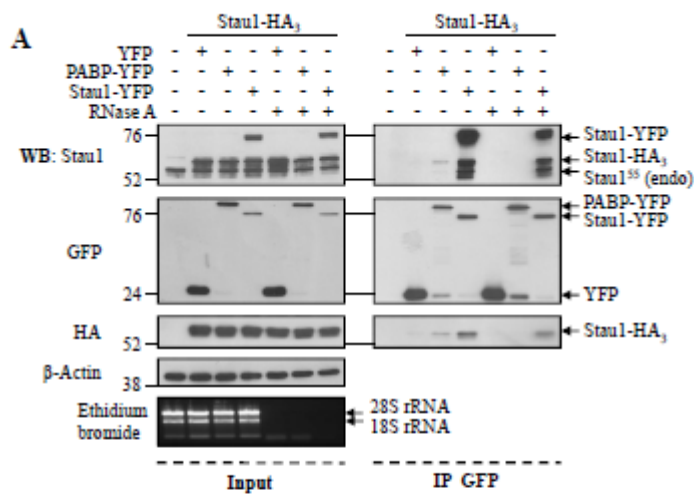


Figure 2

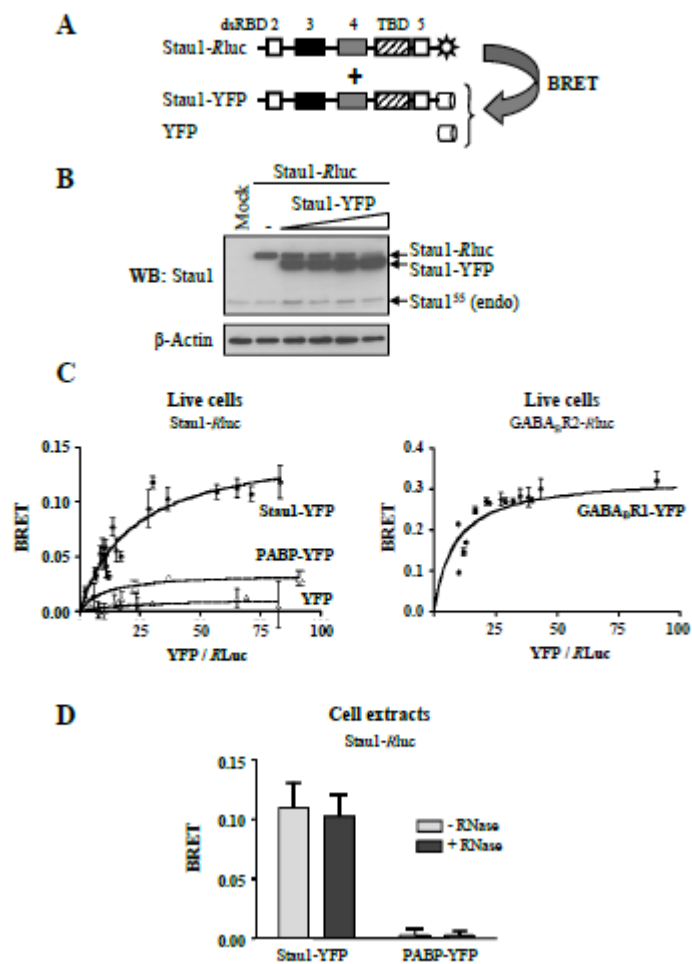


Figure 3

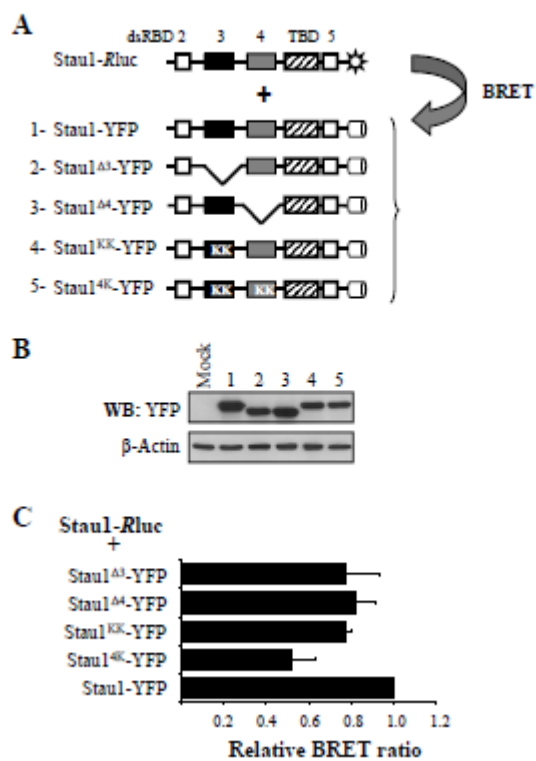


Figure 4

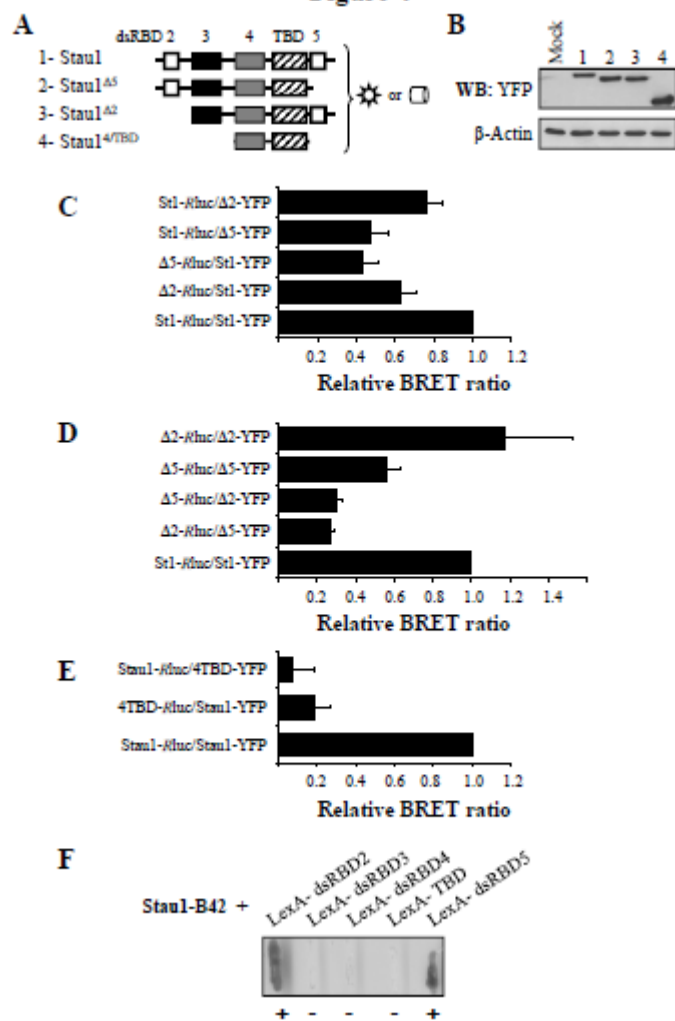


Figure 5

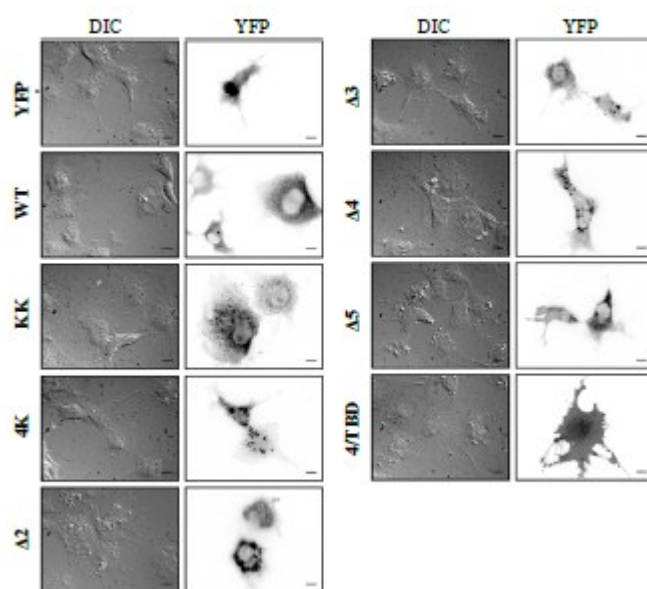


Figure 6

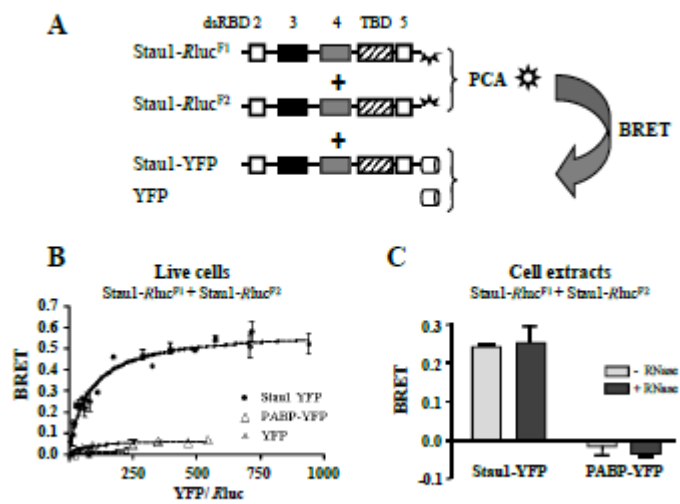


Figure 7

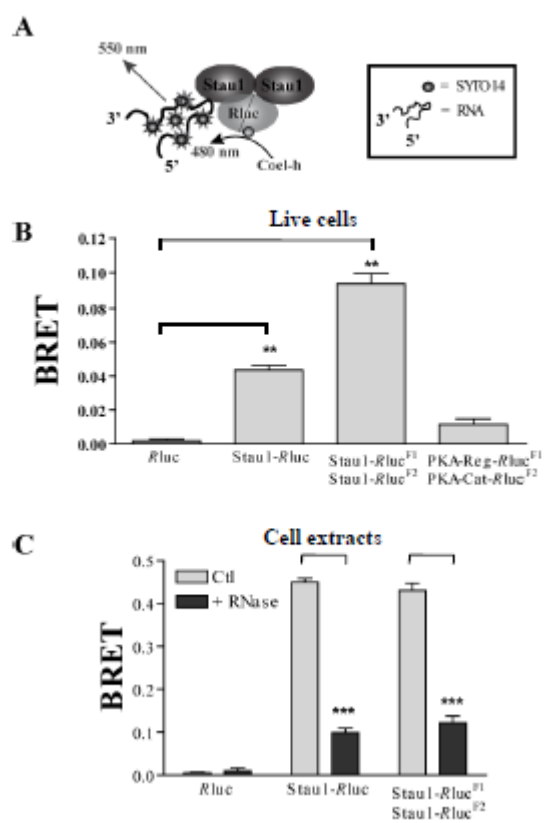
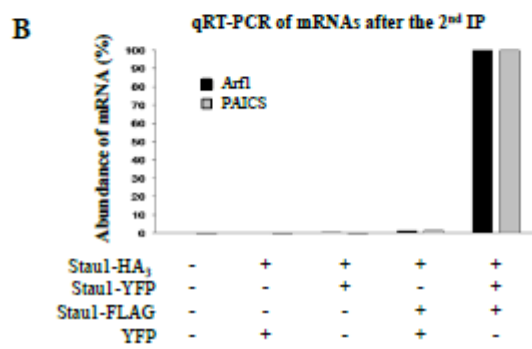
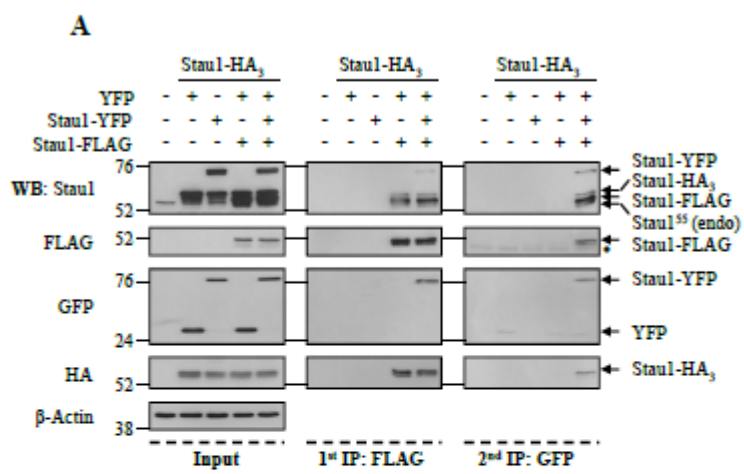


Figure 8



Annexe III: Tableaux relatifs à la discussion

Tableau I: Liste des ARNm associés à Stau1 en prométaphase. Des cellules HEK293T transfectées avec un exprèsseur de Stau1-FLAG ou avec le vecteur vide (contrôle) ont été synchronisées en prométaphase à l'aide d'un blocage au nocodazole. Les cellules ont ensuite été lysées et les extraits cellulaires générés ont été utilisés pour procéder à des immunoprécipitations à l'aide d'un anti-FLAG. Les ARNm co-précipités ont identifiés par la technique d'hybridation à des micropuces d'ADN Illumina. Le tableau inclut les ARNm qui sont enrichis au moins trois fois dans l'immunoprécipitation de Stau1-FLAG par rapport à l'immunoprécipitation contrôle. n=3

Gene symbol	Gene title
ABCA2	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2 (ABCA2), transcript variant 2, mRNA.
ABCC4	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4 (ABCC4), mRNA.
ABCC4	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4 (ABCC4), mRNA.
ABLIM1	actin binding LIM protein 1 (ABLIM1), transcript variant 2, mRNA.
ACADVL	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, nuclear gene encoding mitochondrial protein, variant 1, mRNA.
ACBD7	PREDICTED: acyl-Coenzyme A binding domain containing 7 (ACBD7), mRNA.
ACHE	acetylcholinesterase (YT blood group) (ACHE), transcript variant E4-E5, mRNA.
ADAM10	ADAM metallopeptidase domain 10 (ADAM10), mRNA.
ADAM19	ADAM metallopeptidase domain 19 (meltrin beta) (ADAM19), mRNA.
ADAMTS4	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 4 (ADAMTS4), mRNA.
ADCY1	adenylate cyclase 1 (brain) (ADCY1), mRNA.
ADCY1	adenylate cyclase 1 (brain) (ADCY1), mRNA.
ADORA1	adenosine A1 receptor (ADORA1), mRNA.
AFF1	AF4/FMR2 family, member 1 (AFF1), mRNA.
AFF4	AF4/FMR2 family, member 4 (AFF4), mRNA.
AFMID	arylformamidase (AFMID), mRNA.
AGAP3	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 3 (AGAP3), transcript variant 2, mRNA.
AGL	amylo-1, 6-glucosidase, 4-alpha-glucanotransférase (AGL), transcript variant 1, mRNA.
AGMAT	agmatine ureohydrolase (agmatinase) (AGMAT), mRNA.
AGPAT2	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2 (lysophosphatidic acid acyltransferase, beta) variant 1
AGPAT3	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3 (AGPAT3), transcript variant 2, mRNA.
AGPAT4	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 4 (lysophosphatidic acid acyltransferase, delta), mRNA.
AHCTF1	AT hook containing transcription factor 1 (AHCTF1), mRNA.
AKIRIN1	akirin 1 (AKIRIN1), mRNA.
AKT2	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2 (AKT2), mRNA.
ALDH6A1	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1, nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
ALG1L	asparagine-linked glycosylation 1-like (ALG1L), mRNA.
AMD1	adenosylmethionine decarboxylase 1 (AMD1), transcript variant 1, mRNA.
AMMECR1	Alport syndrome, mental retardation, midface hypoplasia and elliptocytosis chromosomal region gene 1
AMT	aminomethyltransferase (AMT), mRNA.
ANKFY1	ankyrin repeat and FYVE domain containing 1 (ANKFY1), transcript variant 2, mRNA.
ANKRD16	ankyrin repeat domain 16 (ANKRD16), transcript variant 1, mRNA.
ANKRD43	ankyrin repeat domain 43 (ANKRD43), mRNA.
ANKRD9	ankyrin repeat domain 9 (ANKRD9), mRNA.
ANKRD9	ankyrin repeat domain 9 (ANKRD9), mRNA.

AP1G1	adaptor-related protein complex 1, gamma 1 subunit (AP1G1), transcript variant 2, mRNA.
AP3S2	adaptor-related protein complex 3, sigma 2 subunit (AP3S2), mRNA.
AP4M1	adaptor-related protein complex 4, mu 1 subunit (AP4M1), mRNA.
APAF1	apoptotic peptidase activating factor 1 (APAF1), transcript variant 1, mRNA.
APBA2BP	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 2 binding protein, variant 2, mRNA.
APLN	apelin (APLN), mRNA.
APOBEC3C	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3C (APOBEC3C), mRNA.
APOBEC3F	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3F, transcript variant 1, mRNA.
APOBEC3F	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3F, transcript variant 2, mRNA.
APPBP2	amyloid beta precursor protein (cytoplasmic tail) binding protein 2 (APPBP2), mRNA.
AQP11	aquaporin 11 (AQP11), mRNA.
ARF1	ADP-ribosylation factor 1 (ARF1), transcript variant 2, mRNA.
ARHGEF12	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 12 (ARHGEF12), mRNA.
ARID2	AT rich interactive domain 2 (ARID, RFX-like) (ARID2), mRNA.
ARID2	AT rich interactive domain 2 (ARID, RFX-like) (ARID2), mRNA.
ARL10	ADP-ribosylation factor-like 10 (ARL10), mRNA.
ARL3	ADP-ribosylation factor-like 3 (ARL3), mRNA.
ARL5A	ADP-ribosylation factor-like 5A (ARL5A), transcript variant 1, mRNA.
ARMCX3	armadillo repeat containing, X-linked 3 (ARMCX3), transcript variant 2, mRNA.
ARMCX3	armadillo repeat containing, X-linked 3 (ARMCX3), transcript variant 2, mRNA.
AS3MT	arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase (AS3MT), mRNA.
ASB6	ankyrin repeat and SOCS box-containing 6 (ASB6), transcript variant 1, mRNA.
ASCC3	activating signal cointegrator 1 complex subunit 3 (ASCC3), transcript variant 1, mRNA.
ASCC3	activating signal cointegrator 1 complex subunit 3 (ASCC3), transcript variant 1, mRNA.
ATAD3B	ATPase family, AAA domain containing 3B (ATAD3B), mRNA.
ATG10	ATG10 autophagy related 10 homolog (S. cerevisiae) (ATG10), mRNA.
ATG4A	ATG4 autophagy related 4 homolog A (S. cerevisiae) (ATG4A), transcript variant 2, mRNA.
ATM	ataxia telangiectasia mutated (ATM), transcript variant 1, mRNA.
ATM	ataxia telangiectasia mutated (ATM), transcript variant 1, mRNA.
ATMIN	ATM interactor (ATMIN), mRNA.
ATP11B	ATPase, class VI, type 11B (ATP11B), mRNA.
ATP11C	ATPase, class VI, type 11C (ATP11C), transcript variant 1, mRNA.
ATP11C	ATPase, class VI, type 11C (ATP11C), transcript variant 2, mRNA.
ATP2A2	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2 (ATP2A2), transcript variant 1, mRNA.
ATP2A2	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2 (ATP2A2), transcript variant 2, mRNA.
ATP5S	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit s (factor B), variant 1, mRNA.
ATP5S	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit s (factor B), variant 2, mRNA.
ATPBD1B	ATP binding domain 1 family, member B (ATPBD1B), mRNA.
ATRN	attractin (ATRN), transcript variant 1, mRNA.
ATRN	attractin (ATRN), transcript variant 2, mRNA.
B3GAT1	beta-1,3-glucuronyltransferase 1 (glucuronosyltransferase P) (B3GAT1), transcript variant 1, mRNA.
B3GAT1	beta-1,3-glucuronyltransferase 1 (glucuronosyltransferase P) (B3GAT1), transcript variant 1, mRNA.
BACE1	beta-site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1), transcript variant b, mRNA.
BAD	BCL2-antagonist of cell death (BAD), transcript variant 1, mRNA.
BAD	BCL2-antagonist of cell death (BAD), transcript variant 2, mRNA.
BAI2	brain-specific angiogenesis inhibitor 2 (BAI2), mRNA.
BAK1	BCL2-antagonist/killer 1 (BAK1), mRNA.
BAZ1A	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1A (BAZ1A), transcript variant 1, mRNA.
BCAT1	branched chain aminotransferase 1, cytosolic (BCAT1), mRNA.
BHLHB3	basic helix-loop-helix domain containing, class B, 3 (BHLHB3), mRNA.
BMPR2	bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase) (BMPR2), mRNA.
BPNT1	3'(2'), 5'-bisphosphate nucleotidase 1 (BPNT1), mRNA.
BRD4	bromodomain containing 4 (BRD4), transcript variant short, mRNA.

BRI3BP	PREDICTED: BRI3 binding protein (BRI3BP), mRNA.
BTBD1	BTB (POZ) domain containing 1 (BTBD1), transcript variant 1, mRNA.
BTBD7	BTB (POZ) domain containing 7 (BTBD7), transcript variant 1, mRNA.
BTG2	BTG family, member 2 (BTG2), mRNA.
BVES	blood vessel epicardial substance (BVES), transcript variant 5, mRNA.
C10ORF104	chromosome 10 open reading frame 104 (C10orf104), mRNA.
C13ORF1	chromosome 13 open reading frame 1 (C13orf1), mRNA.
C14ORF126	chromosome 14 open reading frame 126 (C14orf126), mRNA.
C15ORF44	chromosome 15 open reading frame 44 (C15orf44), transcript variant 2, mRNA.
C15ORF52	chromosome 15 open reading frame 52 (C15orf52), mRNA.
C16ORF58	chromosome 16 open reading frame 58 (C16orf58), mRNA.
C16ORF63	chromosome 16 open reading frame 63 (C16orf63), mRNA.
C17ORF56	chromosome 17 open reading frame 56 (C17orf56), mRNA.
C17ORF69	chromosome 17 open reading frame 69 (C17orf69), mRNA.
C17ORF75	chromosome 17 open reading frame 75 (C17orf75), mRNA.
C18ORF26	chromosome 18 open reading frame 26 (C18orf26), mRNA.
C18ORF45	chromosome 18 open reading frame 45 (C18orf45), mRNA.
C19ORF25	chromosome 19 open reading frame 25 (C19orf25), mRNA.
C19ORF42	chromosome 19 open reading frame 42 (C19orf42), mRNA.
C19ORF48	chromosome 19 open reading frame 48 (C19orf48), mRNA.
C19ORF48	chromosome 19 open reading frame 48 (C19orf48), mRNA.
C19ORF48	Homo sapiens chromosome 19 open reading frame 48 (C19orf48), mRNA.
C19ORF55	Homo sapiens chromosome 19 open reading frame 55 (C19orf55), mRNA.
C19ORF6	Homo sapiens chromosome 19 open reading frame 6 (C19orf6), transcript variant 1, mRNA.
C19ORF73	Homo sapiens chromosome 19 open reading frame 73 (C19orf73), mRNA.
C1ORF151	Homo sapiens chromosome 1 open reading frame 151 (C1orf151), mRNA.
C1ORF21	Homo sapiens chromosome 1 open reading frame 21 (C1orf21), mRNA.
C1ORF216	Homo sapiens chromosome 1 open reading frame 216 (C1orf216), mRNA.
C1ORF229	Homo sapiens chromosome 1 open reading frame 229 (C1orf229), mRNA.
C1ORF24	Homo sapiens chromosome 1 open reading frame 24 (C1orf24), transcript variant 2, mRNA.
C1ORF55	Homo sapiens chromosome 1 open reading frame 55 (C1orf55), mRNA.
C1ORF69	Homo sapiens chromosome 1 open reading frame 69 (C1orf69), mRNA.
C1ORF89	Homo sapiens chromosome 1 open reading frame 89 (C1orf89), mRNA.
C20ORF117	Homo sapiens chromosome 20 open reading frame 117 (C20orf117), transcript variant 2, mRNA.
C20ORF194	Homo sapiens chromosome 20 open reading frame 194 (C20orf194), mRNA.
C21ORF58	Homo sapiens chromosome 21 open reading frame 58 (C21orf58), transcript variant 2, mRNA.
C21ORF58	Homo sapiens chromosome 21 open reading frame 58 (C21orf58), transcript variant 2, mRNA.
C22ORF25	Homo sapiens chromosome 22 open reading frame 25 (C22orf25), mRNA.
C2ORF27A	Homo sapiens chromosome 2 open reading frame 27A (C2orf27A), mRNA.
C3ORF18	Homo sapiens chromosome 3 open reading frame 18 (C3orf18), mRNA.
C3ORF23	Homo sapiens chromosome 3 open reading frame 23 (C3orf23), transcript variant 3, mRNA.
C3ORF42	Homo sapiens chromosome 3 open reading frame 42 (C3orf42), mRNA.
C3ORF59	Homo sapiens chromosome 3 open reading frame 59 (C3orf59), mRNA.
C4ORF29	Homo sapiens chromosome 4 open reading frame 29 (C4orf29), mRNA.
C5ORF24	Homo sapiens chromosome 5 open reading frame 24 (C5orf24), mRNA.
C5ORF4	Homo sapiens chromosome 5 open reading frame 4 (C5orf4), mRNA.
C6ORF120	Homo sapiens chromosome 6 open reading frame 120 (C6orf120), mRNA.
C6ORF57	Homo sapiens chromosome 6 open reading frame 57 (C6orf57), mRNA.
C8ORF13	Homo sapiens chromosome 8 open reading frame 13 (C8orf13), mRNA.
C8ORF30A	Homo sapiens chromosome 8 open reading frame 30A (C8orf30A), mRNA.
C8ORF44	Homo sapiens chromosome 8 open reading frame 44 (C8orf44), mRNA.
C8ORF55	Homo sapiens chromosome 8 open reading frame 55 (C8orf55), mRNA.
C9ORF167	Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 167 (C9orf167), mRNA.

C9ORF45	PREDICTED: Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 45 (C9orf45), misc RNA.
C9ORF5	Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 5 (C9orf5), mRNA.
CA5B	carbonic anhydrase VB, mitochondrial (CA5B), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
CACNG6	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 6 (CACNG6), transcript variant 3, mRNA.
CAPN5	Homo sapiens calpain 5 (CAPN5), mRNA.
CAPS	Homo sapiens calcyphosine (CAPS), transcript variant 2, mRNA.
CAV1	Homo sapiens caveolin 1, caveolae protein, 22kDa (CAV1), mRNA.
CBFA2T2	core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2; translocated to, 2 (CBFA2T2), variant 2, mRNA.
CBL	Homo sapiens Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence (CBL), mRNA.
CBL	Homo sapiens Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence (CBL), mRNA.
CBLN3	Homo sapiens cerebellin 3 precursor (CBLN3), mRNA.
CBX7	Homo sapiens chromobox homolog 7 (CBX7), mRNA.
CC2D1B	Homo sapiens coiled-coil and C2 domain containing 1B (CC2D1B), mRNA.
CC2D1B	Homo sapiens coiled-coil and C2 domain containing 1B (CC2D1B), mRNA.
CCBL2	Homo sapiens cysteine conjugate-beta lyase 2 (CCBL2), transcript variant 3, mRNA.
CCNY	Homo sapiens cyclin Y (CCNY), transcript variant 1, mRNA.
CD151	Homo sapiens CD151 molecule (Raph blood group) (CD151), transcript variant 4, mRNA.
CD276	Homo sapiens CD276 molecule (CD276), transcript variant 2, mRNA.
CD59	Homo sapiens CD59 molecule, complement regulatory protein (CD59), transcript variant 2, mRNA.
CDC14B	CDC14 cell division cycle 14 homolog B (S. cerevisiae) (CDC14B), transcript variant 2, mRNA.
CDC14B	CDC14 cell division cycle 14 homolog B (S. cerevisiae) (CDC14B), transcript variant 3, mRNA.
CDK6	Homo sapiens cyclin-dependent kinase 6 (CDK6), mRNA.
CDKL3	Homo sapiens cyclin-dependent kinase-like 3 (CDKL3), mRNA.
CECR6	Homo sapiens cat eye syndrome chromosome region, candidate 6 (CECR6), mRNA.
CFLAR	Homo sapiens CASP8 and FADD-like apoptosis regulator (CFLAR), mRNA.
CHFR	Homo sapiens checkpoint with forkhead and ring finger domains (CHFR), mRNA.
CHMP6	Homo sapiens chromatin modifying protein 6 (CHMP6), mRNA.
CHST6	Homo sapiens carbohydrate (N-acetylglucosamine 6-O) sulfotransferase 6 (CHST6), mRNA.
CLASP2	Homo sapiens cytoplasmic linker associated protein 2 (CLASP2), mRNA.
CLDN15	Homo sapiens claudin 15 (CLDN15), mRNA.
CLDN15	Homo sapiens claudin 15 (CLDN15), transcript variant 2, mRNA.
CLN8	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 8 (epilepsy, progressive with mental retardation) (CLN8), mRNA.
CLN8	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 8 (epilepsy, progressive with mental retardation) (CLN8), mRNA.
CLPB	Homo sapiens ClpB caseinolytic peptidase B homolog (E. coli) (CLPB), mRNA.
CMTM6	Homo sapiens KLF-like MARVEL transmembrane domain containing 6 (CMTM6), mRNA.
CNN2	Homo sapiens calponin 2 (CNN2), transcript variant 1, mRNA.
CNPY4	Homo sapiens canopy 4 homolog (zebrafish) (CNPY4), mRNA.
CNPY4	Homo sapiens canopy 4 homolog (zebrafish) (CNPY4), mRNA.
COBRA1	Homo sapiens cofactor of BRCA1 (COBRA1), mRNA.
COG3	Homo sapiens component of oligomeric golgi complex 3 (COG3), mRNA.
COG5	Homo sapiens component of oligomeric golgi complex 5 (COG5), transcript variant 1, mRNA.
COL18A1	Homo sapiens collagen, type XVIII, alpha 1 (COL18A1), transcript variant 2, mRNA.
COL4A1	Homo sapiens collagen, type IV, alpha 1 (COL4A1), mRNA.
COL4A5	Homo sapiens collagen, type IV, alpha 5 (COL4A5), transcript variant 1, mRNA.
COL4A5	Homo sapiens collagen, type IV, alpha 5 (COL4A5), transcript variant 2, mRNA.
COL4A6	Homo sapiens collagen, type IV, alpha 6 (COL4A6), transcript variant A, mRNA.
COMMD5	Homo sapiens COMM domain containing 5 (COMMD5), transcript variant 1, mRNA.
CPEB2	cytoplasmic polyadenylation element binding protein 2 (CPEB2), transcript variant A, mRNA.
CPNE1	Homo sapiens copine 1 (CPNE1), transcript variant 3, mRNA.
CR2	complement component (3d/Epstein Barr virus) receptor 2 (CR2), transcript variant 2, mRNA.
CRIPAK	Homo sapiens cysteine-rich PAK1 inhibitor (CRIPAK), mRNA.
CRLS1	Homo sapiens cardiolipin synthase 1 (CRLS1), mRNA.
CRYBA2	Homo sapiens crystallin, beta A2 (CRYBA2), transcript variant 1, mRNA.

CRYZL1	Homo sapiens crystallin, zeta (quinone reductase)-like 1 (CRYZL1), transcript variant 2, mRNA.
CRYZL1	Homo sapiens crystallin, zeta (quinone reductase)-like 1 (CRYZL1), transcript variant 3, mRNA.
CSAD	Homo sapiens cysteine sulfinic acid decarboxylase (CSAD), mRNA.
CSNK1A1	Homo sapiens casein kinase 1, alpha 1 (CSNK1A1), transcript variant 1, mRNA.
CSNK1G1	Homo sapiens casein kinase 1, gamma 1 (CSNK1G1), mRNA.
CSNK1G3	Homo sapiens casein kinase 1, gamma 3 (CSNK1G3), transcript variant 2, mRNA.
CTBP1	Homo sapiens C-terminal binding protein 1 (CTBP1), transcript variant 2, mRNA.
CTDSP1	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, peptide A) small phosphatase 1, variant 1 mRNA
CTNNB1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa (CTNNB1), transcript variant 2, mRNA.
CTNNB1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa (CTNNB1), transcript variant 2, mRNA.
CTSB	Homo sapiens cathepsin B (CTSB), transcript variant 1, mRNA.
CTSB	Homo sapiens cathepsin B (CTSB), transcript variant 2, mRNA.
CTTN	Homo sapiens cortactin (CTTN), transcript variant 1, mRNA.
CUX2	Homo sapiens cut-like homeobox 2 (CUX2), mRNA.
CWF19L1	Homo sapiens CWF19-like 1, cell cycle control (<i>S. pombe</i>) (CWF19L1), mRNA.
CXCR4	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4), transcript variant 2, mRNA.
CXORF40B	Homo sapiens chromosome X open reading frame 40B (CXorf40B), mRNA.
CXORF56	Homo sapiens chromosome X open reading frame 56 (CXorf56), mRNA.
CYBRD1	Homo sapiens cytochrome b reductase 1 (CYBRD1), mRNA.
CYCS	Homo sapiens cytochrome c, somatic (CYCS), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
CYP1B1	Homo sapiens cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1 (CYP1B1), mRNA.
DBT	dihydroliipoamide branched chain transacylase E2, nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
DCAF16	Homo sapiens DDB1 and CUL4 associated factor 16 (DCAF16), mRNA.
DCBLD2	Homo sapiens discoidin, CUB and LCCL domain containing 2 (DCBLD2), mRNA.
DCBLD2	Homo sapiens discoidin, CUB and LCCL domain containing 2 (DCBLD2), mRNA.
DCP2	Homo sapiens DCP2 decapping enzyme homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (DCP2), mRNA.
DCUN1D3	DCN1, defective in culin neddylation 1, domain containing 3 (<i>S. cerevisiae</i>) (DCUN1D3), mRNA.
DDB1	PREDICTED: Homo sapiens damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa (DDB1), mRNA.
DDB1	PREDICTED: damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa, transcript variant 4 (DDB1), mRNA.
DDX46	Homo sapiens DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 46 (DDX46), mRNA.
DENND2C	Homo sapiens DENN/MADD domain containing 2C (DENND2C), mRNA.
DENR	Homo sapiens density-regulated protein (DENR), mRNA.
DENR	Homo sapiens density-regulated protein (DENR), mRNA.
DFFA	Homo sapiens DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide (DFFA), transcript variant 1, mRNA.
DFFA	Homo sapiens DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide (DFFA), transcript variant 2, mRNA.
DHFR	Homo sapiens dihydrofolate reductase (DHFR), mRNA.
DHFRL1	Homo sapiens dihydrofolate reductase-like 1 (DHFRL1), mRNA.
DHFRL1	Homo sapiens dihydrofolate reductase-like 1 (DHFRL1), mRNA.
DHX9	Homo sapiens DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9 (DHX9), mRNA.
DICER1	Homo sapiens Dicer1, Dcr-1 homolog (<i>Drosophila</i>) (DICER1), transcript variant 2, mRNA.
DIDO1	Homo sapiens death inducer-obliterator 1 (DIDO1), transcript variant 3, mRNA.
DIP2B	Homo sapiens DIP2 disco-interacting protein 2 homolog B (<i>Drosophila</i>) (DIP2B), mRNA.
DIP2B	Homo sapiens DIP2 disco-interacting protein 2 homolog B (<i>Drosophila</i>) (DIP2B), mRNA.
DIP2C	Homo sapiens DIP2 disco-interacting protein 2 homolog C (<i>Drosophila</i>) (DIP2C), mRNA.
DJ222E13.2	Homo sapiens similar to CGI-96 (dJ222E13.2) on chromosome 22.
DKFZP434N035	Homo sapiens hypothetical protein DKFZp434N035 (DKFZp434N035), mRNA.
DKFZP761E198	Homo sapiens DKFZp761E198 protein (DKFZp761E198), mRNA.
DLST	dihydroliipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo-glutarate complex) (DLST), mRNA.
DNAJC22	Homo sapiens DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 22 (DNAJC22), mRNA.
DNAJC24	Homo sapiens DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 24 (DNAJC24), mRNA.
DNAJC27	Homo sapiens DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 27 (DNAJC27), mRNA.
DNAJC30	Homo sapiens DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 30 (DNAJC30), mRNA.
DNAJC5	Homo sapiens DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 5 (DNAJC5), mRNA.

DPH2	Homo sapiens DPH2 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (DPH2), transcript variant 1, mRNA.
DPH2	Homo sapiens DPH2 homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (DPH2), transcript variant 1, mRNA.
DPM2	dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 2, regulatory subunit, transcript variant 2, mRNA.
DSCR6	Homo sapiens Down syndrome critical region gene 6 (DSCR6), mRNA.
DUSP18	Homo sapiens dual specificity phosphatase 18 (DUSP18), mRNA.
DUSP7	Homo sapiens dual specificity phosphatase 7 (DUSP7), mRNA.
DUSP9	Homo sapiens dual specificity phosphatase 9 (DUSP9), mRNA.
DVL1	Homo sapiens dishevelled, dsh homolog 1 (<i>Drosophila</i>) (DVL1), transcript variant 2, mRNA.
DVL1	Homo sapiens dishevelled, dsh homolog 1 (<i>Drosophila</i>) (DVL1), transcript variant 3, mRNA.
DYRK2	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2 (DYRK2), transcript variant 1, mRNA.
ECHDC1	Homo sapiens enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 1 (ECHDC1), mRNA.
ECOP	Homo sapiens EGFR-coamplified and overexpressed protein (ECOP), mRNA.
EFCAB3	Homo sapiens EF-hand calcium binding domain 3 (EFCAB3), mRNA.
EFNB2	Homo sapiens ephrin-B2 (EFNB2), mRNA.
EGFL7	Homo sapiens EGF-like-domain, multiple 7 (EGFL7), transcript variant 1, mRNA.
EGFL7	Homo sapiens EGF-like-domain, multiple 7 (EGFL7), transcript variant 2, mRNA.
EHHADH	enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase (EHHADH), mRNA.
EIF4E3	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 4E family member 3 (EIF4E3), mRNA.
ELFN2	extracellular leucine-rich repeat and fibronectin type III domain containing 2 (ELFN2), mRNA.
ELOVL6	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3-like, yeast), mRNA
EMID1	Homo sapiens EMI domain containing 1 (EMID1), mRNA.
EN2	Homo sapiens engrailed homeobox 2 (EN2), mRNA.
ENAH	Homo sapiens enabled homolog (<i>Drosophila</i>) (ENAH), transcript variant 2, mRNA.
ENAH	Homo sapiens enabled homolog (<i>Drosophila</i>) (ENAH), transcript variant 2, mRNA.
ENDOD1	Homo sapiens endonuclease domain containing 1 (ENDOD1), mRNA.
ENTPD6	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 6 (putative function) (ENTPD6), mRNA.
EPB41	erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked) (EPB41), transcript variant 1, mRNA
EPB41L5	Homo sapiens erythrocyte membrane protein band 4.1 like 5 (EPB41L5), mRNA.
EPB41L5	Homo sapiens erythrocyte membrane protein band 4.1 like 5 (EPB41L5), mRNA.
ESPNL	Homo sapiens espin-like (ESPNL), mRNA.
EYA4	Homo sapiens eyes absent homolog 4 (<i>Drosophila</i>) (EYA4), transcript variant 1, mRNA.
EYA4	Homo sapiens eyes absent homolog 4 (<i>Drosophila</i>) (EYA4), transcript variant 1, mRNA.
F11R	Homo sapiens F11 receptor (F11R), transcript variant 1, mRNA.
F11R	Homo sapiens F11 receptor (F11R), transcript variant 5, mRNA.
F8A3	Homo sapiens coagulation factor VIII-associated (intronic transcript) 3 (F8A3), mRNA.
FADS2	Homo sapiens fatty acid desaturase 2 (FADS2), mRNA.
FAM102A	Homo sapiens family with sequence similarity 102, member A (FAM102A), transcript variant 1, mRNA.
FAM108A1	Homo sapiens family with sequence similarity 108, member A1 (FAM108A1), mRNA.
FAM108A3	Homo sapiens family with sequence similarity 108, member A3 (FAM108A3), mRNA.
FAM108A3	Homo sapiens family with sequence similarity 108, member A3 (FAM108A3), mRNA.
FAM108B1	Homo sapiens family with sequence similarity 108, member B1 (FAM108B1), transcript variant 1, mRNA.
FAM108B1	Homo sapiens family with sequence similarity 108, member B1 (FAM108B1), transcript variant 1, mRNA.
FAM116A	PREDICTED: Homo sapiens family with sequence similarity 116, member A (FAM116A), mRNA.
FAM126B	Homo sapiens family with sequence similarity 126, member B (FAM126B), mRNA.
FAM129B	Homo sapiens family with sequence similarity 129, member B (FAM129B), transcript variant 1, mRNA.
FAM134C	Homo sapiens family with sequence similarity 134, member C (FAM134C), mRNA.
FAM168A	Homo sapiens family with sequence similarity 168, member A (FAM168A), mRNA.
FAM181B	Homo sapiens family with sequence similarity 181, member B (FAM181B), mRNA.
FAM18B	Homo sapiens family with sequence similarity 18, member B (FAM18B), mRNA.
FAM18B2	Homo sapiens family with sequence similarity 18, member B2 (FAM18B2), mRNA.
FAM190B	Homo sapiens family with sequence similarity 190, member B (FAM190B), mRNA.

FAM195B	Homo sapiens family with sequence similarity 195, member B (FAM195B), transcript variant 1, mRNA.
FAM20B	Homo sapiens family with sequence similarity 20, member B (FAM20B), mRNA.
FAM53B	Homo sapiens family with sequence similarity 53, member B (FAM53B), mRNA.
FAM55C	Homo sapiens family with sequence similarity 55, member C (FAM55C), mRNA.
FAM7A1	PREDICTED: family with sequence similarity 7, member A1, transcript variant 4 (FAM7A1), mRNA.
FAM89A	Homo sapiens family with sequence similarity 89, member A (FAM89A), mRNA.
FANCC	Homo sapiens Fanconi anemia, complementation group C (FANCC), mRNA.
FANCD2	Homo sapiens Fanconi anemia, complementation group D2 (FANCD2), transcript variant 1, mRNA.
FBN2	Homo sapiens fibrillin 2 (FBN2), mRNA.
FBXL3	Homo sapiens F-box and leucine-rich repeat protein 3 (FBXL3), mRNA.
FBXO7	Homo sapiens F-box protein 7 (FBXO7), transcript variant 1, mRNA.
FBXO9	Homo sapiens F-box protein 9 (FBXO9), transcript variant 2, mRNA.
FCF1	Homo sapiens FCF1 small subunit (SSU) processome component homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (FCF1), mRNA
FCF1	Homo sapiens FCF1 small subunit (SSU) processome component homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (FCF1), mRNA.
FERMT1	Homo sapiens fermitin family homolog 1 (<i>Drosophila</i>) (FERMT1), mRNA.
FHDC1	Homo sapiens FH2 domain containing 1 (FHDC1), mRNA.
FKBP2	Homo sapiens FK506 binding protein 2, 13kDa (FKBP2), transcript variant 1, mRNA.
FLCN	Homo sapiens folliculin (FLCN), transcript variant 1, mRNA.
FLJ10213	Homo sapiens hypothetical protein FLJ10213 (FLJ10213), mRNA.
FLJ12688	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein FLJ12688 (FLJ12688), mRNA.
FLJ20464	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein FLJ20464 (FLJ20464), mRNA.
FLJ20718	Homo sapiens hypothetical protein FLJ20718 (FLJ20718), transcript variant 1, mRNA.
FLJ22222	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein FLJ22222 (FLJ22222), mRNA.
FLJ25006	Homo sapiens uncharacterized serine/threonine-protein kinase SgK494 (FLJ25006), mRNA.
FLJ38717	Homo sapiens FLJ38717 protein (FLJ38717), mRNA.
FLJ39632	PREDICTED: Homo sapiens misc_RNA (FLJ39632), miscRNA.
FLJ40448	Homo sapiens hypothetical protein FLJ40448 (FLJ40448), mRNA.
FLJ41603	Homo sapiens FLJ41603 protein (FLJ41603), mRNA.
FLJ45032	Homo sapiens similar to F40B5.2b (FLJ45032), mRNA.
FMNL2	Homo sapiens formin-like 2 (FMNL2), mRNA.
FN3KRP	Homo sapiens fructosamine-3-kinase-related protein (FN3KRP), mRNA.
FNDC3A	Homo sapiens fibronectin type III domain containing 3A (FNDC3A), transcript variant 1, mRNA.
FNDC3A	Homo sapiens fibronectin type III domain containing 3A (FNDC3A), transcript variant 1, mRNA.
FOXD1	Homo sapiens forkhead box D1 (FOXD1), mRNA.
FOXD4L1	Homo sapiens forkhead box D4-like 1 (FOXD4L1), mRNA.
FO XK1	Homo sapiens forkhead box K1 (FO XK1), mRNA.
FOXO3	Homo sapiens forkhead box O3 (FOXO3), transcript variant 2, mRNA.
FOXRED2	Homo sapiens FAD-dependent oxidoreductase domain containing 2 (FOXRED2), mRNA.
FOXRED2	Homo sapiens FAD-dependent oxidoreductase domain containing 2 (FOXRED2), mRNA.
FRAS1	Homo sapiens Fraser syndrome 1 (FRAS1), mRNA.
FRAT1	Homo sapiens frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas (FRAT1), mRNA.
FTSJ2	Homo sapiens FtsJ homolog 2 (<i>E. coli</i>) (FTSJ2), transcript variant 2, mRNA.
FUBP3	far upstream element (FUSE) binding protein 3 (FUBP3), mRNA. XM_945904 XM_945906 XM_945907
FUCA2	Homo sapiens fucosidase, alpha-L- 2, plasma (FUCA2), mRNA.
FZD3	Homo sapiens frizzled homolog 3 (<i>Drosophila</i>) (FZD3), mRNA.
FZD7	Homo sapiens frizzled homolog 7 (<i>Drosophila</i>) (FZD7), mRNA.
FZD8	Homo sapiens frizzled homolog 8 (<i>Drosophila</i>) (FZD8), mRNA.
G3BP2	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 2 (G3BP2), transcript variant 3, mRNA.
GABPA	Homo sapiens GA binding protein transcription factor, alpha subunit 60kDa (GABPA), mRNA.
GABPB2	Homo sapiens GA binding protein transcription factor, beta subunit 2 (GABPB2), mRNA.
GAR1	Homo sapiens GAR1 ribonucleoprotein homolog (yeast) (GAR1), transcript variant 1, mRNA.
GAS1	Homo sapiens growth arrest-specific 1 (GAS1), mRNA.
GAS2L3	Homo sapiens growth arrest-specific 2 like 3 (GAS2L3), mRNA.

GATC	Homo sapiens glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase, subunit C homolog (bacterial) (GATC), mRNA.
GDAP1L1	Homo sapiens ganglioside-induced differentiation-associated protein 1-like 1 (GDAP1L1), mRNA.
GDPD1	Homo sapiens glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 1 (GDPD1), mRNA.
GDPD1	Homo sapiens glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 1 (GDPD1), mRNA.
GGA1	golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 1, transcript variant 1, mRNA.
GGA1	golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 1, transcript variant 3, mRNA.
GINS4	Homo sapiens GINS complex subunit 4 (Sld5 homolog) (GINS4), mRNA.
GIPC1	Homo sapiens GIPC PDZ domain containing family, member 1 (GIPC1), transcript variant 1, mRNA.
GJC2	Homo sapiens gap junction protein, gamma 2, 47kDa (GJC2), mRNA.
GK5	Homo sapiens glycerol kinase 5 (putative) (GK5), mRNA.
GLCCI1	Homo sapiens glucocorticoid induced transcript 1 (GLCCI1), mRNA.
GLIPR2	Homo sapiens GLI pathogenesis-related 2 (GLIPR2), mRNA.
GM2A	Homo sapiens GM2 ganglioside activator (GM2A), mRNA.
GMPPA	Homo sapiens GDP-mannose pyrophosphorylase A (GMPPA), transcript variant 2, mRNA.
GNB4	Homo sapiens guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 4 (GNB4), mRNA.
GNE	Homo sapiens glucosamine (UDP-N-acetyl)-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE), mRNA.
GNG12	Homo sapiens guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 12 (GNG12), mRNA.
GNL3L	Homo sapiens guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)-like (GNL3L), mRNA.
GNPDA2	Homo sapiens glucosamine-6-phosphate deaminase 2 (GNPDA2), mRNA.
GNPNAT1	Homo sapiens glucosamine-phosphate N-acetyltransferase 1 (GNPNAT1), mRNA.
GOLGA3	Homo sapiens golgi autoantigen, golgin subfamily a, 3 (GOLGA3), mRNA.
GOSR1	Homo sapiens golgi SNAP receptor complex member 1 (GOSR1), transcript variant 1, mRNA.
GOSR2	Homo sapiens golgi SNAP receptor complex member 2 (GOSR2), transcript variant C, mRNA.
GPAM	Homo sapiens glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial (GPAM), mRNA.
GPAM	glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial, nuclear gene encoding mitochondrial protein
GPER	Homo sapiens G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER), transcript variant 3, mRNA.
GPER	Homo sapiens G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER), transcript variant 3, mRNA.
GPLD1	glycosylphosphatidylinositol specific phospholipase D1 (GPLD1), transcript variant 1, mRNA.
GPR124	Homo sapiens G protein-coupled receptor 124 (GPR124), mRNA.
GPR161	Homo sapiens G protein-coupled receptor 161 (GPR161), transcript variant 1, mRNA.
GPR176	Homo sapiens G protein-coupled receptor 176 (GPR176), mRNA.
GPR89B	Homo sapiens G protein-coupled receptor 89B (GPR89B), mRNA.
GRM2	Homo sapiens glutamate receptor, metabotropic 2 (GRM2), mRNA.
GSDM1	Homo sapiens gasdermin 1 (GSDM1), mRNA.
GXYLT2	Homo sapiens glucoside xylosyltransferase 2 (GXYLT2), mRNA.
H2AFV	Homo sapiens H2A histone family, member V (H2AFV), transcript variant 2, mRNA.
H6PD	Homo sapiens hexose-6-phosphate dehydrogenase (glucose 1-dehydrogenase) (H6PD), mRNA.
HAGHL	Homo sapiens hydroxyacylglutathione hydrolase-like (HAGHL), transcript variant 1, mRNA.
HAS3	Homo sapiens hyaluronan synthase 3 (HAS3), transcript variant 1, mRNA.
HBP1	Homo sapiens HMG-box transcription factor 1 (HBP1), mRNA.
HDAC11	Homo sapiens histone deacetylase 11 (HDAC11), mRNA.
HEATR3	Homo sapiens HEAT repeat containing 3 (HEATR3), mRNA.
HEATR5B	Homo sapiens HEAT repeat containing 5B (HEATR5B), mRNA.
HECTD2	Homo sapiens HECT domain containing 2 (HECTD2), transcript variant 1, mRNA.
HECTD2	Homo sapiens HECT domain containing 2 (HECTD2), transcript variant 2, mRNA.
HES6	Homo sapiens hairy and enhancer of split 6 (Drosophila) (HES6), mRNA.
HES7	Homo sapiens hairy and enhancer of split 7 (Drosophila) (HES7), mRNA.
HIATL1	Homo sapiens hippocampus abundant transcript-like 1 (HIATL1), mRNA.
HIATL1	Homo sapiens hippocampus abundant transcript-like 1 (HIATL1), mRNA.
HIATL1	Homo sapiens hippocampus abundant transcript-like 1 (HIATL1), mRNA.
HIATL1	Homo sapiens hippocampus abundant transcript-like 1 (HIATL1), mRNA.
HIC2	Homo sapiens hypermethylated in cancer 2 (HIC2), mRNA.
HIP1	Homo sapiens huntingtin interacting protein 1 (HIP1), mRNA.

HLA-DOA	Homo sapiens major histocompatibility complex, class II, DO alpha (HLA-DOA), mRNA.
HLTF	Homo sapiens helicase-like transcription factor (HLTF), transcript variant 1, mRNA.
HM13	Homo sapiens histocompatibility (minor) 13 (HM13), transcript variant 4, mRNA.
HM13	Homo sapiens histocompatibility (minor) 13 (HM13), transcript variant 4, mRNA.
HOMER1	Homo sapiens homer homolog 1 (Drosophila) (HOMER1), mRNA.
HOOK3	Homo sapiens hook homolog 3 (Drosophila) (HOOK3), mRNA.
HOXA10	Homo sapiens homeobox A10 (HOXA10), transcript variant 1, mRNA.
HOXA13	Homo sapiens homeobox A13 (HOXA13), mRNA.
HOXA9	Homo sapiens homeobox A9 (HOXA9), mRNA.
HPCAL4	Homo sapiens hippocalcin like 4 (HPCAL4), mRNA.
HPSE	Homo sapiens heparanase (HPSE), mRNA.
HS.105791	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:6186815, partial cds
HS.112050	AGENCOURT_14250468 NIH_MGC_187 cDNA clone IMAGE:30404961 5, mRNA sequence
HS.120187	BX096254 NCI_CGAP_Kid11 Homo sapiens cDNA clone IMAGp998H065280, mRNA sequence
HS.120300	HESC4_33_E11.g1_A037 NIH_MGC_262 cDNA clone IMAGE:7474271 5, mRNA sequence
HS.121070	DKFZp686M05188_r1 686 (synonym: hlcc3) cDNA clone DKFZp686M05188 5, mRNA sequence
HS.123119	Homo sapiens cDNA FLJ37828 fis, clone BRSSN2006575
HS.127009	UI-H-EZ1-bbe-e-05-0-UI.s1 NCI_CGAP_Ch2 cDNA clone UI-H-EZ1-bbe-e-05-0-UI 3, mRNA sequence
HS.127310	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434C1613 (from clone DKFZp434C1613)
HS.128387	BX104420 Soares_fetal_heart_NbHH19W cDNA clone IMAGp998J19785, mRNA sequence
HS.128708	602505656F1 NIH_MGC_77 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4619364 5, mRNA sequence
HS.12876	602659965F1 NCI_CGAP_Skn3 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4802969 5, mRNA sequence
HS.130916	K-EST0218892 L18POOL1n1 Homo sapiens cDNA clone L18POOL1n1-30-G08 5, mRNA sequence AGENCOURT_8120841 Lupski_dorsal_root_ganglion cDNA clone IMAGE:6178568 5, mRNA sequence
HS.133324	
HS.134828	BX104823 NCI_CGAP_Brn23 Homo sapiens cDNA clone IMAGp998P125193, mRNA sequence
HS.137274	602572519F1 NIH_MGC_77 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4700548 5, mRNA sequence UI-E-EJ0-ahj-a-16-0-UI.r2 UI-E-EJ0 Homo sapiens cDNA clone UI-E-EJ0-ahj-a-16-0-UI 5, mRNA sequence
HS.14032	
HS.145049	full-length cDNA clone CS0DF005YI08 of Fetal brain of Homo sapiens (human)
HS.158691	Homo sapiens cDNA FLJ30460 fis, clone BRACE2009434
HS.163264	EST391198 MAGE resequenes, MAGP Homo sapiens cDNA, mRNA sequence
HS.168162	AGENCOURT_13779116 NIH_MGC_184 cDNA clone IMAGE:30349586 5, mRNA sequence
HS.171171	FNPARC07 FNP Homo sapiens cDNA, mRNA sequence
HS.19339	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5263177
HS.193557	Homo sapiens cDNA FLJ32401 fis, clone SKMUS2000339
HS.194225	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686E0389 (from clone DKFZp686E0389)
HS.20255	AV652851 GLC Homo sapiens cDNA clone GLCDEG06 3, mRNA sequence
HS.208066	BX092137 NCI_CGAP_Kid11 cDNA clone IMAGp998B145920 ; IMAGE:2383789, mRNA sequence
HS.211930	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical LOC389801 (LOC389801), mRNA
HS.22566	CR738732 NCI_CGAP_Kid11 cDNA clone IMAGp971E16101 ; IMAGE:2384145 5, mRNA sequence
HS.24119	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5297467
HS.258266	K-EST0220612 L18POOL1n1 Homo sapiens cDNA clone L18POOL1n1-33-F12 5, mRNA sequence
HS.259679	EST368678 MAGE resequenes, MAGD Homo sapiens cDNA, mRNA sequence
HS.276860	601441142F1 NIH_MGC_72 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3915971 5, mRNA sequence
HS.283402	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5272804
HS.28694	full-length cDNA clone CS0DB005YN14 of Neuroblastoma Cot 10-normalized of Homo sapiens (human)
HS.292604	UI-CF-FN0-afw-d-15-0-UI.s1 UI-CF-FN0 cDNA clone UI-CF-FN0-afw-d-15-0-UI 3, mRNA sequence
HS.296031	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5262734
HS.298873	BX090227 NCI_CGAP_GC6 cDNA clone IMAGp998D135719 ; IMAGE:2307804, mRNA sequence
HS.31007	EST176292 Colon carcinoma (Caco-2) cell line II Homo sapiens cDNA 5 end, mRNA sequence
HS.336593	UI-E-CII-agf-n-11-0-UI.r1 UI-E-CII cDNA clone UI-E-CII-agf-n-11-0-UI 5, mRNA sequence
HS.348514	Homo sapiens, clone IMAGE:4052238, mRNA, partial cds
HS.349207	UI-E-CQ0-adt-f-10-0-UI.r1 UI-E-CQ0 cDNA clone UI-E-CQ0-adt-f-10-0-UI 5, mRNA sequence

HS.352549 AGENCOURT_14360380 NIH_MGC_186 cDNA clone IMAGE:30406177 5, mRNA sequence
 HS.374278 Homo sapiens cDNA FLJ38388 fis, clone FEBRA2004485
 HS.388347 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686J0156 (from clone DKFZp686J0156)
 AGENCOURT_10167693 NIH_MGC_71 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:6527009 5, mRNA
 sequence
 HS.389313 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686F1546 (from clone DKFZp686F1546)
 HS.397465 Homo sapiens cDNA FLJ33738 fis, clone BRAWH2018527
 HS.400256 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686I23208 (from clone DKFZp686I23208)
 HS.40289 AGENCOURT_7782569 NIH_MGC_67 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:6137082 5, mRNA
 sequence
 HS.42612 BX105911 NCI_CGAP_Brn25 Homo sapiens cDNA clone IMAGp998P096136, mRNA sequence
 HS.426229 AGENCOURT_6796899 NIH_MGC_85 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5787825 5, mRNA
 sequence
 HS.437111 BX393727 NEUROBLASTOMA COT 25-NORMALIZED cDNA clone CS0DC001YP02 5-PRIME,
 HS.440088 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686D22106 (from clone DKFZp686D22106)
 HS.445036 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5259414
 HS.452702 Human mRNA for KIAA0280 gene, partial cds
 HS.475334 AGENCOURT_13565173 NIH_MGC_184 cDNA clone IMAGE:30326407 5, mRNA sequence
 HS.48729 UI-E-EJ0-afe-f-12-0-UI.r1 UI-E-EJ0 Homo sapiens cDNA clone UI-E-EJ0-afe-f-12-0-UI 5, mRNA
 sequence
 HS.504876 Homo sapiens cDNA FLJ33772 fis, clone BRSSN2000175
 HS.505676 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5299888
 HS.513000 Homo sapiens cDNA FLJ33739 fis, clone BRAWH2018601
 HS.525171 UI-E-CL1-afe-e-04-0-UI.r1 UI-E-CL1 cDNA clone UI-E-CL1-afe-e-04-0-UI 5, mRNA sequence
 HS.528873 Homo sapiens cDNA FLJ31093 fis, clone IMR321000161
 HS.529514 Homo sapiens cDNA FLJ38251 fis, clone FCBBF3000184
 HS.529631 AGENCOURT_14063909 NIH_MGC_181 cDNA clone IMAGE:30375764 5, mRNA sequence
 HS.530359 Homo sapiens cDNA FLJ37595 fis, clone BRCCO2007864
 HS.531457 BX105743 NCI_CGAP_GC6 Homo sapiens cDNA clone IMAGp998H135716, mRNA sequence
 HS.536451 PT2.1_10_D05.r tumor2 Homo sapiens cDNA 3, mRNA sequence
 HS.536748 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4797120
 HS.537004 BP398340 Homo sapiens pancreatic islet Homo sapiens cDNA clone htp-29-07 3, mRNA sequence
 HS.537779 xn24e12.x1 NCI_CGAP_Kid11 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2694670 3, mRNA sequence
 HS.538100 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564C152 (from clone DKFZp564C152)
 HS.538962 oc56e05.s1 NCI_CGAP_GCB1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1353728 3, mRNA sequence
 HS.543138 zh47e08.r1 Soares_fetal_liver_spleen_INFLS_S1 cDNA clone IMAGE:415238 5, mRNA sequence
 HS.547277 Homo sapiens full length insert cDNA clone YZ84G08
 HS.547601 Homo sapiens mRNA full length insert cDNA clone EUROIMAGE 1090207
 HS.547712 UI-H-BI0p-abm-h-10-0-UI.s1 NCI_CGAP_Sub2 cDNA clone IMAGE:2712450 3, mRNA sequence
 HS.547985 Homo sapiens cDNA: FLJ22140 fis, clone HEP20977
 HS.549989 BX115738 Soares melanocyte 2NbHM Homo sapiens cDNA clone IMAGp998D07589, mRNA sequence
 HS.551137 Homo sapiens cDNA FLJ34826 fis, clone NT2NE2008803
 HS.551138 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp761E1721 (from clone DKFZp761E1721)
 HS.551538 DA645971 MAMMA1 Homo sapiens cDNA clone MAMMA1000318 5, mRNA sequence
 HS.553217 601441665F1 NIH_MGC_65 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3845681 5, mRNA sequence
 HS.553273 Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434J194 (from clone DKFZp434J194)
 HS.554965 DA371742 BRTHA2 Homo sapiens cDNA clone BRTHA2001741 5, mRNA sequence
 HS.555252 BY797688 Homo sapiens eye Homo sapiens cDNA clone HEmEye2032D8_062.ab1 5, mRNA sequence
 HS.560896 UI-H-ED0-axn-h-17-0-UI.s1 NCI_CGAP_ED0 cDNA clone UI-H-ED0-axn-h-17-0-UI 3, mRNA
 sequence
 HS.561357 BX116720 Soares_testis_NHT Homo sapiens cDNA clone IMAGp998F241782, mRNA sequence
 HS.561493 in34h07.y1 Human Fetal Pancreas 1B cDNA 5 similar to TR:Q14754 Q14754 ORFII. ; mRNA sequence
 HS.561603 AL528570 NEUROBLASTOMA COT 50-NORMALIZED cDNA clone CS0DD001YM19 5-PRIME,
 HS.561735 mRNA
 HS.562488 DA298023 BRHIP2 Homo sapiens cDNA clone BRHIP2011612 5, mRNA sequence

HS.562504	PM3-DT0037-231299-001-e06 DT0037 Homo sapiens cDNA, mRNA sequence
HS.567392	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp686J12188 (from clone DKFZp686J12188)
HS.567759	Homo sapiens cDNA FLJ38153 fis, clone DFNES1000083 AGENCOURT_8210259 NIH_MGC_112 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:6258046 5, mRNA sequence
HS.568777	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp762M127 (from clone DKFZp762M127)
HS.568928	BX111122 Soares breast 3NbHBst Homo sapiens cDNA clone IMAGp998P06340, mRNA sequence
HS.568945	EST374756 MAGE resequences, MAGG Homo sapiens cDNA, mRNA sequence
HS.570330	Homo sapiens primary neuroblastoma cDNA, clone:Nbla10111, full insert sequence
HS.570988	AGENCOURT_7889662 NIH_MGC_71 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:6175704 5, mRNA sequence
HS.571081	ij84d11.x6 Human insulinoma Homo sapiens cDNA clone IMAGE:5778116 3, mRNA sequence
HS.571404	EST22604 human nasopharynx Homo sapiens cDNA, mRNA sequence
HS.5724	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp779O0231 (from clone DKFZp779O0231)
HS.573047	BX110921 Soares fetal liver spleen 1NFLS cDNA clone IMAGp998C02389, mRNA sequence
HS.574667	UI-E-EJ0-aho-m-08-0-UI.s1 UI-E-EJ0 cDNA clone UI-E-EJ0-aho-m-08-0-UI 3, mRNA sequence
HS.576698	UI-H-BII-acd-c-07-0-UI.s1 NCI_CGAP_Sub3 cDNA clone IMAGE:2713741 3, mRNA sequence
HS.577098	AU253866 human unfavorable neuroblastoma cDNA, cDNA clone Nbla11379 3, mRNA sequence
HS.579239	DA430127 COLON2 Homo sapiens cDNA clone COLON2006333 5, mRNA sequence
HS.582113	SM011178 Brain 3 EST Homo sapiens cDNA clone ID_11178 3', mRNA sequence
HS.58423	AGENCOURT_15332205 Human Anterior Horn cDNA clone IMAGE:30516367 5, mRNA sequence
HS.86045	Homo sapiens cDNA FLJ43676 fis, clone SYNOV4009129
HS.91389	Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3079901
HS.98960	601437678F1 NIH_MGC_72 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3922723 5, mRNA sequence
ICK	Homo sapiens intestinal cell (MAK-like) kinase (ICK), transcript variant 2, mRNA.
ICMT	Homo sapiens isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (ICMT), mRNA.
IFNAR1	Homo sapiens interferon (alpha, beta and omega) receptor 1 (IFNAR1), mRNA.
IFNAR2	Homo sapiens interferon (alpha, beta and omega) receptor 2 (IFNAR2), transcript variant 1, mRNA.
IGDCC4	Homo sapiens immunoglobulin superfamily, DCC subclass, member 4 (IGDCC4), mRNA.
IGFBP7	Homo sapiens insulin-like growth factor binding protein 7 (IGFBP7), mRNA.
IGSF3	Homo sapiens immunoglobulin superfamily, member 3 (IGSF3), transcript variant 1, mRNA.
INPP5B	inositol polyphosphate-5-phosphatase, 75kDa, nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
INTS2	Homo sapiens integrator complex subunit 2 (INTS2), mRNA.
IPP	Homo sapiens intracisternal A particle-promoted polypeptide (IPP), mRNA.
IRF2BP2	Homo sapiens interferon regulatory factor 2 binding protein 2 (IRF2BP2), transcript variant 1, mRNA.
IRF2BP2	Homo sapiens interferon regulatory factor 2 binding protein 2 (IRF2BP2), transcript variant 1, mRNA.
IRS2	Homo sapiens insulin receptor substrate 2 (IRS2), mRNA.
ITGAV	integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51) (ITGAV), mRNA.
ITGB1	integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta peptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12), variant 1D
ITPRIPL2	Homo sapiens inositol 1,4,5-triphosphate receptor interacting protein-like 2 (ITPRIPL2), mRNA.
JRK	Homo sapiens jerky homolog (mouse) (JRK), transcript variant 1, mRNA.
JUB	Homo sapiens jub, ajuba homolog (Xenopus laevis) (JUB), transcript variant 1, mRNA.
KATNAL1	Homo sapiens katanin p60 subunit A-like 1 (KATNAL1), transcript variant 2, mRNA.
KBTBD11	Homo sapiens kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 11 (KBTBD11), mRNA.
KCNIP3	Homo sapiens Kv channel interacting protein 3, calsenilin (KCNIP3), transcript variant 1, mRNA.
KCNJ11	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11 (KCNJ11), transcript variant 1, mRNA.
KCNJ4	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 4 (KCNJ4), transcript variant 1, mRNA.
KCNK12	Homo sapiens potassium channel, subfamily K, member 12 (KCNK12), mRNA.
KCTD3	Homo sapiens potassium channel tetramerisation domain containing 3 (KCTD3), mRNA.
KENAE	Homo sapiens Kenae (KENAE), mRNA.
KIAA0251	PREDICTED: Homo sapiens KIAA0251 protein (KIAA0251), mRNA.
KIAA0319L	Homo sapiens KIAA0319-like (KIAA0319L), transcript variant 2, mRNA.
KIAA0831	Homo sapiens KIAA0831 (KIAA0831), mRNA.
KIAA0889	Homo sapiens KIAA0889 protein (KIAA0889), mRNA.

KIAA0895	Homo sapiens KIAA0895 (KIAA0895), transcript variant 2, mRNA.
KIAA1160	PREDICTED: Homo sapiens KIAA1160 protein (KIAA1160), mRNA.
KIAA1271	Homo sapiens KIAA1271 protein (KIAA1271), mRNA.
KIAA1618	Homo sapiens KIAA1618 (KIAA1618), mRNA.
KIAA1644	PREDICTED: Homo sapiens KIAA1644 protein (KIAA1644), mRNA.
KIAA1715	Homo sapiens KIAA1715 (KIAA1715), mRNA.
KIAA1967	Homo sapiens KIAA1967 (KIAA1967), transcript variant 2, mRNA.
KISS1R	Homo sapiens KISS1 receptor (KISS1R), mRNA.
KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog (KIT), transcript variant 2, mRNA.
KLC3	Homo sapiens kinesin light chain 3 (KLC3), mRNA.
KLC3	Homo sapiens kinesin light chain 3 (KLC3), transcript variant 1, mRNA.
KLHDC10	Homo sapiens kelch domain containing 10 (KLHDC10), mRNA.
KLHDC10	Homo sapiens kelch domain containing 10 (KLHDC10), mRNA.
KLHDC3	Homo sapiens kelch domain containing 3 (KLHDC3), mRNA.
KLHDC5	Homo sapiens kelch domain containing 5 (KLHDC5), mRNA.
KLHL23	Homo sapiens kelch-like 23 (Drosophila) (KLHL23), mRNA.
KLHL24	Homo sapiens kelch-like 24 (Drosophila) (KLHL24), mRNA.
KLHL7	Homo sapiens kelch-like 7 (Drosophila) (KLHL7), transcript variant 2, mRNA.
L2HGDH	Homo sapiens L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase (L2HGDH), mRNA.
LACTB	lactamase, beta (LACTB), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1, mRNA.
LAMA1	Homo sapiens laminin, alpha 1 (LAMA1), mRNA.
LAMB1	Homo sapiens laminin, beta 1 (LAMB1), mRNA.
LAT1-3TM	PREDICTED: Homo sapiens SLC7A5 pseudogene, transcript variant 2 (LAT1-3TM), misc RNA.
LBH	Homo sapiens limb bud and heart development homolog (mouse) (LBH), mRNA.
LBR	Homo sapiens lamin B receptor (LBR), transcript variant 1, mRNA.
LCN15	Homo sapiens lipocalin 15 (LCN15), mRNA.
LEMD2	Homo sapiens LEM domain containing 2 (LEMD2), mRNA.
LETMD1	Homo sapiens LETM1 domain containing 1 (LETMD1), transcript variant 1, mRNA.
LIN54	Homo sapiens lin-54 homolog (C. elegans) (LIN54), mRNA.
LINS1	Homo sapiens lines homolog 1 (Drosophila) (LINS1), transcript variant 2, mRNA.
LINS1	Homo sapiens lines homolog 1 (Drosophila) (LINS1), transcript variant 3, mRNA.
LMO4	Homo sapiens LIM domain only 4 (LMO4), mRNA.
LOC100008589	Homo sapiens 28S ribosomal RNA (LOC100008589), non-coding RNA.
LOC128322	PREDICTED: Homo sapiens similar to nuclear transport factor 2 (LOC128322), mRNA.
LOC148137	Homo sapiens hypothetical protein BC017947 (LOC148137), mRNA.
LOC149448	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC149448 (LOC149448), mRNA.
LOC158301	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC158301 (LOC158301), mRNA.
LOC158318	Homo sapiens similar to hypothetical protein MGC42630 (LOC158318), mRNA.
LOC196752	Homo sapiens similar to CG32542-PA (LOC196752), mRNA.
LOC200030	Homo sapiens neuroblastoma breakpoint family, member 11-like (LOC200030), mRNA.
LOC283932	Homo sapiens hypothetical protein LOC283932 (LOC283932), mRNA.
LOC284701	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC284701, transcript variant 10 (LOC284701), mRNA.
LOC285033	Homo sapiens hypothetical protein LOC285033 (LOC285033), mRNA.
LOC285359	Homo sapiens phosphatase-like 3 pseudogene (LOC285359) on chromosome 3.
LOC285908	Homo sapiens hypothetical protein LOC285908 (LOC285908), mRNA.
LOC286208	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC286208, transcript variant 1 (LOC286208), mRNA.
LOC338758	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC338758 (LOC338758), mRNA.
LOC374395	Homo sapiens similar to RIKEN cDNA 1810059G22 (LOC374395), mRNA.
LOC375295	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical gene supported by BC013438 (LOC375295), mRNA.
LOC392713	PREDICTED: similar to PMS1 protein homolog 2 (DNA mismatch repair protein PMS2), mRNA.
LOC399753	PREDICTED: hypothetical gene supported by AK093334; AL833330; BC020871; BC032492, variant 1
LOC400174	PREDICTED: Homo sapiens similar to single stranded DNA binding protein 3 (LOC400174), mRNA.

LOC400464	Homo sapiens similar to FLJ43276 protein (LOC400464), mRNA.
LOC400464	Homo sapiens similar to FLJ43276 protein (LOC400464), mRNA.
LOC401002	PREDICTED: similar to single-stranded DNA-binding protein isoform a (LOC401002), mRNA.
LOC401357	Homo sapiens hypothetical LOC401357 (LOC401357), mRNA.
LOC401720	Homo sapiens similar to fidgetin (LOC401720), mRNA.
LOC402377	PREDICTED: similar to UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,3-galactosyltransferase, polypeptide 4, mRNA. PREDICTED: similar to CCR4-NOT transcription complex, subunit 6-like isoform 1 (LOC440280), mRNA.
LOC440280	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC440345, transcript variant 3 (LOC440345), mRNA.
LOC440345	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC440345, transcript variant 5 (LOC440345), mRNA.
LOC440345	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC440345, transcript variant 6 (LOC440345), mRNA.
LOC440345	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical LOC441124 (LOC441124), mRNA.
LOC441124	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical LOC441124 (LOC441124), mRNA.
LOC441208	Homo sapiens hypothetical gene supported by AK094370 (LOC441208), non-coding RNA.
LOC441268	Homo sapiens hypothetical gene supported by BC044942 (LOC441268), mRNA.
LOC441528	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC441528 (LOC441528), mRNA.
LOC442582	Homo sapiens STAG3-like (LOC442582), mRNA.
LOC504188	Homo sapiens hypothetical LOC504188 (LOC504188), mRNA.
LOC641522	Homo sapiens ADP-ribosylation factor-like protein (LOC641522), mRNA.
LOC641693	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC641693 (LOC641693), mRNA.
LOC641978	PREDICTED: Homo sapiens similar to general transcription factor II I (LOC641978), mRNA.
LOC642333	PREDICTED: Homo sapiens similar to M-phase phosphoprotein, mpp8 (LOC642333), mRNA.
LOC642773	PREDICTED: similar to Myc-associated zinc finger protein (Purine-binding transcription factor), mRNA.
LOC642921	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical LOC642921 (LOC642921), mRNA.
LOC642980	Homo sapiens hypothetical protein LOC642980 (LOC642980), mRNA.
LOC643300	PREDICTED: similar to 60 kDa heat shock protein, mitochondrial precursor, mRNA.
LOC643313	PREDICTED: similar to hypothetical protein LOC284701, transcript variant 1 (LOC643313), mRNA.
LOC643446	PREDICTED: similar to ribonucleic acid binding protein S1, transcript variant 2 (LOC643446), mRNA.
LOC643505	PREDICTED: Homo sapiens similar to large subunit ribosomal protein L36a (LOC643505), mRNA.
LOC643556	PREDICTED: similar to Aurora kinase A-interacting protein, transcript variant 4 (LOC643556), mRNA.
LOC643935	PREDICTED: Homo sapiens similar to nuclear pore membrane protein 121 (LOC643935), mRNA.
LOC644019	PREDICTED: similar to COBW domain containing 3, transcript variant 17 (LOC644019), mRNA.
LOC644144	PREDICTED: Homo sapiens similar to ADP-ribosylation factor 7 (LOC644144), mRNA.
LOC644297	PREDICTED: Homo sapiens similar to Apoptosis-related protein 2 (APR-2) (LOC644297), mRNA.
LOC644390	PREDICTED: similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L isoform a (LOC644390), mRNA.
LOC645100	PREDICTED: Homo sapiens hCG1820764 (LOC645100), mRNA.
LOC645869	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC645869 (LOC645869), mRNA.
LOC646144	PREDICTED: Homo sapiens similar to tousled-like kinase 2, transcript variant 2 (LOC646144), mRNA.
LOC646509	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC646509 (LOC646509), mRNA.
LOC646567	PREDICTED: Homo sapiens similar to HSPC307 (LOC646567), mRNA.
LOC646817	PREDICTED: similar to Protein SET (Phosphatase 2A inhibitor I2PP2A), mRNA.
LOC647596	PREDICTED: Homo sapiens similar to scotin (LOC647596), mRNA.
LOC648196	PREDICTED: Homo sapiens similar to BANP homolog (LOC648196), mRNA. PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC648906, transcript variant 2 (LOC648907), mRNA.
LOC648907	mRNA.
LOC649095	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical LOC649095 (LOC649095), mRNA.
LOC650111	PREDICTED: similar to SHC transforming protein 1 (SH2 domain protein C1), mRNA.
LOC651285	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC651285 (LOC651285), mRNA.
LOC652416	PREDICTED: Homo sapiens similar to beta-1,4-mannosyltransferase (LOC652416), mRNA.
LOC652615	PREDICTED: similar to Anaphase promoting complex subunit 1, mRNA.
LOC652685	PREDICTED: similar to PMS1 protein homolog 2 (DNA mismatch repair protein PMS2), mRNA.
LOC652903	PREDICTED: Homo sapiens similar to Bcl-XL-binding protein v68 (LOC652903), mRNA.
LOC653119	PREDICTED: Homo sapiens similar to block of proliferation 1 (LOC653119), mRNA.

LOC653204	PREDICTED: Homo sapiens similar to myotubularin related protein 1 (LOC653204), mRNA.
LOC653257	PREDICTED: similar to Gamma-glutamyltranspeptidase 1 precursor, mRNA.
LOC653352	PREDICTED: similar to eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8, transcript variant 12, mRNA.
LOC653355	PREDICTED: similar to Contactin-associated protein-like 3 precursor, mRNA.
LOC653764	PREDICTED: Homo sapiens similar to muscle RAS oncogene homolog (LOC653764), mRNA.
LOC653904	PREDICTED: Homo sapiens similar to hCG2014439, transcript variant 3 (LOC653904), mRNA.
LOC653994	PREDICTED: similar to Eukaryotic translation initiation factor 4H, transcript variant 2, mRNA.
LOC653994	PREDICTED: similar to eukaryotic translation initiation factor 4H isoform 2, transcript variant 5, mRNA.
LOC654135	PREDICTED: similar to Acyl-protein thioesterase 2 (Lysophospholipase II), transcript variant 2, mRNA.
LOC654174	PREDICTED: Homo sapiens similar to lethal (2) k00619 CG4775-PA (LOC654174), mRNA.
LOC728005	PREDICTED: similar to centaurin, gamma-like family, member 1, transcript variant 1 (LOC728005), mRNA.
LOC728127	PREDICTED: Homo sapiens similar to centaurin, gamma-like family, member 1 (LOC728127), mRNA.
LOC728452	PREDICTED: Homo sapiens similar to nuclear pore membrane protein 121 (LOC728452), mRNA.
LOC728499	PREDICTED: similar to Nuclear envelope pore membrane protein POM 121, mRNA.
LOC728608	PREDICTED: Homo sapiens similar to centaurin, gamma-like family, member 1 (LOC728608), mRNA.
LOC729008	PREDICTED: Homo sapiens similar to Apoptosis-related protein 2 (APR-2) (LOC729008), mRNA.
LOC729021	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC729021 (LOC729021), mRNA.
LOC730092	RRN3 RNA polymerase I transcription factor homolog (S. cerevisiae) pseudogene on chromosome 16.
LOC730417	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC730417 (LOC730417), mRNA.
LOC731007	PREDICTED: similar to Adenylate kinase isoenzyme 4, mitochondrial, mRNA.
LOC731835	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein LOC731835 (LOC731835), mRNA.
LOC90120	PREDICTED: hypothetical gene supported by AK023162, transcript variant 4 (LOC90120), mRNA.
LOC90624	Homo sapiens hypothetical protein LOC90624 (LOC90624), mRNA.
LOC91461	Homo sapiens hypothetical protein BC007901 (LOC91461), mRNA.
LONP2	Homo sapiens lon peptidase 2, peroxisomal (LONP2), mRNA.
LONP2	Homo sapiens lon peptidase 2, peroxisomal (LONP2), mRNA.
LPGAT1	Homo sapiens lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1 (LPGAT1), mRNA.
LPP	Homo sapiens LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma (LPP), mRNA.
LRCH3	Homo sapiens leucine-rich repeats and calponin homology (CH) domain containing 3 (LRCH3), mRNA.
LRP11	Homo sapiens low density lipoprotein receptor-related protein 11 (LRP11), mRNA.
LRP3	Homo sapiens low density lipoprotein receptor-related protein 3 (LRP3), mRNA.
LRP4	Homo sapiens low density lipoprotein receptor-related protein 4 (LRP4), mRNA.
LRRC37A4	leucine rich repeat containing 37, member A4 (pseudogene), non-coding RNA.
LRRC47	Homo sapiens leucine rich repeat containing 47 (LRRC47), mRNA.
LRRC56	Homo sapiens leucine rich repeat containing 56 (LRRC56), mRNA.
LRRC8D	Homo sapiens leucine rich repeat containing 8 family, member D (LRRC8D), mRNA.
LSM12	Homo sapiens LSM12 homolog (S. cerevisiae) (LSM12), mRNA.
LSM12	Homo sapiens LSM12 homolog (S. cerevisiae) (LSM12), mRNA.
LY6G5B	Homo sapiens lymphocyte antigen 6 complex, locus G5B (LY6G5B), mRNA.
LYPLA2P1	Homo sapiens lysophospholipase II pseudogene 1 (LYPLA2P1) on chromosome 6.
LYZ	Homo sapiens lysozyme (renal amyloidosis) (LYZ), mRNA.
MAGED2	Homo sapiens melanoma antigen family D, 2 (MAGED2), transcript variant 1, mRNA.
MAGT1	Homo sapiens magnesium transporter 1 (MAGT1), mRNA.
MAN2A1	Homo sapiens mannosidase, alpha, class 2A, member 1 (MAN2A1), mRNA.
MANEAL	Homo sapiens mannosidase, endo-alpha-like (MANEAL), transcript variant 1, mRNA.
MAPK1	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1), transcript variant 1, mRNA.
MAPKAP1	mitogen-activated protein kinase associated protein 1 (MAPKAP1), transcript variant 1, mRNA.
MARCH5	Homo sapiens membrane-associated ring finger (C3HC4) 5 (MARCH5), mRNA.
MARCH9	Homo sapiens membrane-associated ring finger (C3HC4) 9 (MARCH9), mRNA.
MARS2	methionyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial, nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
MATK	Homo sapiens megakaryocyte-associated tyrosine kinase (MATK), transcript variant 1, mRNA.
MATR3	Homo sapiens matrin 3 (MATR3), transcript variant 1, mRNA.
MATR3	Homo sapiens matrin 3 (MATR3), transcript variant 1, mRNA.

MAZ	MYC-associated zinc finger protein (purine-binding transcription factor), transcript variant 2, mRNA.
MAZ	MYC-associated zinc finger protein (purine-binding transcription factor), transcript variant 2, mRNA.
MAZ	MYC-associated zinc finger protein (purine-binding transcription factor), transcript variant 2, mRNA.
MBNL1	Homo sapiens muscleblind-like (Drosophila) (MBNL1), transcript variant 6, mRNA.
MBTD1	Homo sapiens mbt domain containing 1 (MBTD1), mRNA.
MCFD2	Homo sapiens multiple coagulation factor deficiency 2 (MCFD2), mRNA.
MCM3APAS	MCM3 minichromosome maintenance deficient 3 associated protein antisense on chromosome 21.
MCM7	minichromosome maintenance complex component 7 (MCM7), transcript variant 1, mRNA.
MDM4	Homo sapiens Mdm4 p53 binding protein homolog (mouse) (MDM4), mRNA.
MECP2	Homo sapiens methyl CpG binding protein 2 (Rett syndrome) (MECP2), mRNA.
MED18	Homo sapiens mediator complex subunit 18 (MED18), mRNA.
MED22	Homo sapiens mediator complex subunit 22 (MED22), transcript variant c, mRNA.
MED27	Homo sapiens mediator complex subunit 27 (MED27), mRNA.
MEGF8	Homo sapiens multiple EGF-like-domains 8 (MEGF8), mRNA.
MESDC2	Homo sapiens mesoderm development candidate 2 (MESDC2), mRNA.
METRNL	PREDICTED: Homo sapiens meteorin, glial cell differentiation regulator-like (METRNL), mRNA.
METT10D	Homo sapiens methyltransferase 10 domain containing (METT10D), mRNA.
METTL2A	Homo sapiens methyltransferase like 2A (METTL2A), mRNA.
METTL7A	Homo sapiens methyltransferase like 7A (METTL7A), mRNA.
METTL8	Homo sapiens methyltransferase like 8 (METTL8), mRNA.
MEX3B	Homo sapiens mex-3 homolog B (C. elegans) (MEX3B), mRNA.
MEX3C	Homo sapiens mex-3 homolog C (C. elegans) (MEX3C), mRNA.
MEX3D	Homo sapiens mex-3 homolog D (C. elegans) (MEX3D), transcript variant 2, mRNA.
MFHAS1	Homo sapiens malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1 (MFHAS1), mRNA.
MFNG	Homo sapiens MFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase (MFNG), mRNA.
MGAT3	mannosyl (beta-1,4-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, transcript variant 1, mRNA
MGAT4B	mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, isozyme B, variant 1
MGC18216	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein MGC18216 (MGC18216), mRNA.
MGC27345	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein MGC27345 (MGC27345), misc RNA.
MGC2752	Homo sapiens hypothetical protein MGC2752 (MGC2752), mRNA.
MGC3032	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein MGC3032, transcript variant 3 (MGC3032), mRNA.
MGC42630	Homo sapiens hypothetical protein MGC42630 (MGC42630), mRNA.
MGC48637	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein MGC48637 (MGC48637), mRNA.
MGC5139	PREDICTED: Homo sapiens hypothetical protein MGC5139, transcript variant 2 (MGC5139), mRNA.
MGC70857	Homo sapiens similar to RIKEN cDNA C030006K11 gene (MGC70857), mRNA.
MGLL	Homo sapiens monoglyceride lipase (MGLL), transcript variant 1, mRNA.
MKLN1	Homo sapiens muskelin 1, intracellular mediator containing kelch motifs (MKLN1), mRNA.
MMACHC	methylmalonic aciduria (cobalamin deficiency) cblC type, with homocystinuria (MMACHC), mRNA.
MOBKL2B	Homo sapiens MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 2B (yeast) (MOBKL2B), mRNA.
MON2	Homo sapiens MON2 homolog (yeast) (MON2), mRNA.
MPDU1	Homo sapiens mannose-P-dolichol utilization defect 1 (MPDU1), mRNA.
MPHOSPH8	Homo sapiens M-phase phosphoprotein 8 (MPHOSPH8), mRNA.
MRE11A	MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae) (MRE11A), transcript variant 2, mRNA.
MR11	methylthioribose-1-phosphate isomerase homolog (S. cerevisiae) (MR11), transcript variant 1, mRNA.
MR11	methylthioribose-1-phosphate isomerase homolog (S. cerevisiae) (MR11), transcript variant 1, mRNA.
MR11	methylthioribose-1-phosphate isomerase homolog (S. cerevisiae) (MR11), transcript variant 2, mRNA.
MRPL30	mitochondrial ribosomal protein L30, nuclear gene encoding mitochondrial protein, variant 1, mRNA.
MRPS16	mitochondrial ribosomal protein S16 (MRPS16), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
MSMB	Homo sapiens microseminoprotein, beta- (MSMB), transcript variant PSP94, mRNA.
MSRB3	Homo sapiens methionine sulfoxide reductase B3 (MSRB3), transcript variant 1, mRNA.
MSRB3	Homo sapiens methionine sulfoxide reductase B3 (MSRB3), transcript variant 1, mRNA.
MTMR2	Homo sapiens myotubularin related protein 2 (MTMR2), transcript variant 1, mRNA.
MTX3	Homo sapiens metaxin 3 (MTX3), mRNA.

MXD4	Homo sapiens MAX dimerization protein 4 (MXD4), mRNA.
MXRA7	Homo sapiens matrix-remodelling associated 7 (MXRA7), transcript variant 2, mRNA.
NAB2	Homo sapiens NGFI-A binding protein 2 (EGR1 binding protein 2) (NAB2), mRNA.
NARG2	Homo sapiens NMDA receptor regulated 2 (NARG2), transcript variant 2, mRNA.
NARG2	Homo sapiens NMDA receptor regulated 2 (NARG2), transcript variant 2, mRNA.
NBPF1	neuroblastoma breakpoint family, member 1, mRNA.
NBPF10	neuroblastoma breakpoint family, member 10, mRNA.
NBPF14	Homo sapiens neuroblastoma breakpoint family, member 14 (NBPF14), mRNA.
NBPF20	Homo sapiens neuroblastoma breakpoint family, member 20 (NBPF20), mRNA.
NBPF3	Homo sapiens neuroblastoma breakpoint family, member 3 (NBPF3), mRNA.
NBPF3	Homo sapiens neuroblastoma breakpoint family, member 3 (NBPF3), mRNA.
NCAPG2	Homo sapiens non-SMC condensin II complex, subunit G2 (NCAPG2), mRNA.
NCKAP1	Homo sapiens NCK-associated protein 1 (NCKAP1), transcript variant 1, mRNA.
NDRG3	Homo sapiens NDRG family member 3 (NDRG3), transcript variant 2, mRNA.
NDST1	Homo sapiens N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 1 (NDST1), mRNA.
NDUFC2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 2, 14.5kDa (NDUFC2), mRNA.
NECAB3	Homo sapiens N-terminal EF-hand calcium binding protein 3 (NECAB3), transcript variant 1, mRNA.
NFATC2IP	PREDICTED: nuclear factor of activated T-cells, mRNA
NFYA	Homo sapiens nuclear transcription factor Y, alpha (NFYA), transcript variant 1, mRNA.
NICN1	Homo sapiens nicolin 1 (NICN1), mRNA.
NKIRAS2	Homo sapiens NFkB inhibitor interacting Ras-like 2 (NKIRAS2), transcript variant 2, mRNA.
NMNAT1	Homo sapiens nicotinamide nucleotide adenyltransferase 1 (NMNAT1), mRNA.
NOL9	Homo sapiens nucleolar protein 9 (NOL9), mRNA.
NOP14	Homo sapiens NOP14 nucleolar protein homolog (yeast) (NOP14), mRNA.
NOTCH2	Homo sapiens Notch homolog 2 (Drosophila) (NOTCH2), mRNA.
NPHP3	Homo sapiens nephronophthisis 3 (adolescent) (NPHP3), mRNA.
NPL	Homo sapiens N-acetylneuraminase pyruvate lyase (dihydrodipicolinate synthase) (NPL), mRNA.
NPTX1	Homo sapiens neuronal pentraxin I (NPTX1), mRNA.
NPTX1	Homo sapiens neuronal pentraxin I (NPTX1), mRNA.
NRARP	Homo sapiens Notch-regulated ankyrin repeat protein (NRARP), mRNA.
NRP1	Homo sapiens neuropilin 1 (NRP1), transcript variant 1, mRNA.
NSUN5C	Homo sapiens NOP2/Sun domain family, member 5C (NSUN5C), transcript variant 1, mRNA.
NT5M	5',3'-nucleotidase, mitochondrial (NT5M), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
NUDT19	PREDICTED: nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 19 (NUDT19), mRNA.
NUDT21	Homo sapiens nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 21 (NUDT21), mRNA.
NUP35	Homo sapiens nucleoporin 35kDa (NUP35), mRNA.
NUP43	Homo sapiens nucleoporin 43kDa (NUP43), transcript variant 1, mRNA.
NUP43	Homo sapiens nucleoporin 43kDa (NUP43), transcript variant 2, mRNA.
NUTF2	Homo sapiens nuclear transport factor 2 (NUTF2), mRNA.
OCA2	Homo sapiens oculocutaneous albinism II (pink-eye dilution homolog, mouse) (OCA2), mRNA.
OLFML2A	Homo sapiens olfactomedin-like 2A (OLFML2A), mRNA.
ONECUT2	Homo sapiens one cut homeobox 2 (ONECUT2), mRNA.
ONECUT2	Homo sapiens one cut homeobox 2 (ONECUT2), mRNA.
ONECUT2	Homo sapiens one cut homeobox 2 (ONECUT2), mRNA.
OPA3	optic atrophy 3 (autosomal recessive, with chorea and spastic paraplegia) (OPA3), variant 2, mRNA.
OPA3	optic atrophy 3 (autosomal recessive, with chorea and spastic paraplegia) (OPA3), variant 2, mRNA.
ORC5L	Homo sapiens origin recognition complex, subunit 5-like (yeast) (ORC5L), transcript variant 1, mRNA.
ORMDL3	Homo sapiens ORM1-like 3 (S. cerevisiae) (ORMDL3), mRNA.
OSR2	Homo sapiens odd-skipped related 2 (Drosophila) (OSR2), mRNA.
OSTM1	Homo sapiens osteopetrosis associated transmembrane protein 1 (OSTM1), mRNA.
OVCA2	Homo sapiens ovarian tumor suppressor candidate 2 (OVCA2), mRNA.
PAG1	Homo sapiens phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains 1 (PAG1), mRNA.
PAG1	Homo sapiens phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains 1 (PAG1), mRNA.

PAICS	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, transcript variant 2, mRNA.
PAICS	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, transcript variant 2, mRNA.
PAICS	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, transcript variant 2, mRNA.
PAQR5	Homo sapiens progesterin and adipoQ receptor family member V (PAQR5), mRNA.
PAQR7	Homo sapiens progesterin and adipoQ receptor family member VII (PAQR7), mRNA.
PARD6G	Homo sapiens par-6 partitioning defective 6 homolog gamma (C. elegans) (PARD6G), mRNA.
PARD6G	Homo sapiens par-6 partitioning defective 6 homolog gamma (C. elegans) (PARD6G), mRNA.
PARM1	Homo sapiens prostate androgen-regulated mucin-like protein 1 (PARM1), mRNA.
PATZ1	Homo sapiens POZ (BTB) and AT hook containing zinc finger 1 (PATZ1), transcript variant 1, mRNA.
PBX3	Homo sapiens pre-B-cell leukemia homeobox 3 (PBX3), mRNA.
PCBD2	pterin-4 alpha-carbinolamine dehydratase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 alpha
PCDHB19P	Homo sapiens protocadherin beta 19 pseudogene (PCDHB19P), non-coding RNA.
PCDHB9	Homo sapiens protocadherin beta 9 (PCDHB9), mRNA.
PCYOX1	Homo sapiens prenylcysteine oxidase 1 (PCYOX1), mRNA.
PDDC1	Homo sapiens Parkinson disease 7 domain containing 1 (PDDC1), mRNA.
PDE7A	Homo sapiens phosphodiesterase 7A (PDE7A), transcript variant 1, mRNA.
PDP2	Homo sapiens pyruvate dehydrogenase phosphatase catalytic subunit 2 (PDP2), mRNA.
PDZD4	Homo sapiens PDZ domain containing 4 (PDZD4), mRNA.
PELI2	Homo sapiens pellino homolog 2 (Drosophila) (PELI2), mRNA.
PEX1	Homo sapiens peroxisome biogenesis factor 1 (PEX1), mRNA.
PEX26	Homo sapiens peroxisome biogenesis factor 26 (PEX26), mRNA.
PEX26	Homo sapiens peroxisome biogenesis factor 26 (PEX26), mRNA.
PGAM5	PREDICTED: Homo sapiens phosphoglycerate mutase family member 5 (PGAM5), mRNA.
PGAP3	Homo sapiens post-GPI attachment to proteins 3 (PGAP3), mRNA.
PGBD4	Homo sapiens piggyBac transposable element derived 4 (PGBD4), mRNA.
PGPEP1	Homo sapiens pyroglutamyl-peptidase I (PGPEP1), mRNA.
PHACTR4	Homo sapiens phosphatase and actin regulator 4 (PHACTR4), transcript variant 1, mRNA.
PHCA	Homo sapiens phytoceramidase, alkaline (PHCA), mRNA.
PHF1	Homo sapiens PHD finger protein 1 (PHF1), transcript variant 2, mRNA.
PHIP	Homo sapiens pleckstrin homology domain interacting protein (PHIP), mRNA.
PHLPP2	Homo sapiens PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 2 (PHLPP2), mRNA.
PIGO	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class O (PIGO), transcript variant 1, mRNA.
PIK3R1	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha) (PIK3R1), transcript variant 1, mRNA.
PIM3	Homo sapiens pim-3 oncogene (PIM3), mRNA.
PIP4K2B	Homo sapiens phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, beta (PIP4K2B), mRNA.
PKNOX1	Homo sapiens PBX/knotted 1 homeobox 1 (PKNOX1), mRNA.
PLA2G2D	Homo sapiens phospholipase A2, group IID (PLA2G2D), mRNA.
PLCXD1	Homo sapiens phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 1 (PLCXD1), mRNA.
PLDN	Homo sapiens pallidin homolog (mouse) (PLDN), mRNA.
PLEKHA2	pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 2, mRNA.
PM20D2	Homo sapiens peptidase M20 domain containing 2 (PM20D2), mRNA.
PMP22	Homo sapiens peripheral myelin protein 22 (PMP22), transcript variant 2, mRNA.
PMS2L1	PREDICTED: postmeiotic segregation increased 2-like 1, transcript variant 2 (PMS2L1), mRNA.
PMS2L1	PREDICTED: postmeiotic segregation increased 2-like 1, transcript variant 8 (PMS2L1), mRNA.
POLH	Homo sapiens polymerase (DNA directed), eta (POLH), mRNA.
POLR1B	Homo sapiens polymerase (RNA) I polypeptide B, 128kDa (POLR1B), mRNA.
POLR2J4	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J, 13.3kDa pseudogene (POLR2J4) on chromosome 7.
POLR3H	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide H (22.9kD) (POLR3H), transcript variant 3, mRNA.
POMT2	Homo sapiens protein-O-mannosyltransferase 2 (POMT2), mRNA.
POU3F2	Homo sapiens POU class 3 homeobox 2 (POU3F2), mRNA.
PPAPDC3	Homo sapiens phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 3 (PPAPDC3), mRNA.
PPDPF	pancreatic progenitor cell differentiation and proliferation factor homolog (zebrafish) (PPDPF), mRNA.
PPIA	Homo sapiens peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) (PPIA), mRNA.

PPID	Homo sapiens peptidylprolyl isomerase D (PPID), mRNA.
PPIL1	Homo sapiens peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 1 (PPIL1), mRNA.
PPM1A	protein phosphatase 1A (formerly 2C), magnesium-dependent, alpha isoform, transcript variant 3, mRNA.
PPM1B	protein phosphatase 1B (formerly 2C), magnesium-dependent, beta isoform, transcript variant 4, mRNA.
PPM1F	Homo sapiens protein phosphatase 1F (PP2C domain containing) (PPM1F), mRNA.
PPM1G	protein phosphatase 1G (formerly 2C), magnesium-dependent, gamma isoform, variant 1, mRNA.
PPP1R16B	Homo sapiens protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 16B (PPP1R16B), mRNA.
PPP2R4	protein phosphatase 2A activator, regulatory subunit 4 (PPP2R4), transcript variant 3, mRNA.
PPTC7	Homo sapiens PTC7 protein phosphatase homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (PPTC7), mRNA.
PRIC285	peroxisomal proliferator-activated receptor A interacting complex 285, transcript variant 2, mRNA.
PRKAB2	Homo sapiens protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit (PRKAB2), mRNA.
PRKAR2A	Homo sapiens protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, alpha (PRKAR2A), mRNA.
PRKDC	protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide (PRKDC), transcript variant 1, mRNA.
PRR11	Homo sapiens proline rich 11 (PRR11), mRNA.
PRR5	Homo sapiens proline rich 5 (renal) (PRR5), transcript variant 1, mRNA.
PRR5	Homo sapiens proline rich 5 (renal) (PRR5), transcript variant 5, mRNA.
PRR7	Homo sapiens proline rich 7 (synaptic) (PRR7), mRNA.
PSD3	Homo sapiens pleckstrin and Sec7 domain containing 3 (PSD3), transcript variant 1, mRNA.
PSENE1	Homo sapiens presenilin enhancer 2 homolog (<i>C. elegans</i>) (PSENE1), mRNA.
PSKH1	Homo sapiens protein serine kinase H1 (PSKH1), mRNA.
PSPH	Homo sapiens phosphoserine phosphatase (PSPH), mRNA.
PTP4A2	PREDICTED: Homo sapiens protein tyrosine phosphatase type IVA, member 2 (PTP4A2), mRNA.
PTP4A2	PREDICTED: protein tyrosine phosphatase type IVA, member 2, transcript variant 9 (PTP4A2), mRNA.
PTP4A3	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase type IVA, member 3 (PTP4A3), transcript variant 2, mRNA.
PTPN12	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12 (PTPN12), mRNA.
PURB	Homo sapiens purine-rich element binding protein B (PURB), mRNA.
PWWP2	Homo sapiens PWWP domain containing 2 (PWWP2), mRNA.
PXMP4	Homo sapiens peroxisomal membrane protein 4, 24kDa (PXMP4), transcript variant 2, mRNA.
QKI	Homo sapiens quaking homolog, KH domain RNA binding (mouse) (QKI), transcript variant 1, mRNA.
QKI	Homo sapiens quaking homolog, KH domain RNA binding (mouse) (QKI), transcript variant 1, mRNA.
QPCTL	Homo sapiens glutamyl-peptide cyclotransferase-like (QPCTL), mRNA.
QSOX1	Homo sapiens quiescin Q6 sulfhydryl oxidase 1 (QSOX1), transcript variant 1, mRNA.
QTRT1	Homo sapiens queuine tRNA-ribosyltransferase 1 (QTRT1), mRNA.
RAB11FIP2	Homo sapiens RAB11 family interacting protein 2 (class I) (RAB11FIP2), mRNA.
RAB11FIP2	Homo sapiens RAB11 family interacting protein 2 (class I) (RAB11FIP2), mRNA.
RAB11FIP4	Homo sapiens RAB11 family interacting protein 4 (class II) (RAB11FIP4), mRNA.
RAB21	Homo sapiens RAB21, member RAS oncogene family (RAB21), mRNA.
RAB22A	Homo sapiens RAB22A, member RAS oncogene family (RAB22A), mRNA.
RAB23	Homo sapiens RAB23, member RAS oncogene family (RAB23), transcript variant 1, mRNA.
RAB24	Homo sapiens RAB24, member RAS oncogene family (RAB24), transcript variant 1, mRNA.
RAB26	Homo sapiens RAB26, member RAS oncogene family (RAB26), mRNA.
RAB28	Homo sapiens RAB28, member RAS oncogene family (RAB28), transcript variant 2, mRNA.
RAB2B	Homo sapiens RAB2B, member RAS oncogene family (RAB2B), mRNA.
RAB37	Homo sapiens RAB37, member RAS oncogene family (RAB37), transcript variant 3, mRNA.
RABL5	Homo sapiens RAB, member RAS oncogene family-like 5 (RABL5), mRNA.
RAD1	Homo sapiens RAD1 homolog (<i>S. pombe</i>) (RAD1), transcript variant 3, mRNA.
RALGAPA1	Ral GTPase activating protein, alpha subunit 1 (catalytic) (RALGAPA1), transcript variant 2, mRNA.
RASSF1	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1 (RASSF1), transcript variant C, mRNA.
RB1	Homo sapiens retinoblastoma 1 (RB1), mRNA.
RBBP9	Homo sapiens retinoblastoma binding protein 9 (RBBP9), mRNA.
RBBP9	Homo sapiens retinoblastoma binding protein 9 (RBBP9), mRNA.
RBM12B	Homo sapiens RNA binding motif protein 12B (RBM12B), mRNA.
RCC1	Homo sapiens regulator of chromosome condensation 1 (RCC1), transcript variant 3, mRNA.

RCP9	Homo sapiens calcitonin gene-related peptide-receptor component protein (RCP9), mRNA.
RFNG	Homo sapiens RFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase (RFNG), mRNA.
RFNG	PREDICTED: Homo sapiens radical fringe homolog (Drosophila) (RFNG), mRNA.
RFNG	PREDICTED: Homo sapiens radical fringe homolog (Drosophila) (RFNG), mRNA.
RFNG	PREDICTED: Homo sapiens radical fringe homolog (Drosophila) (RFNG), mRNA.
RFXAP	Homo sapiens regulatory factor X-associated protein (RFXAP), mRNA.
RGP1	Homo sapiens RGP1 retrograde golgi transport homolog (S. cerevisiae) (RGP1), mRNA.
RHBDL3	Homo sapiens rhomboid, veinlet-like 3 (Drosophila) (RHBDL3), mRNA.
RIC8B	Homo sapiens resistance to inhibitors of cholinesterase 8 homolog B (C. elegans) (RIC8B), mRNA.
RNF149	Homo sapiens ring finger protein 149 (RNF149), mRNA.
RNF160	Homo sapiens ring finger protein 160 (RNF160), mRNA.
RNF165	Homo sapiens ring finger protein 165 (RNF165), mRNA.
RNF170	Homo sapiens ring finger protein 170 (RNF170), mRNA.
RNF213	Homo sapiens ring finger protein 213 (RNF213), transcript variant 2, mRNA.
RNF215	Homo sapiens ring finger protein 215 (RNF215), mRNA.
RNF24	Homo sapiens ring finger protein 24 (RNF24), mRNA.
RNF38	Homo sapiens ring finger protein 38 (RNF38), transcript variant 2, mRNA.
ROD1	Homo sapiens ROD1 regulator of differentiation 1 (S. pombe) (ROD1), mRNA.
RP2	Homo sapiens retinitis pigmentosa 2 (X-linked recessive) (RP2), mRNA.
RPA4	Homo sapiens replication protein A4, 34kDa (RPA4), mRNA.
RPL32P3	Homo sapiens ribosomal protein L32 pseudogene 3 (RPL32P3), non-coding RNA.
RPL37A	Homo sapiens ribosomal protein L37a (RPL37A), mRNA.
RPL7L1	Homo sapiens ribosomal protein L7-like 1 (RPL7L1), mRNA.
RPS6KA3	Homo sapiens ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3 (RPS6KA3), mRNA.
RPS6KA3	PREDICTED: ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3, transcript variant 3 (RPS6KA3), mRNA.
RPS6KA3	PREDICTED: ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3, transcript variant 3 (RPS6KA3), mRNA.
RRM2	Homo sapiens ribonucleotide reductase M2 polypeptide (RRM2), mRNA.
RRM2B	Homo sapiens ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible) (RRM2B), mRNA.
RTTN	Homo sapiens rotatin (RTTN), mRNA.
RXRA	Homo sapiens retinoid X receptor, alpha (RXRA), mRNA.
RYK	Homo sapiens RYK receptor-like tyrosine kinase (RYK), transcript variant 1, mRNA.
RYK	Homo sapiens RYK receptor-like tyrosine kinase (RYK), transcript variant 1, mRNA.
RYK	Homo sapiens RYK receptor-like tyrosine kinase (RYK), transcript variant 2, mRNA.
RYR1	Homo sapiens ryanodine receptor 1 (skeletal) (RYR1), transcript variant 2, mRNA.
SAMD5	Homo sapiens sterile alpha motif domain containing 5 (SAMD5), mRNA.
SAPS2	PREDICTED: Homo sapiens SAPS domain family, member 2, transcript variant 2 (SAPS2), mRNA.
SARM1	Homo sapiens sterile alpha and TIR motif containing 1 (SARM1), mRNA.
SATL1	Homo sapiens spermidine/spermine N1-acetyl transferase-like 1 (SATL1), mRNA.
SC4MOL	Homo sapiens sterol-C4-methyl oxidase-like (SC4MOL), transcript variant 1, mRNA.
SCAMP5	Homo sapiens secretory carrier membrane protein 5 (SCAMP5), mRNA.
SCARF2	Homo sapiens scavenger receptor class F, member 2 (SCARF2), transcript variant 1, mRNA.
SCARF2	Homo sapiens scavenger receptor class F, member 2 (SCARF2), transcript variant 1, mRNA.
SCD	Homo sapiens stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase) (SCD), mRNA.
SCN1B	Homo sapiens sodium channel, voltage-gated, type I, beta (SCN1B), transcript variant a, mRNA.
SCN2B	Homo sapiens sodium channel, voltage-gated, type II, beta (SCN2B), mRNA.
SCNN1D	Homo sapiens sodium channel, nonvoltage-gated 1, delta (SCNN1D), transcript variant 2, mRNA.
SEC23A	Homo sapiens Sec23 homolog A (S. cerevisiae) (SEC23A), mRNA.
SEC24A	Homo sapiens SEC24 family, member A (S. cerevisiae) (SEC24A), mRNA.
SEC24B	Homo sapiens SEC24 family, member B (S. cerevisiae) (SEC24B), transcript variant 1, mRNA.
SEC61A1	Homo sapiens Sec61 alpha 1 subunit (S. cerevisiae) (SEC61A1), mRNA.
SEH1L	Homo sapiens SEH1-like (S. cerevisiae) (SEH1L), transcript variant 2, mRNA.
SEPP1	Homo sapiens selenoprotein P, plasma, 1 (SEPP1), transcript variant 1, mRNA.
SEPW1	Homo sapiens selenoprotein W, 1 (SEPW1), mRNA.
SERF1A	Homo sapiens small EDRK-rich factor 1A (telomeric) (SERF1A), mRNA.

SFXN5	Homo sapiens sideroflexin 5 (SFXN5), mRNA.
SGPP2	PREDICTED: Homo sapiens sphingosine-1-phosphate phosphatase 2 (SGPP2), mRNA.
SH2B3	Homo sapiens SH2B adaptor protein 3 (SH2B3), mRNA.
SH3BP2	Homo sapiens SH3-domain binding protein 2 (SH3BP2), mRNA.
SHC2	Homo sapiens SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 2 (SHC2), mRNA.
SHISA2	Homo sapiens shisa homolog 2 (<i>Xenopus laevis</i>) (SHISA2), mRNA.
SHISA3	Homo sapiens shisa homolog 3 (<i>Xenopus laevis</i>) (SHISA3), mRNA.
SKA1	Homo sapiens spindle and kinetochore associated complex subunit 1, transcript variant 2, mRNA.
SLAIN1	Homo sapiens SLAIN motif family, member 1 (SLAIN1), transcript variant 2, mRNA.
SLC12A2	solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 2 (SLC12A2), mRNA. Homo sapiens solute carrier family 16, member 5 (monocarboxylic acid transporter 6) (SLC16A5), mRNA.
SLC16A5	
SLC19A3	Homo sapiens solute carrier family 19, member 3 (SLC19A3), mRNA.
SLC22A4	solute carrier family 22 (organic cation/ergothioneine transporter), member 4 (SLC22A4), mRNA.
SLC25A15	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; ornithine transporter) member 15, mRNA.
SLC25A15	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; ornithine transporter) member 15, mRNA.
SLC25A20	PREDICTED: solute carrier family 25 (carnitine/acylcarnitine translocase), member 20, mRNA.
SLC25A26	solute carrier family 25, member 26 (SLC25A26), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
SLC25A26	solute carrier family 25, member 26 (SLC25A26), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.
SLC25A3	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 3, transcript variant 3, mRNA.
SLC2A10	Homo sapiens solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 10 (SLC2A10), mRNA.
SLC30A2	Homo sapiens solute carrier family 30 (zinc transporter), member 2, transcript variant 2, mRNA.
SLC30A6	Homo sapiens solute carrier family 30 (zinc transporter), member 6 (SLC30A6), mRNA.
SLC30A6	Homo sapiens solute carrier family 30 (zinc transporter), member 6 (SLC30A6), mRNA.
SLC33A1	Homo sapiens solute carrier family 33 (acetyl-CoA transporter), member 1 (SLC33A1), mRNA.
SLC35A3	solute carrier family 35 (UDP-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) transporter), member A3, mRNA.
SLC35E1	Homo sapiens solute carrier family 35, member E1 (SLC35E1), mRNA.
SLC35E3	Homo sapiens solute carrier family 35, member E3 (SLC35E3), mRNA.
SLC37A3	solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 3, transcript variant 1, mRNA.
SLC39A9	Homo sapiens solute carrier family 39 (zinc transporter), member 9 (SLC39A9), mRNA. solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2, variant 6, mRNA
SLC3A2	
SLC44A1	Homo sapiens solute carrier family 44, member 1 (SLC44A1), mRNA.
SLC4A7	Homo sapiens solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 7 (SLC4A7), mRNA.
SLC6A10P	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 10 on chromosome 16.
SLC6A17	Homo sapiens solute carrier family 6, member 17 (SLC6A17), mRNA.
SLC9A9	Homo sapiens solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 9 (SLC9A9), mRNA.
SLK	Homo sapiens STE20-like kinase (yeast) (SLK), mRNA.
SLMO1	Homo sapiens slowmo homolog 1 (<i>Drosophila</i>) (SLMO1), mRNA.
SLMO1	Homo sapiens slowmo homolog 1 (<i>Drosophila</i>) (SLMO1), mRNA.
SLMO1	Homo sapiens slowmo homolog 1 (<i>Drosophila</i>) (SLMO1), mRNA.
SMAD7	Homo sapiens SMAD family member 7 (SMAD7), mRNA.
SMG1	Homo sapiens PI-3-kinase-related kinase SMG-1 (SMG1), mRNA.
SMOC1	Homo sapiens SPARC related modular calcium binding 1 (SMOC1), transcript variant 1, mRNA.
SNAPC1	Homo sapiens small nuclear RNA activating complex, polypeptide 1, 43kDa (SNAPC1), mRNA.
SNHG10	Homo sapiens small nucleolar RNA host gene 10 (non-protein coding) (SNHG10), non-coding RNA.
SNHG4	Homo sapiens small nucleolar RNA host gene (non-protein coding) 4 (SNHG4) on chromosome 5.
SNN	Homo sapiens stannin (SNN), mRNA.
SNPH	Homo sapiens syntaphilin (SNPH), mRNA.
SNRPD3	Homo sapiens small nuclear ribonucleoprotein D3 polypeptide 18kDa (SNRPD3), mRNA.
SNX11	Homo sapiens sorting nexin 11 (SNX11), transcript variant 1, mRNA.
SNX24	Homo sapiens sorting nexin 24 (SNX24), mRNA.
SNX24	Homo sapiens sorting nexin 24 (SNX24), mRNA.
SNX30	Homo sapiens sorting nexin family member 30 (SNX30), mRNA.

SOCS4	Homo sapiens suppressor of cytokine signaling 4 (SOCS4), transcript variant 2, mRNA.
SOCS7	Homo sapiens suppressor of cytokine signaling 7 (SOCS7), mRNA.
SON	Homo sapiens SON DNA binding protein (SON), transcript variant f, mRNA.
SON	Homo sapiens SON DNA binding protein (SON), transcript variant f, mRNA.
SOX3	Homo sapiens SRY (sex determining region Y)-box 3 (SOX3), mRNA.
SP3	Homo sapiens Sp3 transcription factor (SP3), transcript variant 2, mRNA.
SP4	Homo sapiens Sp4 transcription factor (SP4), mRNA.
SP8	Homo sapiens Sp8 transcription factor (SP8), transcript variant 1, mRNA.
SPAG9	Homo sapiens sperm associated antigen 9 (SPAG9), mRNA.
SPAG9	Homo sapiens sperm associated antigen 9 (SPAG9), transcript variant 2, mRNA.
SPC24	Homo sapiens SPC24, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae) (SPC24), mRNA.
SPG21	spastic paraplegia 21 (autosomal recessive, Mast syndrome), transcript variant 1, mRNA.
SPG21	spastic paraplegia 21 (autosomal recessive, Mast syndrome) (SPG21), transcript variant 1, mRNA.
SPG7	spastic paraplegia 7 (pure and complicated autosomal recessive) (SPG7), transcript variant 2, mRNA.
SPN	Homo sapiens sialoporphin (SPN), transcript variant 1, mRNA.
SPRYD3	Homo sapiens SPRY domain containing 3 (SPRYD3), mRNA.
SPTA1	Homo sapiens spectrin, alpha, erythrocytic 1 (elliptocytosis 2) (SPTA1), mRNA.
SPTBN4	Homo sapiens spectrin, beta, non-erythrocytic 4 (SPTBN4), transcript variant sigma1, mRNA.
SRD5A1	steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 1, mRNA.
SS18	Homo sapiens synovial sarcoma translocation, chromosome 18 (SS18), transcript variant 2, mRNA.
SSR2	PREDICTED: signal sequence receptor, beta (translocon-associated protein beta), variant 4, mRNA.
SSR3	Homo sapiens signal sequence receptor, gamma (translocon-associated protein gamma) (SSR3), mRNA.
ST6GAL1	ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 1 (ST6GAL1), transcript variant 1, mRNA.
ST6GALNAC4	ST6 (a-N-acetyl-neuraminyl-2,3-b-galactosyl-1, 3)-N-acetylgalactosaminide a-2,6-sialyltransferase 4
ST6GALNAC4	ST6 (a-N-acetyl-neuraminyl-2,3-b-galactosyl-1, 3)-N-acetylgalactosaminide a-2,6-sialyltransferase 4
ST6GALNAC4	ST6 (a-N-acetyl-neuraminyl-2,3-b-galactosyl-1, 3)-N-acetylgalactosaminide a-2,6-sialyltransferase 4
STAG3L1	Homo sapiens stromal antigen 3-like 1 (STAG3L1), transcript variant 1, mRNA.
STAG3L2	Homo sapiens stromal antigen 3-like 2 (STAG3L2), mRNA.
STK11	Homo sapiens serine/threonine kinase 11 (STK11), mRNA.
STK4	Homo sapiens serine/threonine kinase 4 (STK4), mRNA.
STRN3	Homo sapiens striatin, calmodulin binding protein 3 (STRN3), transcript variant 2, mRNA.
STS-1	Homo sapiens Cbl-interacting protein Sts-1 (STS-1), mRNA.
STT3B	STT3, subunit of the oligosaccharyltransferase complex, homolog B (S. cerevisiae) (STT3B), mRNA.
SULT1A4	sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 4, transcript variant 2, mRNA.
SUMF2	Homo sapiens sulfatase modifying factor 2 (SUMF2), transcript variant 4, mRNA.
SUZ12P	PREDICTED: suppressor of zeste 12 homolog pseudogene, transcript variant 7 (SUZ12P), mRNA.
TAF8	TAF8 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 43kDa (TAF8), mRNA.
TALDO1	PREDICTED: Homo sapiens transaldolase 1 (TALDO1), mRNA.
TAP2	transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP) (TAP2), transcript variant 1, mRNA.
TAP2	transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP) (TAP2), transcript variant 2, mRNA.
TARBP1	Homo sapiens TAR (HIV-1) RNA binding protein 1 (TARBP1), mRNA.
TATDN3	Homo sapiens TatD DNase domain containing 3 (TATDN3), transcript variant 1, mRNA.
TAX1BP3	Homo sapiens Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 3 (TAX1BP3), mRNA.
TBC1D16	Homo sapiens TBC1 domain family, member 16 (TBC1D16), mRNA.
TBX1	Homo sapiens T-box 1 (TBX1), transcript variant A, mRNA.
TBX1	Homo sapiens T-box 1 (TBX1), transcript variant B, mRNA.
TBX21	Homo sapiens T-box 21 (TBX21), mRNA.
TCEA1	Homo sapiens transcription elongation factor A (SII), 1 (TCEA1), transcript variant 2, mRNA.
TCF19	Homo sapiens transcription factor 19 (SC1) (TCF19), mRNA.
TCF19	Homo sapiens transcription factor 19 (TCF19), transcript variant 2, mRNA.
TCP1	Homo sapiens t-complex 1 (TCP1), transcript variant 1, mRNA.
TELO2	Homo sapiens TEL2, telomere maintenance 2, homolog (S. cerevisiae) (TELO2), mRNA.
TIAL1	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1 (TIAL1), transcript variant 1, mRNA.

TIMP3	Homo sapiens TIMP metallopeptidase inhibitor 3 (TIMP3), mRNA.
TIRAP	toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein (TIRAP), transcript variant 1, mRNA.
TJP1	Homo sapiens tight junction protein 1 (zona occludens 1) (TJP1), transcript variant 2, mRNA.
TMEM103	Homo sapiens transmembrane protein 103 (TMEM103), transcript variant 3, mRNA.
TMEM109	Homo sapiens transmembrane protein 109 (TMEM109), mRNA.
TMEM118	Homo sapiens transmembrane protein 118 (TMEM118), mRNA.
TMEM129	Homo sapiens transmembrane protein 129 (TMEM129), mRNA.
TMEM144	Homo sapiens transmembrane protein 144 (TMEM144), mRNA.
TMEM167B	Homo sapiens transmembrane protein 167B (TMEM167B), mRNA.
TMEM189-UBE2V1	TMEM189-UBE2V1 readthrough transcript (TMEM189-UBE2V1), transcript variant 1, mRNA.
TMEM19	Homo sapiens transmembrane protein 19 (TMEM19), mRNA.
TMEM191B	PREDICTED: Homo sapiens transmembrane protein 191B, transcript variant 2 (TMEM191B), mRNA.
TMEM191B	PREDICTED: Homo sapiens transmembrane protein 191B, transcript variant 2 (TMEM191B), mRNA.
TMEM194	Homo sapiens transmembrane protein 194 (TMEM194), mRNA.
TMEM2	Homo sapiens transmembrane protein 2 (TMEM2), mRNA.
TMEM200C	Homo sapiens transmembrane protein 200C (TMEM200C), mRNA.
TMEM201	Homo sapiens transmembrane protein 201 (TMEM201), mRNA.
TMEM63A	Homo sapiens transmembrane protein 63A (TMEM63A), mRNA.
TMEM64	Homo sapiens transmembrane protein 64 (TMEM64), mRNA.
TMEM91	Homo sapiens transmembrane protein 91 (TMEM91), mRNA.
TMPO	Homo sapiens thymopoietin (TMPO), transcript variant 1, mRNA.
TMTC1	Homo sapiens transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 1 (TMTC1), mRNA.
TMTC4	transmembrane and tetratricopeptide repeat containing 4 (TMTC4), transcript variant 1, mRNA.
TMUB2	transmembrane and ubiquitin-like domain containing 2 (TMUB2), transcript variant 3, mRNA.
TNFAIP8L1	Homo sapiens tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 1 (TNFAIP8L1), mRNA.
TNFRSF10D	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d, decoy with truncated death domain, mRNA.
TNFRSF12A	Homo sapiens tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A (TNFRSF12A), mRNA.
TNPO1	Homo sapiens transportin 1 (TNPO1), transcript variant 2, mRNA.
TNRC6B	Homo sapiens trinucleotide repeat containing 6B (TNRC6B), transcript variant 2, mRNA.
TOP3A	Homo sapiens topoisomerase (DNA) III alpha (TOP3A), mRNA.
TPMT	Homo sapiens thiopurine S-methyltransferase (TPMT), mRNA.
TPPP	Homo sapiens tubulin polymerization promoting protein (TPPP), mRNA.
TRADD	Homo sapiens TNFRSF1A-associated via death domain (TRADD), mRNA.
TRAPPC2	Homo sapiens trafficking protein particle complex 2 (TRAPPC2), transcript variant 2, mRNA.
TRIM35	Homo sapiens tripartite motif-containing 35 (TRIM35), transcript variant 2, mRNA.
TRIM5	Homo sapiens tripartite motif-containing 5 (TRIM5), transcript variant alpha, mRNA.
TRIM56	Homo sapiens tripartite motif-containing 56 (TRIM56), mRNA.
TRIM65	Homo sapiens tripartite motif-containing 65 (TRIM65), mRNA.
TRMT2B	Homo sapiens TRM2 tRNA methyltransferase 2 homolog B (S. cerevisiae) (TRMT2B), mRNA.
TRMT2B	Homo sapiens TRM2 tRNA methyltransferase 2 homolog B (S. cerevisiae) (TRMT2B), mRNA.
TRMT61A	Homo sapiens tRNA methyltransferase 61 homolog A (S. cerevisiae) (TRMT61A), mRNA.
TSC22D1	Homo sapiens TSC22 domain family, member 1 (TSC22D1), transcript variant 2, mRNA.
TSC22D2	Homo sapiens TSC22 domain family, member 2 (TSC22D2), mRNA.
TSC22D2	Homo sapiens TSC22 domain family, member 2 (TSC22D2), mRNA.
TSC22D3	Homo sapiens TSC22 domain family, member 3 (TSC22D3), transcript variant 2, mRNA.
TSHZ2	Homo sapiens teashirt zinc finger homeobox 2 (TSHZ2), mRNA.
TSPAN3	Homo sapiens tetraspanin 3 (TSPAN3), transcript variant 1, mRNA.
TTC28	PREDICTED: Homo sapiens tetratricopeptide repeat domain 28 (TTC28), mRNA.
TWSG1	Homo sapiens twisted gastrulation homolog 1 (Drosophila) (TWSG1), mRNA.
TXNDC15	Homo sapiens thioredoxin domain containing 15 (TXNDC15), mRNA.
TXNRD1	Homo sapiens thioredoxin reductase 1 (TXNRD1), transcript variant 4, mRNA.
TYSND1	Homo sapiens trypsin domain containing 1 (TYSND1), transcript variant 1, mRNA.
UBE2MP1	Homo sapiens ubiquitin-conjugating enzyme E2M pseudogene 1 (UBE2MP1), non-coding RNA.

UBL7	Homo sapiens ubiquitin-like 7 (bone marrow stromal cell-derived) (UBL7), transcript variant 1, mRNA.
UBOX5	Homo sapiens U-box domain containing 5 (UBOX5), transcript variant 1, mRNA.
UBR5	Homo sapiens ubiquitin protein ligase E3 component n-recogin 5 (UBR5), mRNA.
UBR5	Homo sapiens ubiquitin protein ligase E3 component n-recogin 5 (UBR5), mRNA.
UCN	Homo sapiens urocortin (UCN), mRNA.
UFM1	Homo sapiens ubiquitin-fold modifier 1 (UFM1), mRNA.
UGCGL1	Homo sapiens UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 1 (UGCGL1), transcript variant 1, mRNA.
UGCGL1	Homo sapiens UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 1 (UGCGL1), transcript variant 1, mRNA.
ULBP1	Homo sapiens UL16 binding protein 1 (ULBP1), mRNA.
UNC5B	Homo sapiens unc-5 homolog B (C. elegans) (UNC5B), mRNA.
UNC5B	Homo sapiens unc-5 homolog B (C. elegans) (UNC5B), mRNA.
UNC84A	Homo sapiens unc-84 homolog A (C. elegans) (UNC84A), mRNA.
USP1	Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 1 (USP1), transcript variant 1, mRNA.
USP14	ubiquitin specific peptidase 14 (tRNA-guanine transglycosylase) (USP14), transcript variant 2, mRNA.
USP22	Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 22 (USP22), mRNA.
USP26	Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 26 (USP26), mRNA.
USP31	Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 31 (USP31), mRNA.
USP37	Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 37 (USP37), mRNA.
USP38	Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 38 (USP38), mRNA.
USP9X	Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 9, X-linked (USP9X), transcript variant 4, mRNA.
VCL	Homo sapiens vinculin (VCL), transcript variant 2, mRNA.
VHL	Homo sapiens von Hippel-Lindau tumor suppressor (VHL), transcript variant 1, mRNA.
VHL	Homo sapiens von Hippel-Lindau tumor suppressor (VHL), transcript variant 2, mRNA.
VHL	Homo sapiens von Hippel-Lindau tumor suppressor (VHL), transcript variant 2, mRNA.
VOPPI	Homo sapiens vesicular, overexpressed in cancer, prosurvival protein 1 (VOPPI), mRNA.
VPRBP	Homo sapiens Vpr (HIV-1) binding protein (VPRBP), mRNA.
VPS37D	Homo sapiens vacuolar protein sorting 37 homolog D (S. cerevisiae) (VPS37D), mRNA.
VPS41	Homo sapiens vacuolar protein sorting 41 homolog (S. cerevisiae) (VPS41), transcript variant 1, mRNA.
VPS54	Homo sapiens vacuolar protein sorting 54 homolog (S. cerevisiae) (VPS54), transcript variant 1, mRNA.
WBSCR16	Homo sapiens Williams-Beuren syndrome chromosome region 16 (WBSCR16), mRNA.
WBSCR27	Homo sapiens Williams Beuren syndrome chromosome region 27 (WBSCR27), mRNA.
WDR26	Homo sapiens WD repeat domain 26 (WDR26), mRNA.
WDR31	Homo sapiens WD repeat domain 31 (WDR31), transcript variant 3, mRNA.
WDR35	Homo sapiens WD repeat domain 35 (WDR35), transcript variant 1, mRNA.
WDR51B	Homo sapiens WD repeat domain 51B (WDR51B), mRNA.
WDR73	Homo sapiens WD repeat domain 73 (WDR73), mRNA.
WDR81	Homo sapiens WD repeat domain 81 (WDR81), mRNA.
WRNIP1	Homo sapiens Werner helicase interacting protein 1 (WRNIP1), transcript variant 1, mRNA.
WSCD1	Homo sapiens WSC domain containing 1 (WSCD1), mRNA.
WTIP	Homo sapiens Wilms tumor 1 interacting protein (WTIP), mRNA.
XIAP	Homo sapiens X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP), mRNA.
XK	Homo sapiens X-linked Kx blood group (McLeod syndrome) (XK), mRNA.
XPO4	Homo sapiens exportin 4 (XPO4), mRNA.
XPOT	Homo sapiens exportin, tRNA (nuclear export receptor for tRNAs) (XPOT), mRNA.
XRCC6BP1	Homo sapiens XRCC6 binding protein 1 (XRCC6BP1), mRNA.
YPEL2	Homo sapiens yippee-like 2 (Drosophila) (YPEL2), mRNA.
YTHDC2	Homo sapiens YTH domain containing 2 (YTHDC2), mRNA.
ZAK	sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK (ZAK), transcript variant 2, mRNA.
ZBTB8A	Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 8A (ZBTB8A), mRNA. XM_945039
ZDHHC18	Homo sapiens zinc finger, DHHC-type containing 18 (ZDHHC18), mRNA.
ZFAND3	Homo sapiens zinc finger, AN1-type domain 3 (ZFAND3), mRNA.
ZFP30	Homo sapiens zinc finger protein 30 homolog (mouse) (ZFP30), mRNA.
ZFP36L2	Homo sapiens zinc finger protein 36, C3H type-like 2 (ZFP36L2), mRNA.

ZFYVE20	Homo sapiens zinc finger, FYVE domain containing 20 (ZFYVE20), mRNA.
ZNF121	Homo sapiens zinc finger protein 121 (ZNF121), mRNA.
ZNF137	Homo sapiens zinc finger protein 137 (ZNF137), mRNA.
ZNF160	Homo sapiens zinc finger protein 160 (ZNF160), transcript variant 2, mRNA.
ZNF28	Homo sapiens zinc finger protein 28 (ZNF28), mRNA.
ZNF3	Homo sapiens zinc finger protein 3 (ZNF3), transcript variant 2, mRNA.
ZNF320	Homo sapiens zinc finger protein 320 (ZNF320), mRNA.
ZNF321	Homo sapiens zinc finger protein 321 (ZNF321), mRNA.
ZNF329	Homo sapiens zinc finger protein 329 (ZNF329), mRNA.
ZNF346	Homo sapiens zinc finger protein 346 (ZNF346), mRNA.
ZNF364	Homo sapiens zinc finger protein 364 (ZNF364), mRNA.
ZNF417	Homo sapiens zinc finger protein 417 (ZNF417), mRNA.
ZNF431	Homo sapiens zinc finger protein 431 (ZNF431), mRNA.
ZNF493	Homo sapiens zinc finger protein 493 (ZNF493), transcript variant 3, mRNA.
ZNF500	Homo sapiens zinc finger protein 500 (ZNF500), mRNA.
ZNF512B	Homo sapiens zinc finger protein 512B (ZNF512B), mRNA.
ZNF514	Homo sapiens zinc finger protein 514 (ZNF514), mRNA.
ZNF514	Homo sapiens zinc finger protein 514 (ZNF514), mRNA.
ZNF517	Homo sapiens zinc finger protein 517 (ZNF517), mRNA.
ZNF529	Homo sapiens zinc finger protein 529 (ZNF529), mRNA.
ZNF552	Homo sapiens zinc finger protein 552 (ZNF552), mRNA.
ZNF562	Homo sapiens zinc finger protein 562 (ZNF562), mRNA.
ZNF565	Homo sapiens zinc finger protein 565 (ZNF565), mRNA.
ZNF573	Homo sapiens zinc finger protein 573 (ZNF573), mRNA.
ZNF587	Homo sapiens zinc finger protein 587 (ZNF587), mRNA.
ZNF589	Homo sapiens zinc finger protein 589 (ZNF589), mRNA.
ZNF594	Homo sapiens zinc finger protein 594 (ZNF594), mRNA.
ZNF621	Homo sapiens zinc finger protein 621 (ZNF621), transcript variant 2, mRNA.
ZNF623	Homo sapiens zinc finger protein 623 (ZNF623), mRNA.
ZNF703	Homo sapiens zinc finger protein 703 (ZNF703), mRNA.
ZNF708	Homo sapiens zinc finger protein 708 (ZNF708), mRNA.
ZNF711	Homo sapiens zinc finger protein 711 (ZNF711), mRNA.
ZNF786	Homo sapiens zinc finger protein 786 (ZNF786), mRNA.
ZNF789	Homo sapiens zinc finger protein 789 (ZNF789), transcript variant 2, mRNA.
ZNF791	Homo sapiens zinc finger protein 791 (ZNF791), mRNA.
ZRANB1	Homo sapiens zinc finger, RAN-binding domain containing 1 (ZRANB1), mRNA.
ZSWIM1	Homo sapiens zinc finger, SWIM-type containing 1 (ZSWIM1), mRNA.
ZSWIM6	PREDICTED: Homo sapiens zinc finger, SWIM-type containing 6 (ZSWIM6), mRNA.
ZYG11B	Homo sapiens zyg-11 homolog B (C. elegans) (ZYG11B), mRNA.

Tableau II : Liste des ARNm associés à la fois avec Stau1 en prométaphase et avec le fuseau mitotique (Blower M. et al 2007).

Gene symbol	Gene title
ABCA2	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2
ACADVL	acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain
AKT2	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2
ANKFY1	ankyrin repeat and FYVE domain containing 1
ANKRD9	ankyrin repeat domain 9
ASCC3	activating signal cointegrator 1 complex subunit 3
ATAD3B	ATPase family, AAA domain containing 3B
ATPBD1B	ATP binding domain 1 family, member B
BAI2	brain-specific angiogenesis inhibitor 2
C17ORF75	chromosome 17 open reading frame 75
C20ORF117	chromosome 20 open reading frame 117
C8ORF30A	chromosome 8 open reading frame 30A
C9ORF167	chromosome 9 open reading frame 167
CC2D1B	coiled-coil and C2 domain containing 1B
CLPB	ClpB caseinolytic peptidase B homolog (E. coli)
CRIPAK	cysteine-rich PAK1 inhibitor
DDB1	damage-specific DNA binding protein 1, 127kDa
DHX9	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 9
DJ222E13.2	similar to CGI-96
FAM129B	family with sequence similarity 129, member B
FANCC	Fanconi anemia, complementation group C
FLCN	folliculin
FOXK1	forkhead box K1
FZD7	frizzled homolog 7 (Drosophila)
GAS1	growth arrest-specific 1
HLTF	helicase-like transcription factor
IRS2	insulin receptor substrate 2
KIAA1618	KIAA1618
KIAA1967	KIAA1967
LACTB	lactamase, beta
LOC149448	hypothetical protein LOC149448
LOC286208	hypothetical protein LOC286208
LRRC47	leucine rich repeat containing 47
MCM7	minichromosome maintenance complex component 7
MEGF8	multiple EGF-like-domains 8
MFHAS1	malignant fibrous histiocytoma amplified sequence 1

MGAT4B	mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, B
MKLN1	muskelin 1, intracellular mediator containing kelch motifs
MXD4	MAX dimerization protein 4
NDRG3	NDRG family member 3
NFATC2IP	nuclear factor of activated T-cells, calcineurin-dependent 2 interacting protein
NOL9	nucleolar protein 9
PATZ1	POZ (BTB) and AT hook containing zinc finger 1
PDDC1	Parkinson disease 7 domain containing 1
POLH	polymerase (DNA directed), eta
POLR1B	polymerase (RNA) I polypeptide B, 128kDa
POLR3H	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide H (22.9kD)
PRKDC	protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide
PWWP2	PWWP domain containing 2
QTRT1	queuine tRNA-ribosyltransferase 1 (tRNA-guanine transglycosylase)
RNF213	ring finger protein 213
RXRA	retinoid X receptor, alpha
SARM1	sterile alpha and TIR motif containing 1
SNAPC1	small nuclear RNA activating complex, polypeptide 1, 43kDa
SON	SON DNA binding protein
SPG7	spastic paraplegia 7 (pure and complicated autosomal recessive)
TALDO1	transaldolase 1
TARBP1	Tar (HIV-1) RNA binding protein 1
TATDN3	TatD DNase domain containing 3
TELO2	TEL2, telomere maintenance 2, homolog (S. cerevisiae)
TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain
TRIM35	tripartite motif-containing 35
TRIM56	tripartite motif-containing 56
TRIM65	tripartite motif-containing 65
TYSND1	trypsin domain containing 1
UGCGL1	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 1
WDR35	WD repeat domain 35
WDR73	WD repeat domain 73
WDR81	WD repeat domain 81
YTHDC2	YTH domain containing 2
ZNF512B	zinc finger protein 512B
ZSWIM6	zinc finger, SWIM-type containing 6

Tableau III: ARNm associés à Stau1 en prométaphase qui codent pour des protéines avec des fonctions connues en mitose.

Functions related to G₂ and mitosis	Gene symbols	References
G₂ checkpoint	Cdc14B, MRE11A	(3, 5)
Mitotic regulators	Cdc14B, CHFR, Lin54, RASSF1, SON	(2, 14, 15, 27, 29, 31, 33)
Chromosome architecture, chromosome condensation and genomic stability	FANCD2, NCAPG2, RB1, USP9X	(7, 9, 21, 23, 24, 32)
Spindle assembly and regulation	JUB, RCC1, TNPO1, TPPP, VHL	(1, 11, 12, 17, 18, 30)
Kinetochores and microtubules-chromosomes attachments	Clasp2, CSNK1A1, NUP43, SPC24, SEH1L, WRNIP1	(4, 16, 22, 25, 35)
Cytokinesis and nucleus reassembly	AHCTF1(ELYS), ARL3, LBR, RCC1, VHL	(11, 20, 26, 28, 34)
APC/C substrates	RASSF1, RRM2, USP1, USP37, VHL	(6, 8, 10, 13, 19)

1. Abe, Y., M. Ohsugi, K. Haraguchi, J. Fujimoto, and T. Yamamoto. 2006. LATS2-Ajuba complex regulates gamma-tubulin recruitment to centrosomes and spindle organization during mitosis. *FEBS Lett* 580:782-788.
2. Ahn, E. Y., R. C. DeKolver, M. C. Lo, T. A. Nguyen, S. Matsuura, A. Boyapati, S. Pandit, X. D. Fu, and D. E. Zhang. 2011. SON controls cell-cycle progression by coordinated regulation of RNA splicing. *Mol Cell* 42:185-198.

3. Bassermann, F., D. Frescas, D. Guardavaccaro, L. Busino, A. Peschiaroli, and M. Pagano. 2008. The Cdc14B-Cdh1-Plk1 axis controls the G2 DNA-damage-response checkpoint. *Cell* 134:256-267.
4. Brockman, J. L., S. D. Gross, M. R. Sussman, and R. A. Anderson. 1992. Cell cycle-dependent localization of casein kinase I to mitotic spindles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9454-9458.
5. Carson, C. T., R. A. Schwartz, T. H. Stracker, C. E. Lilley, D. V. Lee, and M. D. Weitzman. 2003. The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint. *Embo J* 22:6610-6620.
6. Chabes, A. L., C. M. Pfleger, M. W. Kirschner, and L. Thelander. 2003. Mouse ribonucleotide reductase R2 protein: a new target for anaphase-promoting complex-Cdh1-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3925-3929.
7. Chan, K. L., T. Palmai-Pallag, S. Ying, and I. D. Hickson. 2009. Replication stress induces sister-chromatid bridging at fragile site loci in mitosis. *Nat Cell Biol* 11:753-760.
8. Chow, C., N. Wong, M. Pagano, S. W. Lun, K. I. Nakayama, K. Nakayama, and K. W. Lo. 2012. Regulation of APC/CCdc20 activity by RASSF1A-APC/CCdc20 circuitry. *Oncogene* 31:1975-1987.
9. Coschi, C. H., A. L. Martens, K. Ritchie, S. M. Francis, S. Chakrabarti, N. G. Berube, and F. A. Dick. 2010. Mitotic chromosome condensation mediated by the retinoblastoma protein is tumor-suppressive. *Genes Dev* 24:1351-1363.
10. Cotto-Rios, X. M., M. J. Jones, L. Busino, M. Pagano, and T. T. Huang. 2011. APC/CCdh1-dependent proteolysis of USP1 regulates the response to UV-mediated DNA damage. *J Cell Biol* 194:177-186.
11. Hetzer, M., O. J. Gruss, and I. W. Mattaj. 2002. The Ran GTPase as a marker of chromosome position in spindle formation and nuclear envelope assembly. *Nat Cell Biol* 4:E177-184.
12. Hirota, T., N. Kunitoku, T. Sasayama, T. Marumoto, D. Zhang, M. Nitta, K. Hatakeyama, and H. Saya. 2003. Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell* 114:585-598.
13. Huang, X., M. K. Summers, V. Pham, J. R. Lill, J. Liu, G. Lee, D. S. Kirkpatrick, P. K. Jackson, G. Fang, and V. M. Dixit. 2011. Deubiquitinase USP37 is activated by CDK2 to antagonize APC(CDH1) and promote S phase entry. *Mol Cell* 42:511-523.
14. Huen, M. S., S. M. Sy, K. M. Leung, Y. P. Ching, G. L. Tipoe, C. Man, S. Dong, and J. Chen. 2010. SON is a spliceosome-associated factor required for mitotic progression. *Cell Cycle* 9:2679-2685.
15. Kang, D., J. Chen, J. Wong, and G. Fang. 2002. The checkpoint protein Chfr is a ligase that ubiquitinates Plk1 and inhibits Cdc2 at the G2 to M transition. *J Cell Biol* 156:249-259.
16. Kaur, S., T. E. White, A. L. DiGuilio, and J. S. Glavy. 2010. The discovery of a Werner Helicase Interacting Protein (WHIP) association with the nuclear pore complex. *Cell Cycle* 9:3106-3111.

17. Lau, C. K., V. A. Delmar, R. C. Chan, Q. Phung, C. Bernis, B. Fichtman, B. A. Rasala, and D. J. Forbes. 2009. Transportin regulates major mitotic assembly events: from spindle to nuclear pore assembly. *Mol Biol Cell* 20:4043-4058.
18. Lehotzky, A., L. Tirian, N. Tokesi, P. Lenart, B. Szabo, J. Kovacs, and J. Ovadi. 2004. Dynamic targeting of microtubules by TPPP/p25 affects cell survival. *J Cell Sci* 117:6249-6259.
19. Liu, W., H. Xin, D. T. Eckert, J. A. Brown, and J. R. Gnarra. 2011. Hypoxia and cell cycle regulation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Oncogene* 30:21-31.
20. Lu, X., Y. Shi, Q. Lu, Y. Ma, J. Luo, Q. Wang, J. Ji, Q. Jiang, and C. Zhang. 2010. Requirement for lamin B receptor and its regulation by importin β and phosphorylation in nuclear envelope assembly during mitotic exit. *J Biol Chem* 285:33281-33293.
21. Manning, A. L., M. S. Longworth, and N. J. Dyson. 2010. Loss of pRB causes centromere dysfunction and chromosomal instability. *Genes Dev* 24:1364-1376.
22. McClelland, M. L., M. J. Kallio, G. A. Barrett-Wilt, C. A. Kestner, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, G. J. Gorbsky, and P. T. Stukenberg. 2004. The vertebrate Ndc80 complex contains Spc24 and Spc25 homologs, which are required to establish and maintain kinetochore-microtubule attachment. *Curr Biol* 14:131-137.
23. Naim, V., and F. Rosselli. 2009. The FANCD1 pathway and BLM collaborate during mitosis to prevent micro-nucleation and chromosome abnormalities. *Nat Cell Biol* 11:761-768.
24. Ono, T., A. Losada, M. Hirano, M. P. Myers, A. F. Neuwald, and T. Hirano. 2003. Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells. *Cell* 115:109-121.
25. Pereira, A. L., A. J. Pereira, A. R. Maia, K. Drabek, C. L. Sayas, P. J. Hergert, M. Lince-Faria, I. Matos, C. Duque, T. Stepanova, C. L. Rieder, W. C. Earnshaw, N. Galjart, and H. Maiato. 2006. Mammalian CLASP1 and CLASP2 cooperate to ensure mitotic fidelity by regulating spindle and kinetochore function. *Mol Biol Cell* 17:4526-4542.
26. Rasala, B. A., A. V. Orjalo, Z. Shen, S. Briggs, and D. J. Forbes. 2006. ELYS is a dual nucleoporin/kinetochore protein required for nuclear pore assembly and proper cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:17801-17806.
27. Schmit, F., M. Korenjak, M. Mannefeld, K. Schmitt, C. Franke, B. von Eyss, S. Gargica, F. Hanel, A. Brehm, and S. Gaubatz. 2007. LINC, a human complex that is related to pRB-containing complexes in invertebrates regulates the expression of G2/M genes. *Cell Cycle* 6:1903-1913.
28. Sinha, S., G. Mondal, E. J. Hwang, W. Han da, S. K. Dutta, S. Iyer, S. A. Karumanchi, K. I. Kim, F. J. Couch, and D. Mukhopadhyay. 2011. Von Hippel-Lindau gene product directs cytokinesis: a new tumor suppressor function. *J Cell Sci* 124:2132-2142.
29. Song, M. S., S. J. Song, N. G. Ayad, J. S. Chang, J. H. Lee, H. K. Hong, H. Lee, N. Choi, J. Kim, H. Kim, J. W. Kim, E. J. Choi, M. W. Kirschner, and D. S. Lim. 2004.

- The tumour suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-Cdc20 complex. *Nat Cell Biol* 6:129-137.
30. Thoma, C. R., A. Toso, K. L. Gutbrodt, S. P. Reggi, I. J. Frew, P. Schraml, A. Hergovich, H. Moch, P. Meraldi, and W. Krek. 2009. VHL loss causes spindle misorientation and chromosome instability. *Nat Cell Biol* 11:994-1001.
 31. Tumurbaatar, I., O. Cizmecioglu, I. Hoffmann, I. Grummt, and R. Voit. 2011. Human Cdc14B promotes progression through mitosis by dephosphorylating Cdc25 and regulating Cdk1/cyclin B activity. *PLoS One* 6:e14711.
 32. Vong, Q. P., K. Cao, H. Y. Li, P. A. Iglesias, and Y. Zheng. 2005. Chromosome alignment and segregation regulated by ubiquitination of survivin. *Science* 310:1499-1504.
 33. Yu, X., K. Minter-Dykhouse, L. Malureanu, W. M. Zhao, D. Zhang, C. J. Merkle, I. M. Ward, H. Saya, G. Fang, J. van Deursen, and J. Chen. 2005. Chfr is required for tumor suppression and Aurora A regulation. *Nat Genet* 37:401-406.
 34. Zhou, C., L. Cunningham, A. I. Marcus, Y. Li, and R. A. Kahn. 2006. Arl2 and Arl3 regulate different microtubule-dependent processes. *Mol Biol Cell* 17:2476-2487.
 35. Zuccolo, M., A. Alves, V. Galy, S. Bolhy, E. Formstecher, V. Racine, J. B. Sibarita, T. Fukagawa, R. Shiekhattar, T. Yen, and V. Doye. 2007. The human Nup107-160 nuclear pore subcomplex contributes to proper kinetochore functions. *Embo J* 26:1853-1864.