



HAL
open science

Mécanismes moléculaires de la régulation et de la dérégulation de l'épissage alternatif de Tau et cTNT dans la Dystrophie Myotonique de Type 1

Dana Ghanem

► **To cite this version:**

Dana Ghanem. Mécanismes moléculaires de la régulation et de la dérégulation de l'épissage alternatif de Tau et cTNT dans la Dystrophie Myotonique de Type 1. Biochimie [q-bio.BM]. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2009. Français. NNT: . tel-00430481

HAL Id: tel-00430481

<https://theses.hal.science/tel-00430481>

Submitted on 7 Nov 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DROIT ET SANTE DE LILLE 2
Ecole Doctorale Biologie-Santé

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

Spécialité : Biochimie et Biologie Moléculaire

Présentée par

Dana GHANEM LE DIZÈS

**MECANISMES MOLECULAIRES DE LA REGULATION ET DE LA
DEREGULATION DE L'EPISSAGE ALTERNATIF DE TAU ET cTNT
DANS LA DYSTROPHIE MYOTONIQUE DE TYPE 1**

Soutenue le 29 Septembre 2009 devant le jury composé de :

**Rapporteurs : Mme le Docteur G.Gourdon
Mr le Professeur D. Champion**

**Examineurs : Mme le Docteur I. Behm-Ansmant
Mme le Docteur MC. Chartier-Harlin
Mr le Docteur N. Sergeant**

Directeur de thèse : Mme le Docteur ML. Caillet-Boudin

Liste des abréviations

APP : Amyloid Precursor Protein
CBD : Dégénérescence corticobasale
CELF : CUGBP and ETR-3 Like Factor
CIC-1: Canal chlore muscle spécifique de type 1
cTNT : Troponine T cardiaque
CUGBP: CUG Binding Protein
DM1 et 2 : Dystrophie Myotonique de type 1 et 2
DMPK : Dystrophia Myotonica Protein Kinase
DMWD : Dystrophia Myotonica-containing WD repeat motif
DNF: Dégénérescence Neurofibrillaire
ELAV: Embryonic Lethal Abnormal Vision
ESE : Exonic Splicing Enhancer
ESS : Exonic Splicing Silencer
ETR-3: ELAV Type RNA binding protein 3
FTDP-17: Fronto-Temporal Dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17
IR: Récepteur à l'insuline
ISE: Intronic Splicing Enhancer
ISM: Intronic Splicing Modulator
ISS: Intronic Splicing Silencer
KO: Knock Out
KSRP: KH-type Splicing Regulatory Protein
MAP: Microtubule Associated Protein
Mbnl: Muscleblind
MSE: Muscle specific Enhancer
MTMR1: Myotubularin-Related 1
NMDA R1: N-méthyl-D-aspartate récepteur de type 1
PB : point de branchement
PSP : Paralyse Supranucléaire Progressive
PTB : Polypyrimidine Tract Binding protein
RRM : RNA Recognition Motif
SMN 1et 2 : Survival of Motor Neurons 1 et 2
snRNA: Small nuclear ribonucleic acid
snRNP : Small nuclear ribo-nucleoprotein
TNNT3: Troponine T du muscle squelettique
U2AF: U2 Auxiliary Factor

INTRODUCTION5

I. L'ÉPISSAGE ALTERNATIF ET SA REGULATION : UN MECANISME COMPLEXE REGULE EN CIS ET EN TRANS.....	5
A) L'épissage alternatif.....	5
A.1) Définition	5
A.2) Rôles	6
A.3) Mécanismes de l'épissage alternatif	8
A.3.1) <i>Le processus de l'épissage : deux réactions de trans-estérification</i>	8
A.3.2) <i>Les étapes successives de l'épissage assurées par la machinerie du Splicéosome</i>	10
A.3.3) <i>Les différents types d'épissage</i>	12
B) Régulation en cis de l'épissage alternatif	14
B.1) Les éléments cis régulateurs	14
B.1.1) <i>Les éléments cis activateurs d'épissage : les « enhancers »</i>	16
B.1.2) <i>Les éléments cis répresseurs d'épissage : les « Silencers »</i>	17
B.2) Importance de la taille de l'exon et de l'intron	18
B.2.1) <i>Importance de la taille de l'exon</i>	18
B.2.2) <i>Importance de la taille de l'intron</i>	18
B.3) Rôle de la structure de l'ARN	19
B.4) Influence de la transcription	20
C) Régulation de l'épissage alternatif par les facteurs trans régulateurs.....	21
C.1) Les « facteurs d'épissage » ubiquitaires	22
C.1.1) <i>Les protéines SR</i>	22
C.1.2) <i>Les protéines hnRNPs</i>	24
C.2) Les « facteurs régulateurs » à profil d'expression tissu-spécifique.....	26
C.2.1) <i>La famille CELF</i>	26
C.2.2) <i>La famille Mbnl</i>	29
C.2.3) D'autres facteurs	31
C.3) Régulation des facteurs trans régulateurs d'épissage	33
II. LA DYSTROPHIE MYOTONIQUE DE TYPE 1 : UNE PATHOLOGIE CARACTERISEE PAR DES DEREGULATIONS INDIRECTES DE L'ÉPISSAGE ALTERNATIF.....	34
A) Une maladie genetique avec un phenotype multy-systemique	34
A.1) Les formes de DM1	36
A.2) La mutation DM 1: Une expansion instable de triplets non traduits à transmission autosomique dominante	36
A.3) Une Corrélacion génotype / phénotype	39
B) Mécanismes de pathogenicité de la DMPK mutée	40
B.1) Des effets en cis	40
B.1.1) <i>Haplo-insuffisance de la DMPK</i>	40
B.1.2) <i>Effet cis sur les gènes environnants</i>	41
B.2) Des effets en trans	42
B.2.1) <i>Rôle crucial des CTG dans la physiopathologie de la DM1</i>	42
B.2.2) <i>L'effet trans-dominant des CTG sur l'épissage alternatif</i>	43
B.2.3) <i>L'effet trans-dominant des CTG sur l'expression de gènes</i>	46
C) Implication des facteurs d'épissage des familles Muscleblind et CELF dans l'effet trans-dominant des expansions de CTG	47
C.1) Implication du facteur d'épissage Mbnl1	47
C.1.1) <i>Mbnl1 entre dans la constitution des foci</i>	48

C.1.2) <i>Le facteur Mbnl1 régule l'épissage alternatif de plusieurs transcrits altérés dans la DM1</i>	48
C.1.3) <i>La perte de fonction de Mbnl1 reproduit plusieurs phénotypes de la DM1</i>	49
C.2) Implication des facteurs de la famille CELF	50
C.2.1) <i>Implication de CUGBP1</i>	50
C.2.1.1) <i>Le facteur CUGBP1 régule l'épissage alternatif de plusieurs transcrits altérés dans la DM1</i>	50
C.2.1.2) <i>La surexpression de CUGBP1 reproduit plusieurs phénotypes de la DM1</i>	51
C.2.2) <i>Implication du facteur ETR-3</i>	51
III. TAU ET CTNT : DEUX TRANSCRITS A L'ÉPISSAGE ALTERNATIF ALTERÉ DANS DEUX TISSUS	
ATTEINTS PAR LA DM1	52
A) Tau.....	53
A.1) <i>Le gène, les isoformes et les protéines.</i>	53
A.2) <i>Épissage alternatif de Tau et dégénérescence neurofibrillaire</i>	56
A.3) <i>Régulation et dérégulation de l'épissage alternatif de Tau dans la DM1</i>	59
B) <i>La Troponine T cardiaque (cTNT)</i>	66
B.1) <i>Le gène, les isoformes et les protéines.</i>	67
B.2) <i>Régulation et dérégulation de l'épissage alternatif de cTNT dans la DM1</i>	67
OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	71
MATÉRIELS ET MÉTHODES	73
A) Culture cellulaire	73
A.1) <i>Lignées cellulaires</i>	73
A.2) <i>Entretien des lignées</i>	73
A.3) <i>Différenciation neuronale</i>	73
B) Transfections	74
B.1) <i>Les vecteurs plasmidiques</i>	74
B.1.1) <i>Les minigènes</i>	74
B.1.2) <i>Les expansions de triplets</i>	76
B.1.3) <i>Les facteurs d'épissage</i>	76
B.2) <i>Les transfections</i>	76
B.3) <i>Extraction des ARN totaux</i>	76
B.4) <i>RT-PCR semi quantitative</i>	77
B.5) <i>Analyse des produits amplifiés</i>	77
RESULTATS	79
I. PHÉNOTYPE D'ÉPISSAGE FŒTAL DE TAU ET EFFET TRANS-DOMINANT DES EXPANSIONS DE TRIPLETS CTG	79
II. RÉGULATION ET DÉRÉGULATION DE L'ÉPISSAGE ALTERNATIF DE L'EXON 2 DE TAU PAR LES EXPANSIONS DE TRIPLETS CTG	102
A) <i>A la recherche d'éléments cis régulateurs, cibles de l'effet des expansions de triplets CTG.</i> ...	102
B) <i>effet du facteur régulateur ETR-3 sur l'exon 2 de Tau: quelles sont les régions introniques impliquées?</i>	107

III. REGULATION ET DEREGULATION DE L'ÉPISSAGE ALTERNATIF DE L'EXON 5 DE CTNT PAR LES EXPANSIONS DE TRIPLETS CTG	108
A) Détermination des régions introniques minimales nécessaires à la régulation de l'épissage alternatif et à l'effet trans-dominant des CTG	109
B) Recherche des éléments cis régulateurs d'épissage, cibles de l'effet des expansions de triplets CTG	110
C) Identification des sites de fixation du facteur Mbnl1 sur cTNT: étude de leur implication dans l'épissage alternatif et dans l'effet trans-dominant des CTG	115
C.1) Recherches des régions introniques impliquées dans l'effet du facteur Mbnl1 sur l'épissage alternatif de l'exon 5 de cTNT	115
C.2) Détermination des sites fonctionnels de fixation du facteur d'épissage Mbnl1 sur le transcrit de cTNT par l'utilisation de minigènes mutés	117
 RESULTATS COMPLEMENTAIRES	121
Epissage alternatif de tau et différenciation neuronale	121
 DISCUSSION	123
A) Quel mécanisme moléculaire responsable du profil d'épissage foetal de Tau dans la Dystrophie Myotonique de type 1 ?	123
B) Régulation de l'épissage alternatif de l'exon 2 de Tau	124
B.1) L'exclusion de l'exon 2 passe par l'action de plusieurs « silencers » introniques	124
B.2) Corrélation entre les séquences cibles de l'effet trans-dominant et le facteur d'épissage ETR-3 ?	126
C) Régulation de l'épissage alternatif de l'exon 5 du transcrit de cTNT	127
C.1) L'épissage alternatif de l'exon 5 de cTNT fait intervenir plusieurs « enhanceurs » et un « silencer » introniques	127
C.2) Rôle de Mbnl1 dans la régulation de l'épissage alternatif de l'exon 5 de cTNT	129
C.3) L'effet trans-dominant sur l'épissage alternatif de l'exon 5 de cTNT implique un élément « enhancer » qui contient un site Mbnl1	130
 CONCLUSION	132
 PERSPECTIVES	134
 BIBLIOGRAPHIE	135

Introduction

I. L'épissage alternatif et sa régulation: un mécanisme complexe régulé en cis et en trans

A) L'épissage alternatif

A.1) Définition

La plupart des gènes eucaryotes sont constitués d'exons et d'introns. L'épissage fait partie des processus de maturation de l'ARN. Il correspond à l'excision des introns du transcrit primaire puis à la jonction des exons. Avant qu'un ARN puisse être transporté en dehors du noyau pour être traduit, il doit être coiffé au niveau de son extrémité 5', épissé de ses introns et modifié au niveau de son extrémité 3' par un clivage et l'ajout d'une queue Poly(A). L'épissage est dit constitutif lorsqu'un exon est systématiquement inséré dans le transcrit mature. A l'inverse, on parle d'épissage alternatif quand un exon peut être soit inclus soit exclu de l'ARN mature. Ainsi, à partir d'un seul gène, l'épissage alternatif permet de produire plusieurs ARNm qui pourraient alors être traduits en diverses protéines avec des propriétés et des fonctions bien distinctes (Figure 1). Ce processus est un grand contributeur à la diversité du protéome et fournit une part d'explication au différentiel entre le nombre de gènes et celui des protéines. En effet, l'épissage alternatif constitue un mode particulier et supplémentaire de régulation de l'expression des gènes (Li et al., 2007).

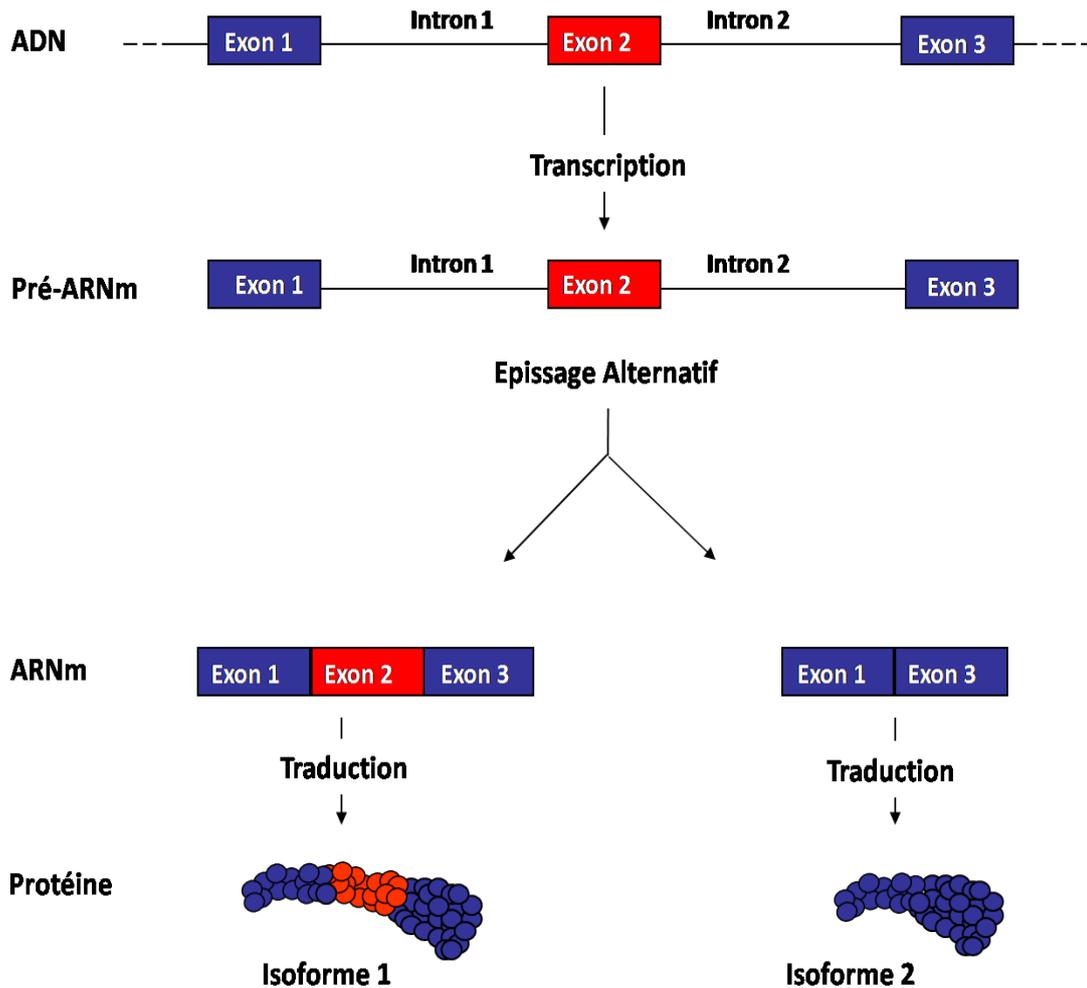


Figure 1: Epissage d'un transcrit primaire contenant un exon alternatif. Les rectangles représentent les exons et les traits les introns. L'exon alternatif est en rouge. Il est entouré par deux exons constitutifs en bleu. L'ARN messager est obtenu après excision des introns du transcrit primaire (pré-ARNm). Le processus d'épissage alternatif permet d'obtenir des isoformes protéiques différentes grâce à l'inclusion ou l'exclusion de l'exon alternatif.

A.2) Rôles

A sa découverte, l'épissage alternatif était considéré comme un événement rare touchant plusieurs transcrits impliqués dans la détermination du sexe chez la *Drosophile*. Aujourd'hui, avec la découverte de plus en plus importante de transcrits soumis à ce type d'épissage chez l'homme (60%), l'épissage alternatif se voit impliqué dans plusieurs processus cellulaires fondamentaux (Black, 2003).

- **Implication dans l'apoptose** : L'épissage alternatif semble jouer un rôle crucial dans la régulation de la mort cellulaire programmée. Les transcrits des nombreux gènes impliqués dans l'apoptose sont sujets à l'épissage alternatif afin de produire des isoformes pro- ou anti-apoptotiques (Schwerck and Schulze-Osthoff, 2005). C'est ainsi que l'apoptose induite par la voie des céramides est accompagnée par un changement de l'épissage alternatif de l'adaptateur apoptotique Bcl-X et de l'enzyme caspase 9 des isoformes anti-apoptotiques vers des isoformes pro-apoptotiques (Chalfant et al., 2002, Massiello et al., 2004).

- **Implication dans le cycle cellulaire**: Certaines études chez la levure montrent une corrélation entre la progression du cycle cellulaire et le changement de l'épissage alternatif, bien qu'un lien direct reste ici toujours à démontrer (Burns et al., 2002). D'autres études d'épissage *in vitro* présentent une corrélation entre l'entrée en phase en M et la répression de l'épissage (Shin and Manley, 2002). Par ailleurs, certaines protéines régulatrices de l'entrée en phase M, telle que la CDC5L, sont même soupçonnées d'être des facteurs régulateurs d'épissage (Boudrez et al., 2000, Boudrez et al., 2002).

- **Implication dans la différenciation** : L'exemple phare illustrant l'implication de l'épissage alternatif dans la différenciation est celui médié par les facteurs d'épissage Polypyrimidine Tract Binding protein (PTB) et son paralogue neuronal (nPTB) (Coutinho-Mansfield et al., 2007). Lors du développement du système nerveux central, PTB devient sous exprimé au profit de nPTB pour induire un changement dans le profil d'épissage de plusieurs transcrits et provoquer alors la différenciation terminale des neurones (Makeyev et al., 2007). Ces facteurs sont également impliqués dans la différenciation musculaire (Boutz et al., 2006).

- **Implication dans d'autres processus**: Dans le système nerveux, terrain privilégié de l'épissage alternatif, la croissance des neurites et la synaptogenèse sont deux événements qui font appel à ce processus (Li et al., 2007). Son implication dans la réponse au stress est aussi bien connue (Biamonti and Caceres, 2009).

Impliqué dans une multitude de processus cellulaires fondamentaux, l'épissage alternatif est régulé d'après le tissu et le stade de développement (Celotto and Graveley, 2001, Black, 2003). Il est également en lien direct avec les signaux extracellulaires afin de permettre une adaptation rapide de la cellule à son environnement et ceci notamment au niveau du

système nerveux (Shin and Manley, 2004, Li et al., 2007). L'épissage alternatif est considéré aujourd'hui comme un mode de régulation de l'expression de gènes.

A.3) Mécanismes de l'épissage alternatif

Les différents processus de maturation de l'ARN (l'ajout de la coiffe, épissage et clivage /polyadénylation) sont orchestrés autour de la transcription. A travers son domaine carboxy-terminal (CTD), l'ARN polymérase II (Pol II) exerce une influence sur l'ensemble de ces processus. Il a été montré que le CTD était nécessaire à un déroulement efficace de l'ensemble de ces processus (Cho et al., 1997, McCracken et al., 1997a, Morris and Greenleaf, 2000, Chabot et al., 1995, Vincent et al., 1996, Mortillaro et al., 1996, Kim et al. 1997, Hirose et al., 1999, Fresco and Buratowski, 1996). Bien qu'ils soient interconnectés et qu'ils exercent une influence les uns sur les autres, ces différents processus de maturation de l'ARN sont assurés par des machineries différentes (Colot et al. 1996, Gilmartin et al. 1988, Cooke and Alwine 1996, Neugebauer and Roth, 1997, McCracken et al., 1997b, Vagner et al., 2000). L'ajout de la coiffe en 5' du transcrit se fait ainsi grâce à des enzymes à activité phosphatase, guanylyl et methyl transferase et grâce au complexe CBC (Cap Binding Complex). Le clivage en 3' est, lui, assuré par plusieurs facteurs: le CPSF (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor), le CstF (Cleavage Stimulatory Factors) et les CF I et II (Cleavage Factor I et II). Après le clivage intervient un complexe composé d'au moins 6 facteurs pour l'ajout de la queue Poly(A). Quant à l'épissage, il est assuré par l'une des machineries moléculaires les plus complexes de la cellule, le spliceosome.

A.3.1) Le processus de l'épissage: deux réactions de *trans*-estérification

La réaction d'épissage se déroule en deux étapes successives, impliquant chacune une réaction de trans-estérification. Quatre éléments sont nécessaires à ces réactions : les sites 5' et 3' d'épissage, respectivement appelés « site donneur » et « site accepteur », situés en 5' et 3' de l'intron à la jonction exon/intron ; le troisième élément est le site de branchement, situé en amont du site 3' accepteur (à une distance de 20-40 nucléotides) ; et, enfin, le quatrième élément, qui correspond à la séquence polypyrimidine située entre

le point de branchement et le site 3' d'épissage. Les sites 5' et 3' d'épissage, ainsi que le site de branchement, sont définis par des séquences très courtes qui, à l'exception de quelques nucléotides consensus, sont relativement dégénérées (Figure 2). La littérature nous apprend que ces sites d'épissage sont plus dégénérés dans le cas des exons alternatifs en comparaison avec les exons constitutifs (Stamm et al., 1994, Carmel et al., 2004, Sorek et al., 2004, Lear et al., 1990). Ceci impliquerait une reconnaissance moins efficace de l'exon alternatif, laissant la place à une régulation pour favoriser l'inclusion ou l'exclusion de l'exon.

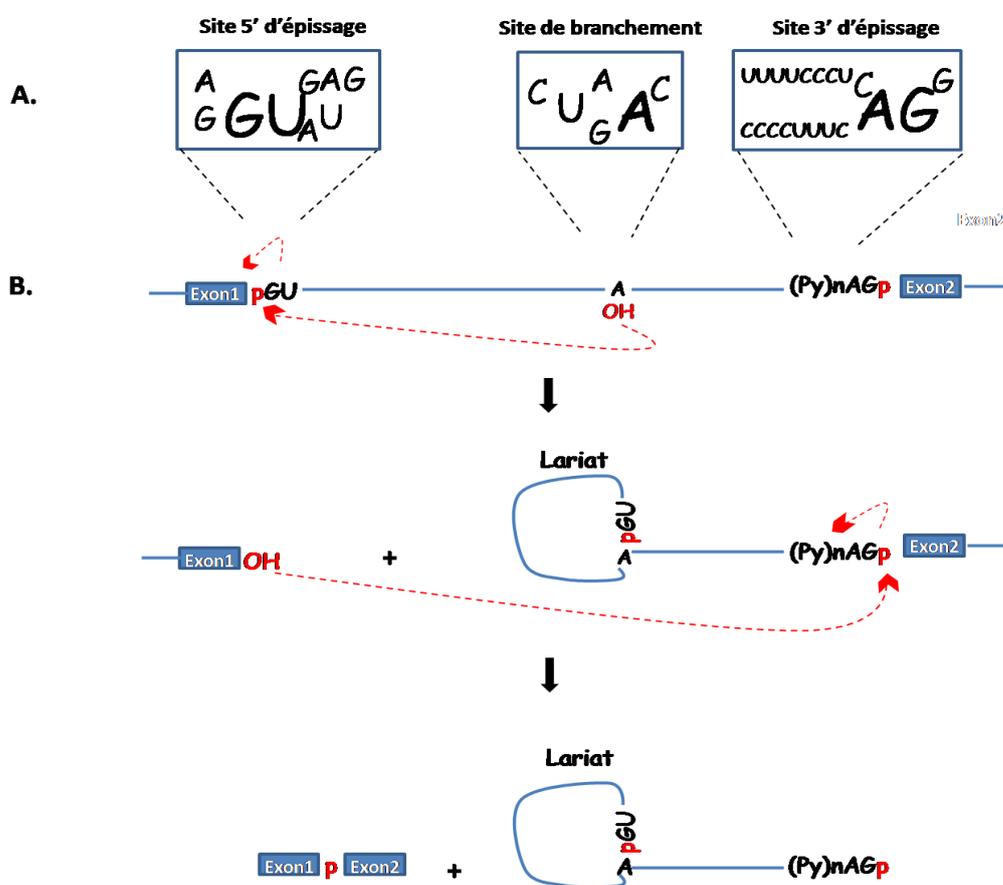


Figure 2: Le processus d'épissage se déroule en deux étapes successives. (A) Les sites 5' et 3' d'épissage ainsi que la séquence polypyrimidine sont indiqués. Les séquences nucléotidiques conservées au niveau de ces sites sont également indiquées. Il s'agit des nucléotides GU et AG, situés respectivement dans les sites 5' et 3' d'épissage, et du nucléotide A au niveau du site de branchement. (Py)n correspond à la séquence polypyrimidine. **(B)** Réaction d'excision d'épissage d'un ARN pré-messager. L'épissage d'un ARN pré-messager se déroule en deux étapes successives de trans-estérification. Trois éléments sont nécessaires à cette réaction, les sites 5' et 3' d'épissage et le site de branchement. (D'après Corcos et Solier, 2005)

Lors de la première étape, le groupement 2' hydroxyle de l'adénosine du site de branchement attaque le phosphate du site 5' donneur d'épissage. Cette réaction engendre un exon libre au niveau de l'extrémité 5' de l'intron et une structure intronique intermédiaire en lasso. Lors de la deuxième étape, le 3' hydroxyle de l'exon libre attaque le phosphate du site 3' d'épissage, produisant ainsi l'ARNm et un intron sous forme de lasso (Figure 2).

A.3.2) Les étapes successives de l'épissage assurées par la machinerie du spliceosome

La machinerie d'épissage, le spliceosome, est composée de plusieurs particules ribonucléoprotéiques appelées snRNP (small nuclear RibonucleoProteins) ainsi que de facteurs d'épissage non-snRNP. Il existe deux types de spliceosomes : le spliceosome majeur qui épisse les introns de type U2, et le spliceosome mineur qui, lui, épisse les introns rares de type U12 (Burge et al., 1998). Ici, nous allons nous intéresser uniquement au spliceosome majeur. L'étude des constituants de ce dernier a permis d'identifier 300 protéines, illustrant ainsi la complexité de cette machinerie (Rappsilber et al., 2002, Zhou et al., 2002). Dans le spliceosome majeur, responsable de l'épissage de la majorité des introns chez les métazoaires, il y en a 5 : U1, U2, U4/U6 et U5. Chaque snRNP est constituée d'un ARN (snRNA), d'un nombre variable de protéines spécifiques et, dans le cas des snRNP U1, U2, U4 et U5, de sept protéines Sm.

L'assemblage des complexes du spliceosome sur l'ARN pré-messager pour les réactions d'épissage se fait en plusieurs étapes successives (Wahl et al., 2009). Cet assemblage s'opère grâce à des interactions ARN/ARN, Protéines/ARN et Protéine/Protéine qui ont lieu au niveau des sites 5' et 3' d'épissage et du site de branchement (Reed, 2000). La première étape correspond à la liaison de la snRNP U1 avec le site donneur d'épissage. Cette liaison se fait par appariement de quelques nucléotides (4 à 7) entre le snRNA U1 et le site 5' donneur. La liaison est stabilisée par les protéines de la snRNP U1 ainsi que par d'autres protéines (Zhang and Rosbash, 1999, Puig et al., 1999). Lors de cette même étape, les protéines SF1/BBP et U2AF (U2 Auxiliary Factor 2) lient respectivement le point de branchement et la séquence polypyrimidine. Ici, U2AF, protéine composée de deux sous-

unités, aura sa sous-unité 65 (U2AF65), qui liera la protéine SF1/BBP, alors que sa sous-unité 35 (U2AF35) sera liée au site 3'd'épissage (Figure 3). Cet ensemble, qui met en exergue les 3 sites d'épissage, constitue le premier complexe du spliceosome: le complexe E.

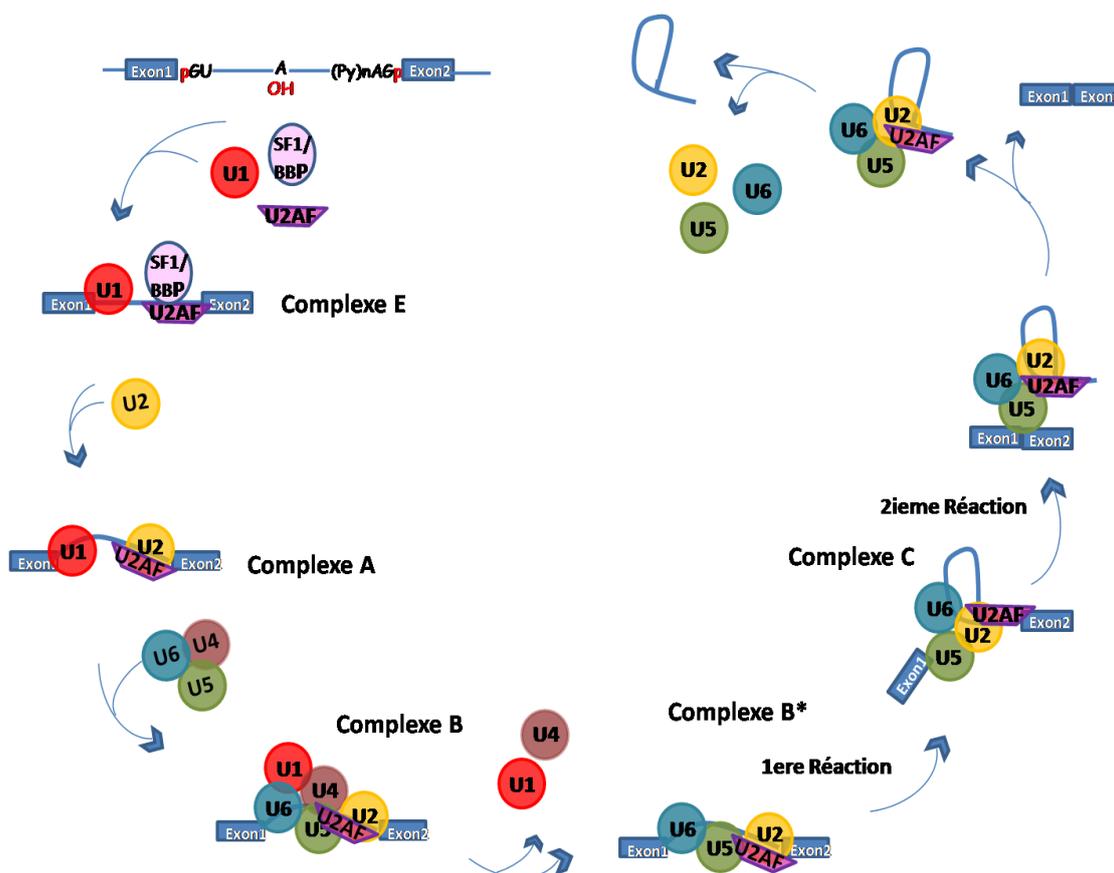


Figure 3: Assemblage des particules snRNP du spliceosome sur l'ARN pré-messager. La fixation de la snRNP U1, U2AF et SF1/BBP constitue le complexe E. La snRNP U2 rejoint ce complexe pour donner le complexe A, lui-même rejoint par les snRNP U4, U6 et U5 pour former le complexe B. Quand les snRNP U1 et U4 quittent ce complexe, il devient actif (complexe B*) pour procéder aux réactions d'épissage dans le complexe C. (D'après Wahl et al., 2009)

Lors de la deuxième étape de recrutement du spliceosome, la snRNP U2 lie le site de branchement et chasse la SF1/BBP par une réaction ATP dépendante pour former le complexe A. Ici aussi, l'appariement entre la snRNP U2 et l'ARN pré-messager est stabilisé par l'action de protéines (Gozani et al., 1996, Valcarcel et al., 1996). Suite à cette étape, les

snRNP U4/U6 et U5 sont recrutées ensemble pour former le complexe B. A ce stade, et bien que toutes les snRNP aient été recrutées sur l'ARN pré-messager, le complexe B demeure inactif, incapable d'accomplir les réactions de transestérification. Ce n'est que lorsque les snRNP U1 et U4 quittent le complexe que ce dernier subit un réarrangement conformationnel lui permettant de devenir catalytiquement actif. On parle alors d'un complexe B*. Suite à cela, le spliceosome effectue la première réaction de transestérification générant le complexe C, puis subit un autre réarrangement pour effectuer la deuxième (Konarska et al., 2006). Une fois les deux réactions opérées, le spliceosome se dissocie libérant l'ARN messager et les différents snRNP.

A.3.3) Les différents types d'épissage alternatif

L'épissage alternatif s'appuie sur l'utilisation de sites 5' donneurs et 3' accepteurs d'épissage. Les profils d'utilisation de ces sites donnent lieu à plusieurs types d'épissage:

- **Promoteurs alternatifs:** L'initiation de la transcription au niveau de promoteurs différents, dits alternatifs, donne lieu à différents ARN messagers (Figure 4, A).
- **Sites Poly-A alternatifs:** L'épissage peut également conduire à l'utilisation de sites de polyadénylation différents (Figure 4, B).
- **Sites 5'd'épissage alternatifs:** Par l'utilisation de différents sites 5' d'épissage, les exons peuvent être raccourcis ou rallongés en taille (Figure 4, C).
- **Sites 3'd'épissage alternatif:** De même, l'utilisation de sites 3' d'épissage alternatifs peut jouer sur la taille d'un exon (Figure 4, D).
- **Exon cassette:** C'est le cas le plus fréquemment rencontré. Quand un exon est bordé par des sites 5' et 3' alternatifs, on l'appelle exon cassette. Il peut être inclus ou exclu de l'ARN messager (Figure 4, E).
- **Exons mutuellement exclusifs:** Dans certains cas, un exon ne peut être inclus en même temps qu'un autre (Figure 4, F).

- **Rétention d'introns:** Parfois, l'intron peut ne pas être éliminé du transcrit mature. Dans ce cas, il fait partie de l'ARN messager qui est transporté au cytoplasme pour la traduction (Figure 4, G).

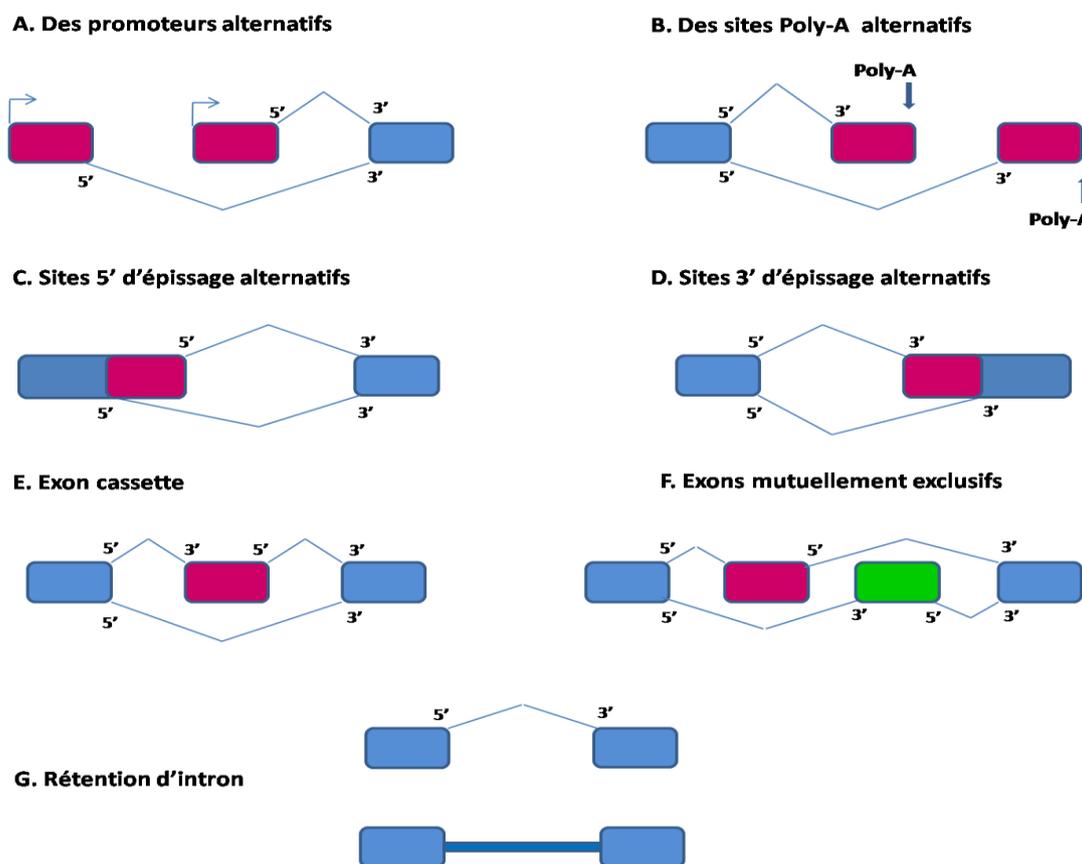


Figure 4: Les différents types d'épissage alternatif. Différents ARNm peuvent être produits par l'utilisation de promoteurs (A) ou de sites de polyadénylation alternatifs (B). L'épissage alternatif peut faire appel à deux sites 5' (C) ou 3' (D) alternatifs pour un même exon. Dans le cas d'exons cassettes (E), les deux sites d'épissage de l'exon sont alternatifs. Il existe des cas où un exon ne peut être inclus sans un autre (F). Dans d'autres cas, la région intronique est insérée dans le transcrit mature (G).

B) Régulation en *cis* de l'épissage alternatif

La réaction d'épissage par le complexe du spliceosome nécessite une reconnaissance des séquences consensus. L'efficacité de reconnaissance de ces séquences dépend de plusieurs paramètres: leur force (leur conformité avec la séquence consensus), la présence d'éléments *cis* régulateurs d'épissage auxiliaires, la taille de l'exon ou l'intron, ou encore, la présence de structures secondaires au niveau de l'ARN. De manière générale, un exon avec

une taille idéale (entre 50 et 300 nucléotides) avec des sites donneurs/accepteurs forts sera facilement reconnu par le spliceosome et, par conséquent, constitutivement inclus. A l'inverse, un exon de petite taille avec des sites donneurs/accepteurs faibles aura besoin de l'intervention d'éléments auxiliaires pour être inclus. Ce dernier cas est celui des exons alternatifs. Mais, en réalité, le schéma est un peu plus complexe. Les exons constitutifs utilisent aussi ces éléments pour assurer leur inclusion (Schaal and Maniatis, 1999, Mayeda et al., 1999, Fairbrother et al., 2002), et notamment ceux de petite taille (McCullough and Berget, 1997). Les éléments *cis* régulateurs d'épissage assurent également l'exclusion de « pseudo » exons, qui sont des leurres (Sironi et al., 2004). Dans le cas des exons alternatifs, ces éléments ont pour rôle d'assurer une « régulation » au sens strict du terme. Ainsi, les exons alternatifs les utilisent pour avoir une expression régulée, qui dépendra d'un type cellulaire, d'un tissu donné ou d'un moment précis durant le développement (Black, 2003).

B. 1) Les éléments *cis* régulateurs

Les éléments *cis* régulateurs, qui servent à la régulation de l'épissage alternatif, partagent des caractéristiques communes. Ils sont généralement petits et de séquences variables. Leur action peut être faible nécessitant leur présence en plusieurs copies et ils sont généralement conservés entre les espèces. Ils peuvent être exoniques ou introniques, localisés en amont ou en aval de l'exon régulé. Quand ces sites sont présents à une distance d'une centaine de nucléotides de l'exon, on considère qu'ils sont « proximaux », tandis que ceux présents à plus d'un kilobase de l'exon sont considérés comme « distaux ». Enfin, il faut préciser que les éléments *cis* régulateurs peuvent exercer un effet activateur ou inhibiteur, et cela en recrutant des facteurs *trans* régulateurs qui feront l'objet du prochain chapitre (Figure 5).

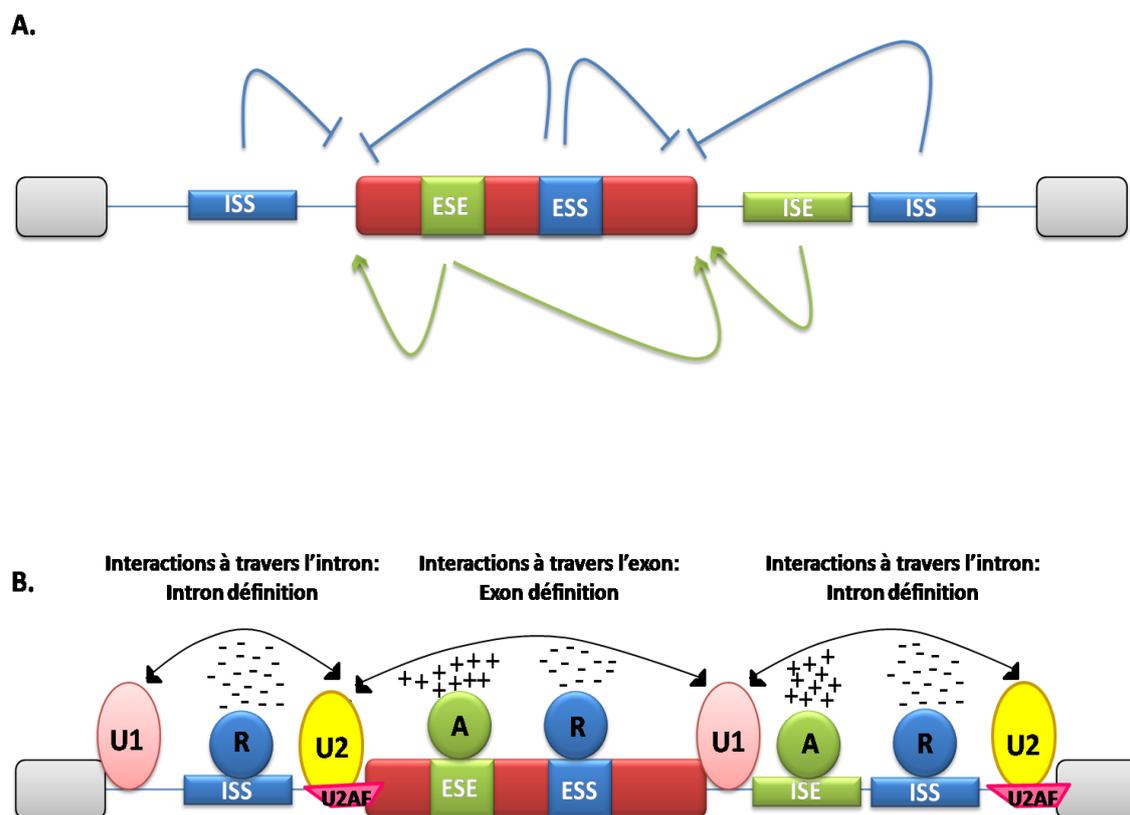


Figure 5 : Régulation de l'épissage alternatif par les éléments *cis* régulateurs. L'exon alternatif au centre (en rouge) est entouré par deux exons constitutifs (en gris). **(A)** Les éléments *cis* activateurs exoniques sont appelés Exonic Splicing Enhancers ou ESE (en vert), tandis que ceux qui sont répresseurs sont appelés Exonic Splicing Silencers ou ESS (en bleu). De même, des éléments *cis* peuvent être présents au niveau intronique et sont nommés Intronic Splicing Enhancers (ISE) pour les activateurs et Intronic Splicing Silencers (ISS) pour les inhibiteurs. Les actions activatrices ou inhibitrices de ces éléments *cis* sur les sites 5' et 3' d'épissage sont respectivement indiquées par des flèches ou des traits. **(B)** L'épissage d'un exon passe en premier lieu par sa reconnaissance grâce à la snRNP U1 qui aide à recruter U2AF à l'autre extrémité de l'exon. Ces interactions à travers l'exon font partie d'un processus appelé « Exon définition ». Une fois l'exon défini, le spliceosome cherche à identifier et à rapprocher les extrémités des introns environnants par un processus appelé « Intron définition ». Par le recrutement de facteurs activateurs (A) ou répresseurs (R), les éléments *cis* régulateurs exoniques ou introniques peuvent aider, ou entraver, ces deux processus. (D'après Maltin et al., 2005 ; Vincenzo, 2003)

B.1.1) Les éléments *cis* activateurs d'épissage : les «enhancers»

Quand les enhancers sont exoniques, on parle d'Exonic Splicing Enhancers (ESE). Quand ils sont introniques, on parle d'Intronic Splicing Enhancers (ISE). Ces éléments *cis* régulateurs interagissent avec des protéines qui favorisent le recrutement du complexe du spliceosome.

- **Les «enhancers» exoniques**

Les enhancers exoniques sont impliqués dans l'épissage aussi bien alternatif que constitutif (Schaal and Maniatis, 1999). Leur rôle dans l'inclusion des exons est d'autant plus important que les sites donneurs/accepteurs d'épissage sont faibles comme c'est le cas pour les exons alternatifs (Graveley et al., 2000). L'étude des ESE a permis d'élaborer des bases de données de séquences de façon à pouvoir prédire l'éventuel effet de mutations exoniques sur l'épissage (Pfarr et al., 2005, Fairbrother et al., 2002). Parmi les ESE les plus connus, on retrouve les séquences riches en Purines (PolyPurine Enhancers, PPE), qui contiennent parfois le motif (GAR) répété, où le R est une purine (Liu et al., 1998). Ces enhancers lient les protéines de type SR (voir chapitre suivant). D'autres ESE connus sont ceux riches en A/C appelées ACE (Coulter et al., 1997). Les séquences ACE lient la protéine cold box, YB-1 et impliquent la Dead Box RNA Hélicase, p72, pour promouvoir l'épissage par un mécanisme encore inconnu (Stickeler et al., 2001, Honig et al., 2002).

- **Les «enhancers» introniques**

Plusieurs enhancers introniques ont également été identifiés. L'un des plus connus est celui riche en uridines présent dans le gène *msl2* de la Drosophile (*male-specific-lethal-2*) et dans celui du *FGFR2* (*Fibroblast Growth Factor Receptor 2*) chez l'homme (Forch et al., 2001, Del Gatto-Konczak et al., 2000). Dans les deux cas, cet élément lie la protéine TIA-1, qui stimule la liaison de la snRNP U1 au site 5'd'épissage. D'autres enhancers introniques sont riches en U/G et UGUU et lient les protéines de la famille CELF (CUG-BP and ETR-3 Like Factors) dont le mode d'action sur l'épissage sera développé dans le chapitre suivant (Philips et al., 1998, Mori et al., 2008, Faustino et al., 2005). Un autre exemple est l'hexanucléotide UGCAUG, qui est un élément particulièrement enrichi dans un ensemble d'exons à expression neurone spécifique (Brundo et al., 2001). Cet élément peut être dupliqué plusieurs fois en aval de l'exon régulé avec certains éléments pouvant être présents à une distance de plus de 500 nucléotides de l'exon (Lim and Sharp, 1998). Il induit une forte augmentation d'inclusion de l'exon (Huh and Hynes, 1994, Modafferi and Black, 1997), mais la protéine responsable de son effet n'a pas encore été clairement identifiée.

B.1.2) Les éléments *cis* répresseurs d'épissage: les «silencers»

- **Les «silencers» exoniques**

Contrairement aux «enhancers», les séquences des «silencers» exoniques montrent peu de similitudes entre elles (Zheng, 2004). Ces éléments inhibent l'épissage soit en exerçant un effet antagoniste contre les éléments «enhancers» soit en interférant directement avec la machinerie d'épissage (Cartengi et al., 2002, Ladd and Cooper, 2002). Parmi les «silencers» exoniques identifiés, on trouve la séquence UGUGGG présente dans le gène de la β -tropomyosine et qui agit en fixant la protéine hnRNP H (Chen et al., 1999). Plusieurs méthodes ont permis d'identifier des ESS et ont montré la présence de sites de fixation des protéines hnRNP H ou A1 au sein de ces éléments (Wang et al., 2004, Sirioni et al., 2004).

- **Les «silencers» introniques**

Les «silencers» introniques les plus connus sont ceux qui contiennent des sites de fixation pour la protéine PTB (polypyrimidine tract binding protein). Cette protéine lie les motifs riches en pyrimidines tels que UUCU ou UUCUCU (Pérez et al., 1997, Ashiya and Grabowski, 1997). Ces motifs peuvent être localisés au sein de la séquence polypyrimidine, où ils empêchent la fixation de la protéine U2AF du spliceosome (Southby et al., 1999, Zhang et al., 1999, Lin and Patton, 1995, Singh et al., 1995). Les sites PTB peuvent être également localisés en dehors de la séquence polypyrimidine, en amont de l'exon, où ils sont présents en plusieurs copies afin d'exercer un effet inhibiteur sur l'épissage (Wagner and Garcia-Blanco, 2001, Chou et al., 2000, Wagner and Garcia-Blanco, 2002).

B. 2) Importance de la taille de l'exon et de l'intron

B.2.1) Importance de la taille de l'exon

Il existe une taille maximale et minimale d'exon pour un épissage optimal. Une taille idéale se situe entre 50 et 300 nucléotides. Des expériences *in vitro* montrent qu'une augmentation artificielle de la taille de l'exon au-delà de 300 nucléotides inhibe son épissage, et cela malgré la présence de sites donneurs / accepteurs forts (Robberson et al.,

1990). *In cellulo*, le décalage du site 3'd'épissage permettant l'augmentation de la taille de l'exon conduit à deux phénotypes possibles: la création de plusieurs petits exons par utilisation de sites cryptiques d'épissage, normalement silencieux, ou une exclusion de l'exon (Berget, 1995). Ceci prouve qu'il y a une taille maximale pour une insertion efficace de l'exon.

Une taille minimale est également nécessaire pour éviter des contraintes stériques au complexe du spliceosome (Black, 1991). *In cellulo*, un raccourcissement de la taille d'un exon en dessous de 50 nucléotides conduit à son exclusion (Dominski and Kole, 1991, Cooper 1998). Néanmoins, il existe plusieurs cas d'exons extrêmement petits, de 6 ou 7 nucléotides (Hawkins, 1988). Leur inclusion nécessite la présence de sites donneurs/accepteurs forts au niveau des exons adjacents ainsi que d'éléments *cis* régulateurs d'épissage (Sterner and Berget, 1993).

B.2.2) Importance de la taille de l'intron

Plusieurs observations attestent que l'épissage n'est pas indifférent à la taille des introns. Les introns longs peuvent freiner la réaction d'épissage en interférant avec le positionnement des complexes du spliceosome au niveau des sites donneurs/accepteurs. Ceci suggère que d'autres éléments sont nécessaires à l'épissage des introns longs. Une corrélation entre la force des sites donneurs/accepteurs d'épissage et la taille des introns existe chez le ver nématode (Fields, 1990) et la *Drosophile* (Weir and Rice, 2004). Cette corrélation est surtout vraie pour les exons alternatifs (Dewey et al., 2006). De plus, on a trouvé que les exons adjacents aux introns de grande taille étaient riches en éléments «enhancers» (Dewey et al. 2006). Tout ceci souligne la corrélation inverse entre la longueur des introns et l'insertion d'exons.

B.3) Rôle de la structure de l'ARN

L'ARN est capable de former des structures secondaires et tertiaires *in vitro* et *in vivo* (Conn and Draper, 1998, Charpentier and Rosbash, 1996, Solnick, 1985, Shen et al., 1999). L'altération de ces structures représente un mécanisme connu de régulation de la

maturation de l'ARN (Klauff et al., 1996). Dans le cas de l'épissage alternatif, on sait que l'association de certains facteurs d'épissage, tels que B25, SRp55, NOVA-1 et hnRNP A1, dépend de la structure de l'ARN cible en plus de sa séquence nucléotidique (Buckanovich and Darnell, 1997, Damgaard et al., 2002, Nagel et al., 1998, Shi et al., 1997). Les facteurs d'épissage peuvent également modifier activement la structure de l'ARN et ainsi réguler l'épissage. Tel est le cas de U2AF65, qui change la structure de l'ARN afin de rapprocher le site de branchement au site 3'd'épissage (Kent et al. 2003). La structure de l'ARN peut influencer l'épissage alternatif en agissant à plusieurs niveaux. Le cas le plus connu est celui où la structure cache les sites 5', 3' d'épissage ou encore le site de branchement conduisant à l'exclusion de l'exon (Goguel et al., 1993, Varani et al., 1999, Patterson et al., 2002, Estes et al., 1992). Il arrive également que la structure implique des éléments *cis* régulateurs. C'est le cas, par exemple, d'un ISE (Intronic Splicing Enhancer) qui présente une structure en tige et boucle nécessaire à son action sur l'exon 7 de *SMN 1* (*Survival Motor Neuron 1*) (Miyaso et al. 2003). Enfin, et dans un autre cas de figure, la structure peut agir sur la régulation sans agir sur des séquences d'épissage. Ici, le rôle de la structure peut être de rapprocher des sites d'épissage ou de régulation distants, afin qu'ils puissent exercer leur effet (Deshler and Rossi 1991, Nasim et al., 2002, Wagner and Garcia-Blanco, 2001).

B.4) Influence de la transcription

Le lien entre la transcription et l'épissage alternatif a largement été illustré et semble aujourd'hui évident (Proudfoot et al., 2002). Ces deux processus concomitants sont souvent fonctionnellement liés (Neugebauer, 2002). D'après un modèle donné, l'effet de la transcription sur l'épissage serait dû au rythme d'élongation de l'ARN polymérase II et à sa capacité à marquer des temps de pause. Un exemple dans la figure 6 illustre le mécanisme par lequel le rythme d'élongation pourrait affecter l'épissage alternatif. Cet effet sur l'épissage est dépendant de la séquence de l'ARN cible (Kornblihtt et al., 2004).

D'après un autre modèle, ce lien dépendrait du promoteur. Une telle idée est soutenue par le fait qu'un simple changement de promoteur d'un gène puisse changer son épissage alternatif (Cramer et al., 1997, Pagani et al., 2003). Dans ce cas, c'est l'architecture du promoteur qui modulerait l'épissage. Le cas de l'exon EDI du gène *Fibronectine* illustre bien

cet effet. En effet, le contrôle de ce gène par un autre promoteur change son épissage alternatif ainsi que sa réponse à des facteurs d'épissage connus pour agir sur lui (Cramer et al., 1997). Ici, il a bien été montré que cet effet du promoteur sur l'épissage n'était pas simplement dû à un taux de transcription différent mais qu'il dépendait des propriétés qualitatives du promoteur (Cramer et al., 1997). Des résultats similaires ont été obtenus avec des exons alternatifs des gènes *CD44*, *CGRP* (*Calcitonin Gene Related Product*), *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*) et *FGFR2* (*Fibroblast Growth Factor Receptor 2*) (Auboeuf et al., 2002, Pagani et al., 2003, Robson-Dixon and Garcia-Blanco, 2004). Ainsi, la régulation transcriptionnelle s'avère être également un moyen de régulation de l'épissage alternatif.

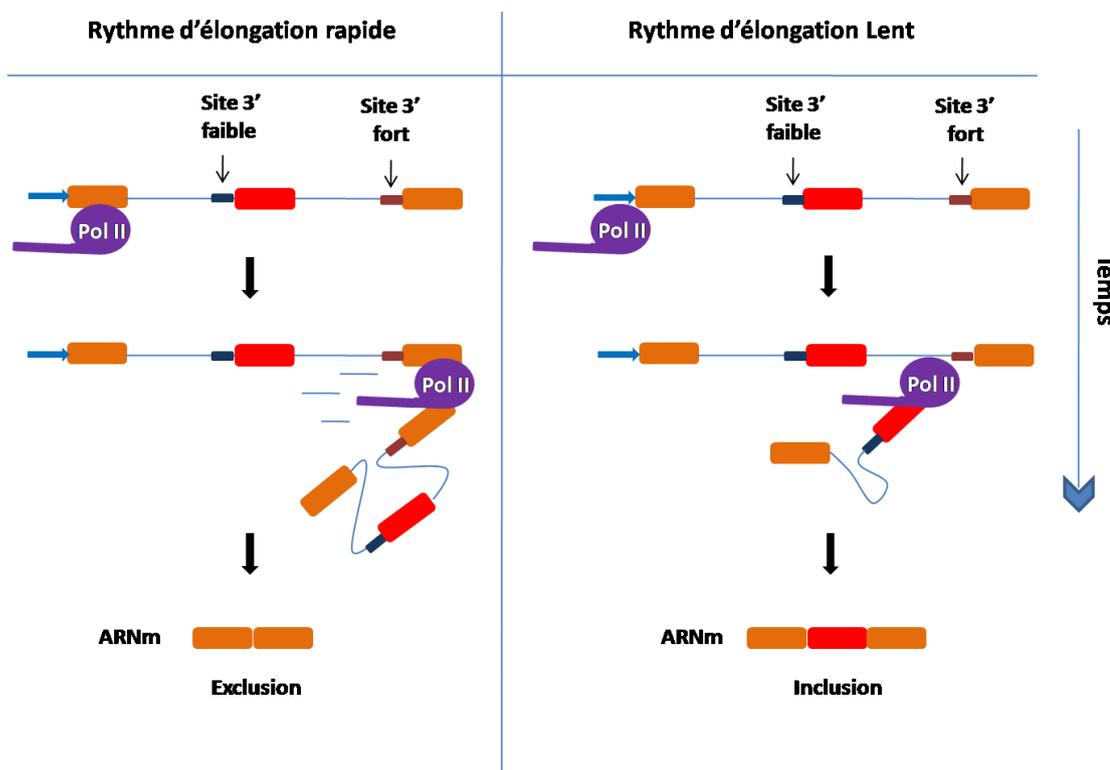


Figure 6: Influence du rythme d'élongation par l'ARN polymérase II sur l'épissage alternatif.

Quand le site 3'd'épissage de l'exon alternatif (en rouge) est plus faible que celui de l'exon en amont (en orange), un rythme d'élongation élevé met les deux sites en compétition et favorise l'exclusion de l'exon alternatif (A). A l'inverse, une élongation lente donne la possibilité au site 3' faible d'être reconnu et favorise ainsi l'inclusion (B). (D'après Kornblihtt et al., 2004)

C) Régulation de l'épissage alternatif par les facteurs *trans* régulateurs

Certains facteurs d'épissage peuvent être impliqués aussi bien dans l'épissage constitutif qu'alternatif. D'autres, par contre, ne sont impliqués que dans l'épissage alternatif et sont nommés « facteurs régulateurs ». Certains facteurs d'épissage sont ubiquitaires, tandis que d'autres, et notamment les facteurs régulateurs, sont tissus spécifiques ou encore régulés au cours du développement. Dans tous les cas, il s'agit d'actions pour empêcher l'inclusion d'exons ou la promouvoir. On parle alors respectivement de facteurs « répresseurs » et « activateurs ».

C.1) Les « facteurs d'épissage » ubiquitaires

C.1.1) Les protéines SR

Les protéines SR (Serin Arginin rich) constituent la famille la plus étudiée des facteurs d'épissage. Certains de ses membres sont impliqués aussi bien dans l'épissage constitutif qu'alternatif. D'autres membres sont considérés comme des facteurs régulateurs jouant des rôles spécifiques dans l'épissage alternatif (Long and Caceres, 2009). Cette famille comprend plus d'une vingtaine de membres, dont les protéines les plus connues sont SRp20, SRp30c, 9G8, SRp40, SRp55, SRp75, ASF/SF2 et SC35 (Zahler et al., 1992, Long and Caceres, 2009). Des études récentes tendent à montrer l'implication de plusieurs de ces protéines dans des processus autres que l'épissage, tels que la transcription (Lin et al., 2008, Fededa and Kornblihtt, 2008), la traduction (Sanford et al., 2004, Michlewski et al., 2008, Bedard et al., 2007, Swartz et al., 2007), le transport (Huang et al., 2003, Huang and Steitz, 2001) et la dégradation des ARN (Zhang and Krainer, 2004).

Les protéines SR contiennent un ou deux domaines de liaison à l'ARN de type RRM (RNA Recognition Motif) suivis par un domaine RS riche en dipeptides répétés Arginine/Sérine. Le domaine RRM permet la liaison de la protéine SR avec une séquence ARN spécifique (Chandler et al., 1997, Mayeda et al., 1999, Tacke and Manley, 1995, Zuo and Manley, 1994). Une fois la protéine liée à l'ARN, le domaine RS permet d'activer l'épissage (Graveley and Maniatis, 1998). Le domaine RS peut être phosphorylé et peut ainsi jouer sur l'activité

de la protéine. Certaines études, dans des levures ou *in vitro*, ont montré la capacité des protéines SR à interagir ensemble grâce à leur domaine RS et ont révélé l'importance de la phosphorylation dans ces interactions protéine/protéine (Xiao and Manley, 1998, Wu and Maniatis, 1993, Yeakley et al., 1999). Ceci suggère qu'*in vivo* les protéines SR agissent ensemble dans des complexes protéiques régulés par phosphorylation (Sacco-Bubulya and Spector, 2002, Sanford and Bruzik, 2001). Aujourd'hui, plusieurs familles de protéines kinases sont connues pour phosphoryler les protéines SR, telles que la SRPK (SR protein kinase), Clk/Sty ou encore la kinase Akt (Wang et al., 1998, Colwill et al., 1996, Patel et al., 2005).

Le plus souvent, les protéines SR agissent comme facteurs « activateurs » d'épissage et se lient donc à des éléments « enhancers » (Liu et al., 1998, Schaal and Maniatis, 1999, Liu et al., 2000, Staknis and Reed, 1994). Néanmoins, il existe plusieurs exceptions à la règle (Zhang and Wu, 1996, Cowper et al., 2001, Barnard et al., 2002). Le mode d'action des protéines SR sur l'épissage est essentiellement basé sur leur capacité à interagir avec les protéines du spliceosome. Plusieurs mécanismes sont proposés afin d'expliquer comment ces protéines agissent pour promouvoir l'épissage (Figure 7). Elles pourraient recruter et stabiliser les protéines du spliceosome au niveau des sites donneurs/accepteurs d'épissage (Figure 7A). Un autre mécanisme d'action consiste en un effet antagoniste contre des facteurs « répresseurs » d'épissage (Figure 7B). Les protéines SR peuvent également faciliter l'interaction entre les sites d'épissage grâce à des interactions protéine/protéine sans liaison directe à l'ARN (Figure 7C).

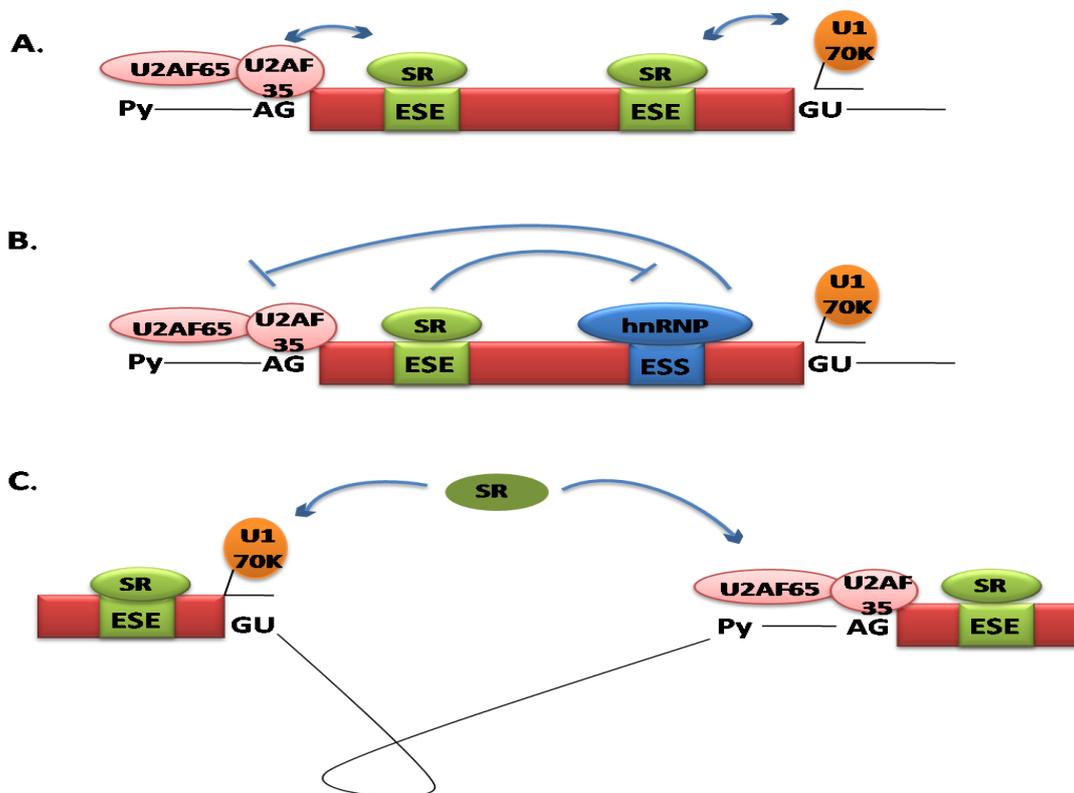


Figure 7: Mécanismes d'action des protéines SR pour la sélection des sites d'épissage. (A) Les protéines SR peuvent lier des éléments ESE et recruter les protéines du spliceosome U2AF35 et U1-70K au niveau du site 5' et 3' d'épissage. **(B)** Elles peuvent bloquer l'action des protéines hnRNP répresseurs d'épissage. **(C)** Ou encore, les SR peuvent faciliter l'interaction entre U1-70K et U2AF65 à travers l'intron grâce à des interactions protéine/protéine. (D'après Long et Caceres, 2009)

Ainsi, les protéines SR régulent l'épissage en interagissant avec l'ARN, entre elles et avec les protéines du spliceosome. Elles interviennent pour réguler l'épissage en tant que complexes protéiques.

C.I.2) Les protéines hnRNP

Les protéines hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) forment une famille de protéines très abondantes dans la cellule et structurellement variées. Elles ont initialement été décrites à travers leur capacité à lier les ARN fraîchement transcrits par l'ARN polymérase II et l'empaquetage de ces ARN (hnRNA) en particules riboprotéiques (Dreyfuss, 1986, Dreyfuss et al., 1988). Cette propriété est basée sur leur capacité à

interagir avec l'ARN de façon non spécifique sur des grandes zones allant au-delà de 500 nucléotides (Shahied-Milam et al., 1998, Soltaninassab et al., 1998). Cette famille comprend au moins une vingtaine de protéines et compte parmi ses membres hnRNPA1, B, C, F, G, H, K, et la hnRNP I aussi appelée PTB. Ces membres jouent des rôles variés, qui, au-delà de la régulation de l'épissage, peuvent s'étendre à la transcription (Du et al., 1998), à la maturation des extrémités 3' des ARNm (Bagga et al., 1998, Kessler et al., 1997) et à la traduction (Ostareck et al., 1997, Ostareck-Lederer et al., 1998, Ostareck and Ostareck-Lederer, 2004, Collier et al., 1998). L'une des protéines hnRNP la plus étudiée, la hnRNP A1, a même été décrite pour jouer un rôle dans la conservation de la longueur des télomères (Labranche et al., 1998, Dallaire et al., 2000).

L'implication de plusieurs hnRNP, et notamment les hnRnpA1 et hnRNP1/PTB, dans l'épissage alternatif a largement été établie (Mayeda et al., 1993, Caceres et al., 1994, Singh et al., 1995, Lin and Patton, 1995, Mayeda and Krainer, 1992, Yang et al., 1994). Leur implication dans l'épissage constitutif a seulement été suggérée. En effet, la déplétion en hnRNPC inhibe l'épissage *in vitro* suggérant un rôle dans l'épissage constitutif, rôle non démontré (Choi et al., 1986, Sierakowska et al., 1986).

Les hnRNP possèdent des domaines de liaison à l'ARN de type RRM (RNA Recognition Motif) ou KH (K-homology) ainsi que des domaines auxiliaires riches en certains acides aminés particuliers. Pour la hnRNPA1, par exemple, il s'agit de la glycine. Les domaines de liaison à l'ARN sont responsables de la liaison spécifique à l'ARN (Mayeda et al., 1998, Zu et al., 1998). Il a été suggéré que les domaines auxiliaires pouvaient jouer un rôle dans la modulation de l'affinité pour l'ARN ainsi que dans des interactions protéine/protéine. Cela a été vérifié dans le cas de la hnRNPA1 tout comme pour d'autres hnRNP (Dreyfuss et al., 1993, McAfee et al., 1996).

Généralement, les protéines hnRNPs sont considérées comme des facteurs « répresseurs » d'épissage (Caputi et al., 1999, chen et al., 1999, Zhu et al., 2001). En effet, des études *in vitro* montrent que les hnRNP entreraient en compétition avec les protéines du spliceosome et qu'elles seraient largement exclues des complexes ARN pre-messager/spliceosome (Reed et al., 1996). Plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer le mode d'action des protéines hnRNP dans leur rôle inhibiteur. Dans un premier modèle, elles lient des sites «silencers» conduisant à une accumulation de protéines hnRNP

le long de l'ARN masquant ainsi des sites «enhancers» (Figure 8A). Dans un deuxième modèle, ces protéines se fixent sur des sites de recrutement de protéines du spliceosome et les bloquent (Figure 8B). Enfin, un modèle de « looping out » a été proposé pour expliquer le mode d'action des hnRNP au niveau de séquences introniques (Figure 8C). Ici, les hnRNP lient les introns en amont et en aval d'un exon, interagissent entre elles et, conduisent à la formation d'une boucle qui amène à l'élimination de l'exon avec les parties introniques.

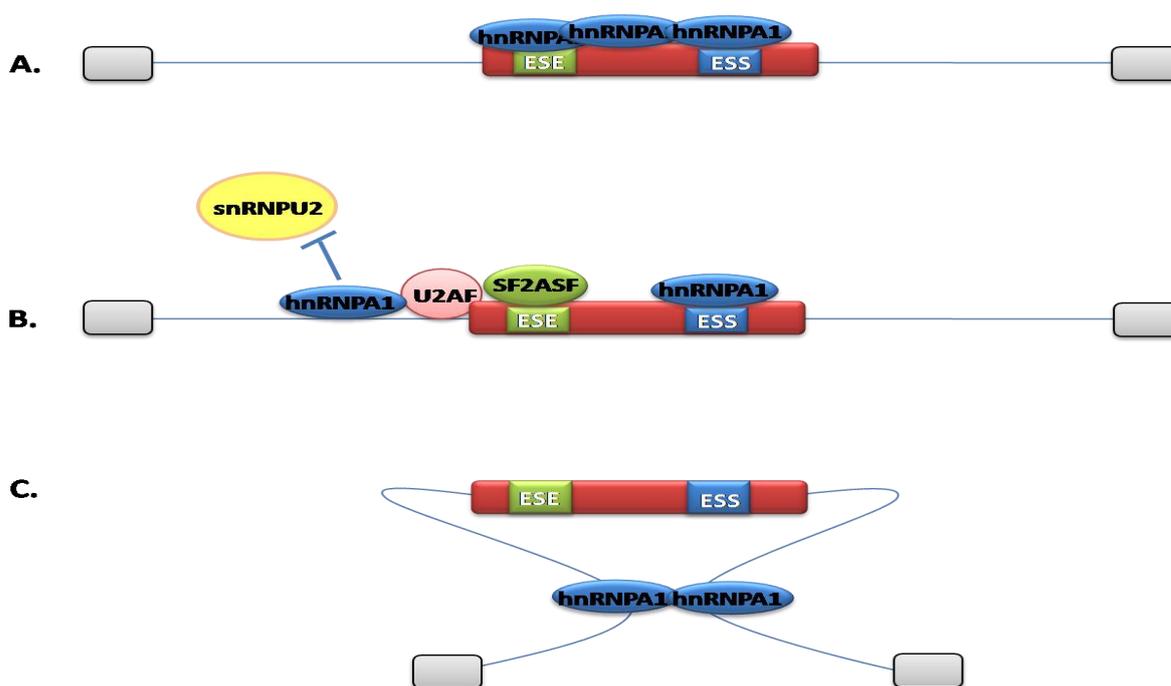


Figure 8: Mécanisme d'action des protéines hnRNP sur l'épissage alternatif. L'exemple de la hnRNP1 illustre ici le mode d'action des hnRNP pour la sélection des sites d'épissage. En (A), grâce à sa capacité d'agglomération, la hnRNP1 masque un site enhancer exonique. En (B), une protéine hnRNP1 masque le site 3' accepteur d'épissage. Enfin, le cas représenté en (C) montre comment l'interaction protéique entre les hnRNP1 peut conduire à l'élimination de l'exon alternatif avec l'intron excisé (modèle de « looping out »).

C.2) Les « facteurs régulateurs » à profil d'expression tissu-spécifique

C.2.1) La famille CELF

Les CELF (CUG-BP and ETR-3 Like Factors) constituent une famille de protéines relativement conservée (Lu et al., 1999, Ladd et al., 2001). Cette famille joue un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle des ARN. Initialement, elle était nommée BRUNOL (Bruno-Like) pour son homologie avec le régulateur de la traduction Bruno décrit chez la

Drosophile (Good et al., 2000). Les membres de la famille CELF sont des « facteurs régulateurs » de l'épissage alternatif (Ladd et al., 2004, Ladd et al., 2001, Philips et al., 1998), mais certains membres de cette famille étendent leur rôle dans la régulation de la traduction (Timchenko et al., 1999, Iakova et al., 2004, Mukhopadhyay et al., 2003), la déadénylation et la dégradation des ARN (Paillard et al., 2003, Vlasova and Bohjanen, 2008, Vlasova et al., 2008) ainsi que dans l'édition (Anant et al., 2001).

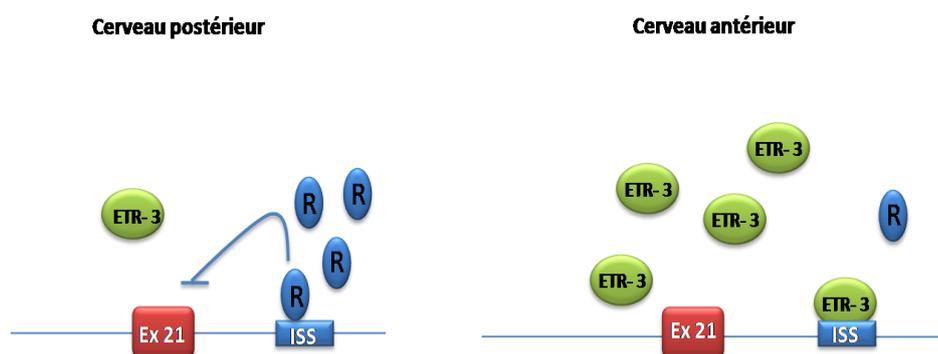
La famille CELF comprend 6 membres qui possèdent tous un équivalent chez la Drosophile: (1) CUGBP1 ou CUG-Binding Protein 1 aussi appelée BRUNOL2, (2) ETR-3 qui a comme autres noms BRUNOL3, CUGBP2 ou encore NAPOR, (3) CELF3 ou BRUNOL1, (4) CELF4 ou BRUNOL 4, (5) CELF5 ou BRUNOL5 et enfin (6) CELF6 ou BRUNOL6 (Ladd et al., 2001, Ladd et al., 2004). Les membres de cette famille présentent des fortes homologies de séquence. Ils sont caractérisés par la présence de trois domaines de liaison à l'ARN de type RRM (Good, 1995) avec deux d'entre eux présents côté N terminal suivis par un linker qui les sépare du troisième présent côté C terminal. La région qui sépare les RRM 2 et 3 est de séquence variable (Good et al., 2000, Ladd et al., 2001). Sa fonction exacte est inconnue, mais il est suggéré qu'elle soit impliquée dans l'épissage par des interactions protéine/protéine (Singh et al., 2004). En plus des homologies de séquences, les CELF partagent des propriétés fonctionnelles. En effet, CUGBP1 et ETR-3 sont connus pour lier des séquences CUG in vitro (Timchenko et al., a, 1996, Timchenko et al., b, 1996, Lu et al., 1999). En fait, les CELF lient spécifiquement les motifs riches en U/G (Philips et al., 1998, Savkur et al., 2001, Takahashi et al., 2000, Charlet-B et al., 2002a, Mori et al., 2008) et, en particulier, les motifs UGUU (Marquis et al., 2006, Faustino et al., 2005).

Les CELF se trouvent spécialement enrichis dans certains tissus, bien que leur expression ne soit pas exclusive à des tissus particuliers. Ici, CUGBP1 fait exception puisqu'elle est ubiquitaire. En plus du type de tissu, leur expression peut varier en fonction d'une région spécifique au sein d'un même tissu. C'est le cas, par exemple, de ETR-3 dans le cerveau, dont l'expression varie en fonction de la région cérébrale (Choi et al., 1998, Choi et al., 1999, Levers et al., 2002). L'expression des CELF varie aussi en fonction du stade du développement (Ladd et al., 2001, Kalsotra et al., 2008). C'est ainsi que ETR-3 régule l'épissage alternatif du récepteur au glutamate NMDAR1 (N-méthyl-D-aspartate) dans différentes régions du cerveau au cours du développement (Zhang et al., 2002). Ceci a pour

conséquence la production d'isoformes différentes avec des propriétés physiologiques et pharmacologiques distinctes (Zukin and Benett, 1995).

Quant à leur effet sur l'épissage, les CELF peuvent agir en tant que facteurs « activateurs » ou « répresseurs ». La figure 9 illustre deux modes d'action du facteur ETR-3 pour la régulation de l'épissage alternatif. Dans le cas de l'exon 21 de NMDAR1, ETR-3 joue un rôle activateur en entrant en compétition avec un facteur « répresseur ». Cette compétition est directe puisque ETR-3 se fixe sur le site du répresseur pour empêcher son action (Figure 9A) (Zhang et al., 2002). Dans d'autres cas, comme celui de la Troponine T cardiaque du poulet (cTNT), ETR-3 induit l'inclusion en activant un élément « enhancer » ce qui suppose un mécanisme d'action différent (Ladd et al., 2005, Charlet-B et al., 2002a). Ici, un mode d'action par compétition directe avec des facteurs répresseurs est exclu puisqu'il a été démontré que les sites de fixation de ETR-3 et des facteurs répresseurs étaient bien distincts (Charlet-B et al., 2002a, Ho et al., 2004). Dans le cas de cTNT, deux mécanismes d'action non exclusifs des CELF ont été suggérés: d'après le premier, les CELF forment un complexe activateur d'épissage qui aide au recrutement du spliceosome ; d'après le second, les CELF forment un complexe activateur, qui agirait en empêchant l'action d'un complexe répresseur (Ladd et al., 2005).

A. Mode d'action par compétition



B. Mode d'action non compétitif

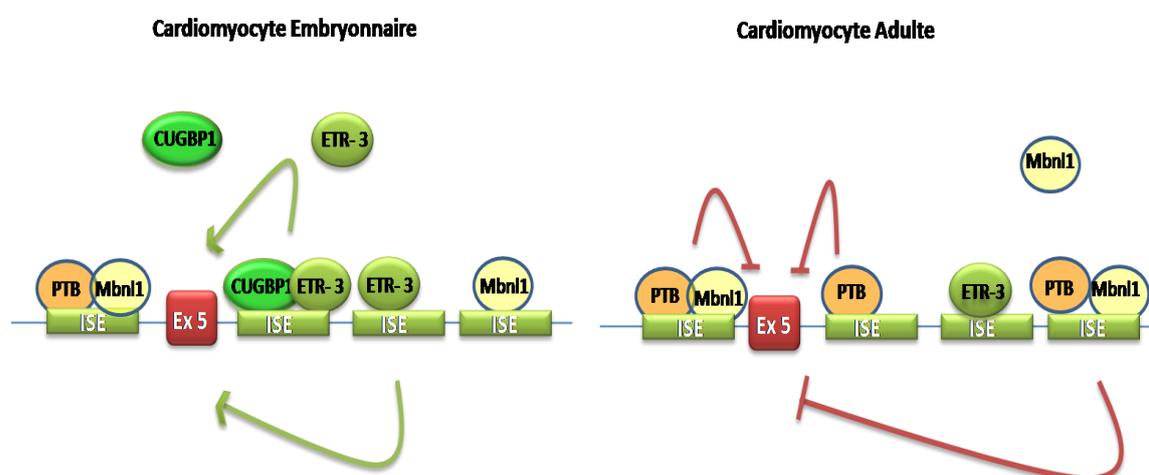


Figure 9: Mécanisme d'action du facteur ETR-3 sur l'épissage alternatif de l'exon 21 de NMDAR1 et l'exon 5 de la Troponine T cardiaque. (A) Dans le cerveau, l'expression de ETR-3 varie en fonction de région cérébrale. Dans le cerveau postérieur, un facteur répresseur inconnu (R) induit l'exclusion de l'exon 21 en se fixant sur l'élément «silencer». Dans le cerveau antérieur, ETR-3 est très exprimé et entre en compétition directe avec le facteur répresseur. Il lie le «silencer», empêche la fixation du répresseur et provoque ainsi l'inclusion de l'exon. **(B)** Dans le muscle cardiaque, le niveau d'expression des CELF varie en fonction du stade du développement. Au stade embryonnaire, ETR-3 et CUGBP1 induisent l'inclusion de l'exon5 de cTNT du poulet en formant un complexe activateur sur un élément «enhancer». Au stade adulte, l'expression des CELF diminue en faveur d'une augmentation d'expression des facteurs PTB et Mbnl1. Ces derniers contribuent à la formation d'un complexe répresseur et conduisent à l'exclusion de l'exon. (D'après Ladd et al. 2005)

Les mécanismes d'action des CELF sont encore à l'étude. Néanmoins, un aspect paraît clair aujourd'hui : l'effet des CELF sur l'épissage dépend de la localisation de leurs sites de liaison sur l'ARN. Dans les deux exemples présentés ici, les CELF se fixent au sein d'éléments «silencer» ou «enhancers». Mais ces deux éléments *cis* ont une caractéristique commune :

ils contiennent des séquences riches en U/G, motifs de fixation de protéines CELF (Charlet-B et al., 2002a, Zhang et al., 2002, Timchenko et al., 1996a, Lu et al., 1999, Ladd et al., 2001). En fonction de la localisation de ces motifs au sein des différents éléments *cis* régulateurs du transcrit, le mécanisme d'action serait donc différent.

C.2.2) La famille Mbnl

La famille Mbnl (Muscleblind-like protein) tient son nom de son rôle dans la différenciation terminale des muscles et des photorécepteurs chez la *Drosophile* (Begemann et al., 1997, Artero et al., 1998). Elle est composée de trois membres qui possèdent tous leur équivalent chez la *Drosophile* : MBNL1, MBNL2 et MBNL3. Ces trois protéines présentent des homologies de séquences (Fardaei et al., 2002). Comme les CELF, les facteurs Mbnl sont capables d'agir en tant qu'activateurs ou répresseurs (Pascual et al., 2006, Ho et al., 2004) et sont impliqués dans des fonctions autres que la régulation de l'épissage alternatif. Récemment, il a été montré que Mbnl2 était également impliqué dans la localisation des ARN (Adereth et al., 2005).

La famille Mbnl est conservée entre les espèces. En plus de chez l'homme, on la retrouve chez le ver (Wang et al., 2008), la mouche (Begemann et al., 1997), le poisson (Fernandes et al., 2007), le poulet (Huang et al., 2008) et la souris (Kanadia et al., 2003). L'étude des transcrits Mbnl a montré que Mbnl 1 était ubiquitaire alors que Mbnl2 et 3 étaient enrichis dans certains tissus (Fardaei et al., 2002). Cette expression varie au cours du développement et est corrélée à des changements dans l'épissage alternatif de plusieurs transcrits cibles (Kalsotra et al., 2008, Huang et al., 2008).

Les protéines Mbnl contiennent quatre motifs en doigts de zinc très conservés avec une région linker entre les doigts de zinc 2 et 3 (Fardaei et al., 2002, Squillace et al., 2002). Le premier et le troisième sont de type CX7CX6CX3H alors que les 2 et 4 sont de type CX7CX4CX3H (Fardaei et al., 2002, Squillace et al., 2002). Les quatre doigts de zinc présents au niveau de la région N terminale sont nécessaires à la liaison à l'ARN avec une importance moindre pour le quatrième (Kino et al., 2004). La région intermédiaire entre les doigts 2 et 3 est également nécessaire à cette liaison à l'ARN, probablement en jouant un rôle dans la structure de la protéine (Kino et al., 2004, Teplova and Patel, 2008). A l'inverse, la région C terminale ne contient pas de motifs de liaison à l'ARN et est responsable de

l'interaction avec d'autres protéines Mbnl (Yuan et al., 2007). Les protéines Mbnl lient les motifs CHHG et CHG répétés (le H est un A, C ou un U) (Miller et al., 2000, Kino et al., 2004) et les motifs YGCU(U/G)Y (où Y est un C ou un U) (Ho et al., 2004). Plusieurs études montrent qu'elles lient l'ARN double brin formant une structure en tige et boucle, avec la nécessité d'un mésappariement au niveau de la tige (Miller et al., 2000, Warf and Berglund, 2007).

Les mécanismes de régulation de l'épissage par les protéines Mbnl sont toujours à l'étude. Récemment, Warf et Berglund ont montré que Mbnl1 régule l'épissage de l'exon 5 de cTNT humain en stabilisant une structure en tige et boucle en amont de l'exon 5 (Figure 10). Lié à cette structure, Mbnl empêcherait la reconnaissance du site 3' accepteur d'épissage par le spliceosome et conduirait ainsi à l'exclusion de l'exon 5 (Warf and Berglund, 2007). Un mécanisme similaire a également été décrit pour la régulation de l'exon F de la troponine T du muscle squelettique (Yuan et al., 2007). Aujourd'hui, il est proposé que l'action de Mbnl sur l'épissage passe par sa capacité à stabiliser des structures secondaires. D'après ce mode de régulation, Mbnl séquestrerait des éléments «silencers» ou «enhancers» conduisant respectivement à un effet activateur ou répresseur sur l'épissage (Warf and Berglund, 2007, Yuan et al., 2007, Teplova and Patel, 2008).

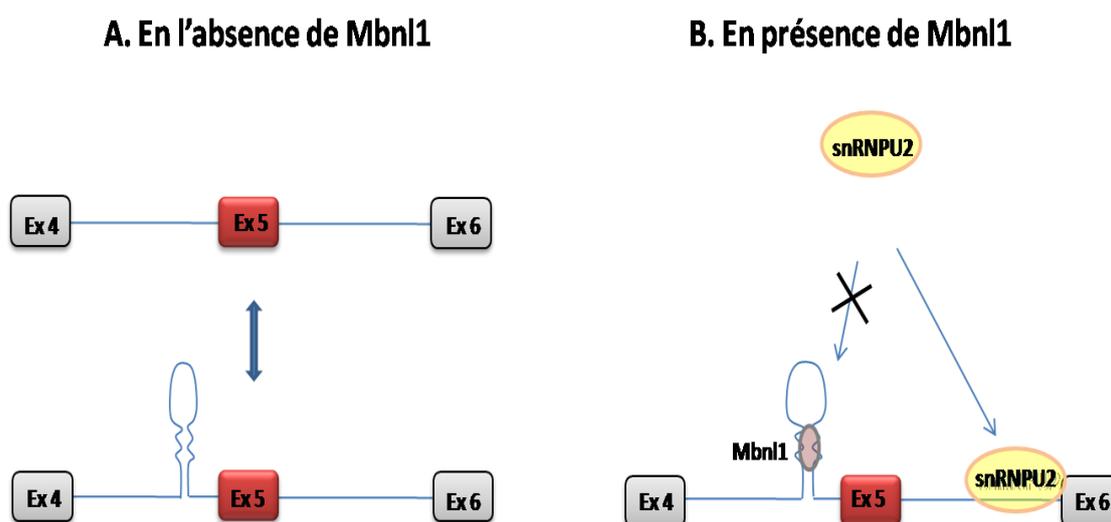


Figure 10: Régulation de l'épissage alternatif de cTNT humain par Mbnl1. (A) En absence de Mbnl, une structure instable en tige et boucle est présente dans l'intron 4 de cTNT. (B) En présence de Mbnl cette structure est stabilisée empêchant l'utilisation du site 3'd'épissage par U2snRNP du spliceosome. (D'après Warf et Berglund, 2007)

C.2.3) D'autres facteurs

Avec le développement actuel de la recherche sur l'épissage alternatif et sa régulation, les familles de facteurs régulateurs ne cessent d'émerger. C'est le cas de la famille Hu, homologue de la famille ELAV de facteurs régulateurs d'épissage chez la Drosophile (Lisbin et al., 2001, Soller and White 2003). Les protéines Hu sont surtout connues pour leur rôle dans la différenciation neuronale (Wakamatsu and Weston, 1997, Akamatsu et al., 1999). Quant à leur rôle comme facteurs régulateurs d'épissage, ce n'est que récemment qu'il a été suggéré (Zhu et al., 2006, Izquierdo, 2008).

On ne peut décrire toutes les familles de facteurs régulateurs d'épissage ici, mais on en développera une brièvement pour ce qu'elle apporte à la compréhension de la régulation de l'épissage alternatif. Il s'agit de la famille Nova. Constituée de deux membres (Nova 1 et 2), cette famille est la première décrite avec une distribution tissu spécifique. En effet, les facteurs Nova sont presque exclusivement exprimés dans les neurones du système nerveux central (Buckanovich et al., 1993, Jensen et al., 2000). Les Nova contiennent 3 domaines de liaison à l'ARN de type KH (K-Homology). La disposition des domaines KH au niveau des protéines Nova les place dans une famille qui contient les protéines α CP (alpha globin mRNA stability complex proteins) et la hnRNP K (Musunuru, 2003). Comme les autres facteurs d'épissage décrits ici, les Nova possèdent aussi plusieurs fonctions. Elles sont impliquées dans la stabilisation des ARN ainsi que dans la traduction (Ostareck et al. 2004). Elles lient les motifs YCAY répétés où Y est une pyrimidine (Jensen et al., 2000, Lewis et al., 2000, Dredge et al., 2005, Dredge and Darnell, 2003). Une analyse globale des motifs YACAY sur le génome par l'équipe de Robert Darnell a permis de révéler un lien entre la localisation de ces motifs sur l'ARN et l'effet des Nova sur l'épissage. Par plusieurs approches expérimentales, cette équipe a constitué une « carte » qui prédit l'action « activateur » ou « répresseur » de Nova d'après la localisation de ses motifs YACY sur le transcrit (Figure 11A) (Ule et al., 2006). Quand le motif Nova est à proximité des sites 5' ou 3' d'épissage de l'exon alternatif, que ça soit au niveau exonique ou intronique, Nova agit comme « répresseur » en inhibant la fixation des snRNP U1 ou U2 et des protéines SR (Figure 11B). Au contraire, quand Nova est fixée loin des sites donneurs ou accepteurs de l'exon alternatif, elle agit comme « activateur » en recrutant les protéines du spliceosome

(Figure 11C). Enfin, la présence de deux sites Nova sur un transcrite, l'un en aval de l'exon alternatif et l'autre en amont d'un exon constitutif, peut conduire par interaction entre les protéines Nova à un rapprochement entre les sites 5' et 3' d'épissage et ainsi favoriser l'inclusion de l'exon alternatif (Figure 11D).

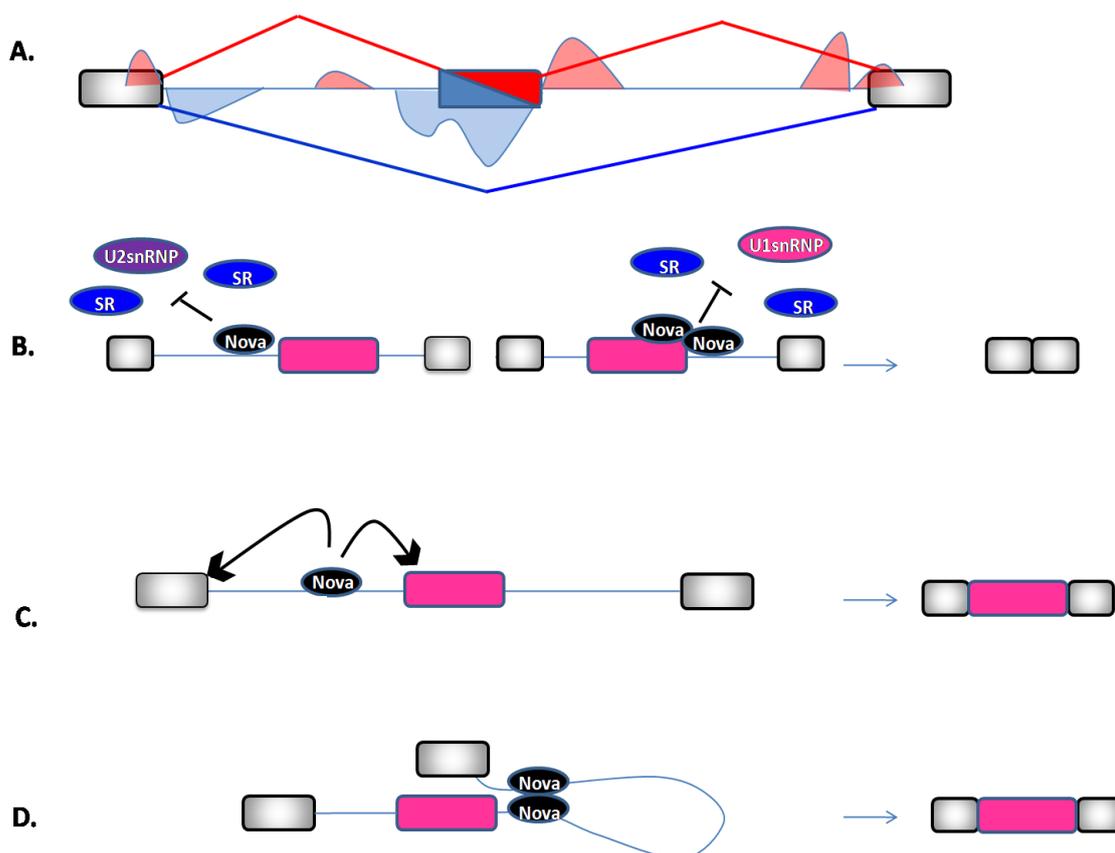


Figure 11 : Régulation de l'épissage alternatif par Nova. (A) L'exon alternatif est central, bordé par deux exons constitutifs (en gris). La carte Nova montre les sites de liaison prédits pour avoir une action «silencer» en Bleu, et « enhancer» en rouge. (B) L'exon alternatif est représenté en rose. A proximité des sites 3' ou 5' d'épissage de l'exon alternatif, l'action de Nova est « répressur ». (C) Par contre, loin de ces sites, Nova agit comme « activateur ». (D) Nova peut également agir comme « activateur » par la présence de deux sites sur le transcrite: l'un à proximité de l'exon alternatif, l'autre à proximité de l'exon constitutif adjacent. Ceci amène à un rapprochement entre les deux exons par interaction entre protéines Nova conduisant à l'inclusion de l'exon alternatif. (D'après Ule et al., 2006)

L'influence de la localisation des sites de liaison de facteurs d'épissage sur la régulation de l'épissage alternatif a également été démontrée dans le cas de la famille Fox (Erminizing locus on X). De la même manière que pour Nova, une carte génomique des sites de fixation des protéines Fox a été établie. D'après cette carte, les sites Fox en amont de l'exon régulé

sont plutôt « activateurs », tandis que ceux en aval sont « répresseurs » (Kiehl et al., 2001, Zhang et al., 2008).

C.3) Régulation des facteurs *trans* régulateurs d'épissage

Le profil d'épissage alternatif d'un exon donné résulte d'un effet combinatoire entre facteurs « répresseurs » et « activateurs ». Ces facteurs sont soumis eux-mêmes à une régulation afin d'obtenir des profils d'épissage spécifiques à un type cellulaire, un tissu ou un stade du développement. Sommairement, la régulation des facteurs *trans* régulateurs d'épissage se fait à trois niveaux: par leur niveau d'expression, leur phosphorylation et leur épissage alternatif.

- **Régulation par le niveau d'expression:** Des profils d'épissage spécifiques à certains tissus, ou stades du développement, peuvent être obtenus grâce à des facteurs régulateurs à expression restreinte, mais également grâce à des facteurs d'épissage ubiquitaires. Par exemple, dans le cas des CELF évoqué précédemment, c'est par le moyen d'une expression restreinte à certains tissus, expression qui varie au cours du développement, que ces facteurs régulateurs induisent les profils d'épissage adaptés aux besoins de l'organisme (Ladd et al., 2001, Ladd et al., 2005). Dans d'autres cas, ce sont les variations dans les ratios de facteurs ubiquitaires à effets activateurs et inhibiteurs qui conduisent à des profils d'épissage tissu et développement spécifiques. C'est le cas, par exemple, des facteurs hnRNPA1 et SF2/ASF, dont les ratios changent en fonction de différents tissus de façon à modifier l'épissage alternatif de plusieurs transcrits (Faura et al., 1995, Hanamura et al., 1998, Kamma et al., 1995).
- **Régulation par phosphorylation :** Un bon exemple pour illustrer le rôle de la phosphorylation dans la régulation de l'épissage alternatif est celui de la protéine SAM68 (Src-associated in mitosis 68 kD), qui fait partie de la famille STAR (Signal Transduction Activator of RNA metabolism). SAM68 induit l'inclusion de l'exon 5 de CD44 une fois phosphorylé par la protéine kinase ERK (Matter et al., 2002). La protéine CUGBP1, impliquée dans la Dystrophie Myotonique de type 1, est également régulée par phosphorylation (Kuyumku-Martinez et al., 2007).

- **Régulation par l'épissage alternatif:** L'épissage alternatif de facteurs d'épissage fait partie des mécanismes employés pour moduler leurs effets. Ici, le cas de la protéine SR, SC35 est intéressant à évoquer. La région 3'UTR de SC35 est soumise à un épissage alternatif qui peut conduire au NMD (Nonsense Mediated Decay). Ceci a pour conséquence la diminution du taux de la protéine. Ici, c'est la protéine SC35, elle-même, qui régule l'épissage alternatif de sa région 3'UTR et ainsi de sa propre expression (Sureau et al., 2001).

Une part des informations dont on dispose sur la régulation de l'épissage alternatif vient de l'étude de maladies avec des mutations soit au niveau des éléments *cis* régulateurs d'épissage soit au niveau de facteurs *trans* régulateurs (Cooper et al., 2009). Le sujet de cette thèse en est un bel exemple. La Dystrophie Myotonique de type 1 est une maladie génétique caractérisée par une dérégulation de facteurs *trans* régulateurs d'épissage. Cette maladie a beaucoup contribué à notre connaissance de la régulation de l'épissage alternatif et de son importance dans la physiologie humaine.

(II) La Dystrophie myotonique de type 1 : une pathologie caractérisée par des dérégulations indirectes de l'épissage alternatif

A) Une maladie génétique avec un phénotype multi-systémique

La Dystrophie Myotonique de type 1 (DM1) est la dystrophie musculaire la plus commune chez l'adulte. Elle touche environ 1 personne sur 15 000 dans le monde. C'est une maladie génétique à évolution progressive caractérisée par une dégénérescence des muscles squelettiques ainsi qu'une myotonie (la difficulté à détendre les muscles après contraction). Mais ce qui la distingue des autres Dystrophies et Myotonies musculaires sont, d'une part, certaines caractéristiques électrophysiologiques et, d'autre part, la manifestation d'autres atteintes non musculaires (Machuca-Tzili et al., 2005). La plupart des symptômes de la DM1 sont récapitulés dans le tableau 1.

Système / Organe	Atteinte
Endocrinien	<ul style="list-style-type: none"> • Résistance à l'insuline • Atrophie testiculaire • Taux élevés de FSH
Yeux	<ul style="list-style-type: none"> • Cataracte • Ptose • Dégénérescence de la rétine
Cœur	<ul style="list-style-type: none"> • Défaut de conduction • Arythmie cardiaque
Respiratoire	<ul style="list-style-type: none"> • Faiblesse et myotonie du diaphragme et des muscles respiratoires • Anomalies de contraction du pharynx et de l'œsophage. • Hypoventilation alvéolaire • Aspiration branchiale
Cerveau	<ul style="list-style-type: none"> • Retard mental dans les formes congénitales • Hypersomnie • Un déclin cognitif variable • Troubles de la personnalité: apathie élevée, évitement et comportement d'agressivité passive
Peau	<ul style="list-style-type: none"> • Calvitie prématurée
Muscle Lisse	<ul style="list-style-type: none"> • Constipation et diarrhées • Douleurs abdominales de type coliques • Syndrome pseudo-occlusif • Contractions non-ordonnées de l'utérus durant l'accouchement
Muscle squelettique	<ul style="list-style-type: none"> • Myotonie • Faiblesse et perte musculaires • Faiblesse des muscles distaux et tardivement des muscles proximaux • Faiblesse des muscles de la face, de la mâchoire, de la langue et des muscles fléchisseurs du cou • Atrophie du sternocléidomastoïdien

Tableau1: Principaux symptômes des formes adultes de la Dystrophie Myotonique de type 1.

A.1) Les formes de DM1

Selon les symptômes et l'âge de déclaration de la maladie, la DM1 peut être divisée en quatre catégories cliniques: Les formes congénitale, juvénile, adulte et la forme tardive asymptomatique. En fait, il n'y a pas de distinction absolue entre les différentes formes de DM1 car la maladie forme un *continuum*. Ce *continuum* s'explique par le mécanisme moléculaire de la maladie (voir chapitre suivant).

- **La forme congénitale** : C'est la forme la plus sévère avec des symptômes présents dès la naissance. Cette forme est presque exclusivement à transmission maternelle (Harper, 1972a). Dans ce cas gravissime, l'enfant est très hypotonique et présente des troubles de succion et de déglutition avec une détresse respiratoire qui peut être à l'origine de son décès. Les enfants qui survivent présentent un retard dans le développement moteur et mental et nécessitent un soutien scolaire à l'école.
- **La forme juvénile (infantile)** : Cette forme est mal définie. Elle débute avant l'âge de 10 ans. Ici, la transmission maternelle n'est pas une règle. Les enfants atteints présentent des faiblesses des muscles faciaux, une myotonie, un QI bas ainsi que des troubles psychologiques.
- **La forme adulte** : C'est la forme la plus répandue avec une apparition des symptômes entre l'âge de 20 et 40 ans. Ici, l'atteinte concerne les muscles squelettiques, les muscles lisses, le système cardio-respiratoire, le système endocrinien, les yeux et le cerveau. Le Tableau 1 récapitule l'ensemble des symptômes de la forme adulte de DM1.
- **La forme tardive non asymptomatique** : On retrouve cette forme chez les personnes âgées. Ici, on n'observe ni faiblesse musculaire ni myotonie, mais plutôt une cataracte et, chez les hommes, une calvitie (Machuca-Tzili et al., 2005).

A.2) La mutation DM 1: Une expansion instable de triplets non traduits à transmission autosomique dominante

Les travaux sur la mutation à l'origine de la DM1 ont débuté dans les années 70 (Harper et al., 1972b). Dans les années 80, le chromosome 19 a été identifié comme étant le chromosome porteur de la mutation, laquelle est précisément localisée en q13 dès 1991

par l'équipe de Shaw (Whitehead et al., 1982, Brunner et al., 1989, Shaw et al., 1985, Harley et al., 1991). Des expériences de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ont été menées pour l'identifier et ont montré une variabilité dans la taille du locus touché entre différents patients DM1 (Aslanidis et al., 1992, Buxton et al., 1992, Harley et al., 1992). En 1992, la mutation DM1 a clairement été identifiée comme une expansion pathologique et instable de trinuécléotides CTG dans la région 3'UTR non traduite du gène ainsi nommé *DMPK* ; Dystrophia Myotonica Protein Kinase (Aslanidis et al., 1992, Brook et al., 1992, Buxton et al., 1992, Fu et al., 1992, Harley et al., 1992, Mahadevan et al., 1992).

- **La dystrophie myotonique protéine kinase** : Le gène *DMPK* est sujet à un épissage alternatif et est constitué de 15 exons qui sont distribués sur une région de 13 kilobases (Jansen et al., 1992). La protéine DMPK est particulièrement enrichie dans les organes atteints par la DM1: les muscles distaux et proximaux, muscles lisses, le cœur, les yeux, les testicules, le cortex cérébral et le cervelet (Jansen et al., 1996, Eriksson et al., 2000, Sakar et al., 2004). Cette kinase possède un domaine qui présente une grande homologie avec les sérine/thréonine kinase AMP cyclique dépendantes (Shaw et al., 1993, Mahadevan et al., 1993). Ses fonctions sont mal connues. Elle est nécessaire à l'organisation du muscle squelettique (Reddy et al., 1996) ainsi qu'à la différenciation des myoblastes (Bush et al., 1996, Furling et al., 2001). Elle participe également à l'homéostasie du calcium, ce qui pourrait l'impliquer dans la régulation de la contraction du muscle squelettique (Benders et al., 1997, Kaliman et al., 2005).

- **L'expansion instable des triplets CTG**: Chez un individu sain, la région 3'UTR de la *DMPK* contient entre 5 et 37 répétitions CTG. Chez les patients atteints de DM1, le nombre de répétitions dépasse 50 et peut atteindre plusieurs milliers dans les formes congénitales (Brook et al., 1992). De plus, ce nombre de répétitions pathologiques continue à augmenter au cours du temps: c'est l'instabilité génétique (Wong et al., 1995, Lia, 1998, Martorell et al., 1998). Cette instabilité génétique concerne les cellules somatiques et germinales (Savouret et al., 2004, De temmerman et al., 2004). Le mécanisme majeur pouvant l'expliquer serait un défaut au moment de la réplication de l'ADN (Figure 12). Ceci est basé sur la capacité des CTG à former des tiges et boucles (Pearson et al., 2002). La

formation de ces structures au niveau du brin d'ADN néo-synthétisé entraînerait une expansion. A l'inverse, sa formation au niveau du brin matrice entraînerait un « glissement » de l'ADN polymérase sur la base de la boucle sans la répliquer. Ceci serait à l'origine d'une rétraction du nombre de CTG, phénomène également observé chez les patients (Kang et al., 1995, Sarkar et al., 1998, Iyer and Wells, 1999). Des mécanismes de réparation de l'ADN sont aussi impliqués dans le phénomène d'expansion (van den Broek et al., 2007, Panigrahi et al., 2005, Tomé et al., 2009). L'instabilité de l'expansion entraîne une variabilité dans le nombre de répétitions CTG entre les différents tissus d'un même individu ainsi qu'au sein d'un même tissu. Ce phénomène s'appelle le mosaïsme. Lui aussi est somatique et germlinal (Jansen et al., 1994, Lia et al., 1998, Martorell et al., 2000, De temmerman, 2004, Savouret et al., 2004).

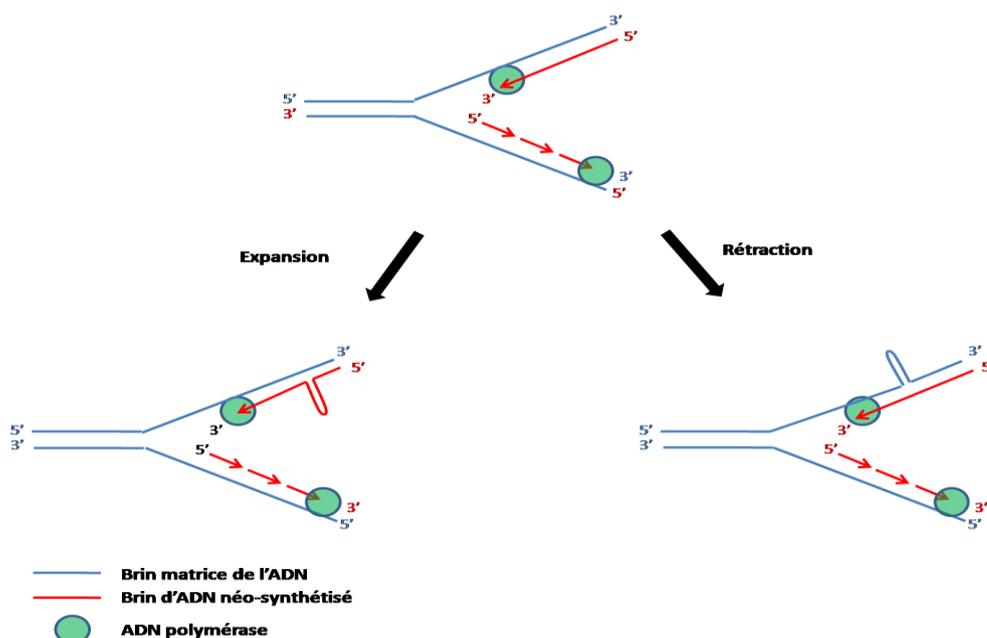


Figure 12: Instabilité des expansions au cours de la réplication de l'ADN. Au cours de la réplication normale, l'ADN polymérase synthétise l'ADN de façon continue à partir d'un brin parental (en haut) et de façon interrompue à partir du brin complémentaire (en bas). L'ADN à répliquer est appelé brin matrice et celui synthétisé brin néo-synthétisé. Des structures secondaires dues aux expansions de triplets CTG peuvent se former sur l'un des deux brins. Lorsque les structures se forment sur le brin néo-synthétisé, on a une expansion qui se manifestera au prochain cycle de réplication. En revanche, les structures au niveau du brin matrice conduisent à une rétraction qui se manifestera, elle aussi, au prochain cycle de réplication. (D'après Brouwer et al., 2009)

- **La transmissibilité autosomique dominante de la mutation:** La mutation DM1 est autosomique dominante et sa transmission dépend du sexe du parent transmetteur (Brunner et al., 1993). En effet, des travaux épidémiologiques montrent que, lorsque la mutation est transmise par le père, elle est plus instable chez la descendance que lorsqu'elle est transmise par la mère (Brunner et al. 1993). Généralement, des expansions de petites tailles très instables sont transmises par le père, tandis que les grandes expansions liées aux formes congénitales sont préférentiellement dues à une transmission maternelle (Tsilfidis et al., 1992, Lavedan et al., 1993). Ceci pourrait s'expliquer par un mécanisme de sélection lors de la spermatogenèse qui éliminerait les cellules portant des grandes expansions (Brunner et al., 1993). Il existe des cas de formes congénitales transmises par le père, mais cela reste l'exception (Zeesman et al., 2002, Di costanzo et al., 2009)

A.3) Une Corrélation génotype / phénotype

Une caractéristique majeure de la mutation DM1 est que la taille de l'expansion est directement corrélée à la sévérité de la maladie (Buxton et al., 1992, Mahadevan et al., 1992). Les enfants atteints de DM1 ont des expansions plus grandes que celles de leurs parents. De plus, la taille des expansions de ces individus augmente durant leur vie et conduit à la transmission d'expansions plus grandes (Ashizawa et al., 1992). En conséquence, les enfants atteints de DM1 présentent des formes plus sévères de la maladie que leurs parents et, au fur et à mesure des générations, la maladie s'aggrave et l'âge de son apparition devient de plus en plus précoce. Ce phénomène s'appelle l'anticipation (Hunter et al., 1992, Harley et al., 1993). C'est une caractéristique clinique majeure de la DM1 qui s'explique, en grande partie, par l'instabilité génétique de la mutation à l'origine de la maladie.

B) Mécanismes de pathogenicité de la DMPK mutée

Après la découverte de la mutation à l'origine de la DM1, une question importante restait en suspens: comment cette mutation, localisée dans une région non codante, peut-

elle générer la pathologie? Cette question entraîne avec elle d'autres interrogations: est-ce que la mutation peut interférer avec la transcription de la DMPK? Avec la maturation de son ARN ou avec son transport? Ou encore, l'effet de cette mutation implique-t-il uniquement la DMPK? Il a été montré que le site contenant la mutation fait partie d'une région promotrice d'un gène adjacent, *SIX5*. Celui-ci est-il impliqué? Est-il possible que les expansions modifient la structure de la chromatine pour impliquer d'autres gènes encore? Toutes ces questions ont été abordées afin de comprendre le mécanisme de pathogénicité de la DMPK mutée. Les différentes recherches sur ce sujet ont permis d'élaborer trois modèles de pathogénicité de la DMPK qui se sont avérés, tour à tour, tous exactes mais avec des retombées différentes : (1) L'haplo-insuffisance de la DMPK (2) l'expression altérée de gènes voisins et (3) un effet « gain de fonction » toxique des ARNs mutés.

B.1) Des effets en *cis*

B.1.1) Haplo-insuffisance de la DMPK

D'expression ubiquitaire, la DMPK pourrait, à elle seule, expliquer le phénotype multisystémique de la DM1. Ce fut la première piste explorée. D'après cette hypothèse, la mutation affecterait l'expression de la DMPK en *cis*. Cela se ferait soit en altérant sa transcription soit en induisant la rétention de ses ARN dans le noyau empêchant ainsi leur traduction dans le cytoplasme. En effet, une baisse du niveau des ARN ainsi que de la protéine ont été observées dans les sujets atteints (Fu et al., 1993, Novelli et al., 1993, Wang et al., 1995a, Krahe et al., 1995). De plus, les ARN DMPK sont retenus dans le noyau sous forme d'agrégats ribonucléaires nommés *foci* (Taneja et al., 1995). Ces inclusions ont été observées chez les patients DM1 dans des fibroblastes et dans le muscle squelettique (Taneja et al., 1995, Davis et al., 1997), dans le cœur (Mankodi et al., 2005), ainsi que, au niveau cérébral, dans les neurones corticaux et sous corticaux (Jiang et al., 2004). Bien que les foci soient essentiellement nucléaires, il faut noter qu'une distribution cytoplasmique a également été décrite (Amack and Mahadevan, 2001). Ces foci qui correspondent à la rétention des ARN DMPK dans le noyau constituent aujourd'hui la signature histopathologique de la DM1. Ils mènent à une baisse de la quantité de protéine, ayant pour conséquence une haplo-insuffisance de la DMPK.

L'haplo-insuffisance de la DMPK participe au phénotype pathologique observé dans la DM1 mais ne l'explique pas entièrement. En effet, l'inactivation du gène DMPK dans des souris transgéniques a pour conséquence une faible altération des muscles sterno-cléido-mastoidiens ainsi que des défauts de conduction cardiaque (Jansen et al., 1996, Berul et al., 1999). Avec les défauts de conduction cardiaque, ces souris présentent donc l'un des phénotypes de la DM1, mais ne récapitulent pas la totalité des effets multisystémiques. D'autres mécanismes sont donc obligatoirement impliqués.

B.1.2) Effet *cis* sur les gènes environnants

La deuxième piste explorée a été celle d'une modification de la structure de la chromatine qui affecterait l'expression non seulement du gène *DMPK*, mais aussi des gènes environnants. De nature flexible, les expansions de triplets pourraient fermement enrouler les histones créant une région de répression transcriptionnelle. Des régions nucléosomales de cette sorte ont été mises en évidence au niveau de la zone de mutation (Otten et al., 1995, Wang et al., 1995b). Il a été montré que cette mutation entraînait une baisse de transcription du gène *SIX5* (*Sine oculis homeobox homolog 5*) présent en aval de la *DMPK* et qui code pour un facteur de transcription (Otten et al., 1995, Thornton et al., 1997, Frisch et al., 2001). Ce gène possède un élément de régulation transcriptionnelle dans la région condensée. Dans la DM1, son expression est réduite par un facteur 2 à 4 (Klesert et al., 1997). Des modèles transgéniques murins montrent que cette déficience pourrait conduire à seulement l'un des symptômes de la DM1: la cataracte (Klesert et al., 2000). Quant au gène situé en amont de la *DMPK*, *DMWD* (*Dystrophia Myotonica containing WD repeat motif*), son expression est également réduite sous l'effet de la mutation, mais les conséquences de cette baisse ne sont pas encore connues (Alwazzan et al., 1999). Une implication dans l'atteinte neuronale peut être envisagée (Westerlaken et al., 2003).

B.2) Des effets en *trans*

Que cela soit au niveau de la *DMPK* ou des ses gènes environnants, l'effet en *cis* des expansions n'explique pas le phénotype multisystémique de la maladie. Ceci a conduit à l'élaboration de l'hypothèse d'un gain de fonction des ARN mutés. Bien qu'elles ne soient pas traduites, les expansions de triplets sont transcrites et sont retenues dans le noyau sous forme de *foci* (Taneja et al., 1995, Davis et al., 1997, Jiang et al., 2004). Les *foci* nucléaires pourraient alors interférer avec le métabolisme de la cellule et exercer un effet toxique. Cet effet toxique des ARN mutés suppose leur action sur des gènes, ou produits de gènes, pas nécessairement présents sur le locus de la *DMPK*. Cet effet est qualifié de *trans*-dominant.

L'idée d'un effet *trans*-dominant des ARN mutés a été confortée par l'existence d'une autre dystrophie myotonique qui présente de grandes similitudes cliniques avec la DM1. Il s'agit de la DM2 (Liquori et al., 2001, Day and Ranum, 2005). Cette maladie multisystémique est également due à des expansions pathologiques dans une région non traduite d'un gène. Il s'agit d'expansions de quadruplets CCTG dans l'intron 1 du gène ZNF9. Ici, et à la différence de la DM1, on n'observe pas d'altération de la quantité d'ARN et de protéine ni pour ZNF9 ni pour les gènes voisins (Margolis et al., 2006). Par contre, et comme dans la DM1, les ARN mutés s'accumulent dans le noyau sous forme de *foci* (Liquori et al., 2001). Etant donnée la grande différence de l'effet en *cis* des deux mutations, la similitude clinique entre les deux pathologies ne peut être attribuée qu'à l'effet en *trans* produit par les deux.

B.2.1) Rôle crucial des CTG dans la physiopathologie de la DM1

Dans la DM1, les premières preuves pour un effet de gain de fonction toxique des ARN mutés sont venues grâce à des modèles cellulaires et à des animaux transgéniques. D'abord, des modèles cellulaires de myoblastes ont montré que c'était la présence d'expansions de CTG qui conduisait à l'effet *cis* sur la *DMPK* (Amack et al., 1999). Les travaux sur myoblastes ont également permis de voir que les CTG induisaient un ralentissement dans la différenciation des myoblastes en myotubes (Amack et al., 1999, Furling et al., 2001). Ensuite, des modèles murins ont révélé que plusieurs phénotypes de la

DM1 pouvaient être obtenus par la présence d'expansions de CTG, cela indépendamment de l'effet *cis* de la mutation DM1. L'équipe de Charles Thornton a élaboré un modèle qui exprime des expansions dans le contexte du gène de l'actine musculaire. Ce modèle montre une myopathie et une myotonie musculaires, deux symptômes majeurs de la pathologie (Mankodi et al., 2000). En parallèle, l'équipe de Geneviève Gourdon a élaboré un modèle murin qui exprime des expansions de CTG dans leur contexte naturel au sein de la *DMPK* (Seznec et al., 2001). Ces souris présentent également plusieurs atteintes musculaires ainsi que des atteintes cérébrales caractéristiques de la DM1. Depuis, les modèles murins ont continué à illustrer la contribution des expansions de triplets aux différents symptômes de la DM1. C'est ainsi qu'on a pu mettre en valeur la contribution des expansions à la perte de la fibre de muscle squelettique (Orengo et al., 2008), l'atteinte cardiaque (Wang et al., 2007b) et à l'atteinte respiratoire (Panaite et al., 2008).

Ainsi, la pathologie dans la DM1 est essentiellement due aux expansions de triplets CTG. A partir de là, et puisque les effets en *cis* n'expliquaient pas tous les symptômes de la maladie, on a supposé que l'effet de la mutation pouvait passer par une toxicité au niveau des ARN mutés. Ces derniers pourraient induire des dérégulations au niveau de protéines liant l'ARN. C'est ainsi que l'attention s'est focalisée sur les protéines capables de lier les motifs CUG.

B.2.2) L'effet *trans*-dominant des CTG sur l'épissage alternatif

Dans la recherche de protéines potentiellement impliquées dans l'effet des expansions de triplets, deux familles ont retenu l'attention pour leur capacité à lier les motifs CUG *in vitro*. Il s'agit des facteurs régulateurs d'épissage des familles CELF et Muscleblind (Timchenko et al., 1999, Miller et al., 2000). Il a été montré que le facteur régulateur d'épissage Mbnl1 était séquestré dans les *foci* et que la quantité de protéines CUGBP1 était augmentée et qu'elles étaient hyperactives (hyperphosphorylées) (Fardaei et al., 2001, Timchenko et al., 2001, Jiang et al., 2004, Mankodi et al., 2001, Roberts et al., 1997, Savkur et al., 2001). Le facteur d'épissage hnRNP H a également été retrouvé augmenté dans des myoblastes immortalisés de patients DM1 (Paul et al., 2006). De plus, une co-localisation entre la hnRNP F et les *foci* a été décrite (Jiang et al., 2004).

Une altération de ces facteurs d'épissage par les expansions de triplets suppose une altération de l'épissage alternatif de leurs transcrits cibles. Et, en effet, dans la DM1, on observe une dérégulation de l'épissage alternatif de plusieurs transcrits dans les différents organes touchés. L'essentiel des transcrits, dont l'épissage alternatif est dérégulé dans la DM1, sont décrits dans le tableau 2. Il faut noter que d'autres transcrits altérés ont également été décrits (Lin et al., 2006, Kalsotra et al., 2008). Les dérégulations d'épissage alternatif des transcrits les plus connus ont été reproduites dans des modèles cellulaires et murins exprimant les expansions de triplets (Charlet-B et al., 2002b, Philips et al., 1998, Savkur et al., 2001, Kanadia et al., 2003, Gomes-Pereira et al., 2007, Orengo et al., 2008). Ceci a permis de démontrer le lien entre la dérégulation de l'épissage et la pathologie. Chez l'homme, la taille des expansions est corrélée aux défauts d'épissage (Botta et al., 2008) fournissant une possible explication moléculaire à la physiopathologie de la DM1.

Aujourd'hui, l'effet *trans*-dominant sur l'épissage alternatif est considéré comme devant être le mécanisme majeur capable d'expliquer le phénotype multi-systémique de la maladie (Day and Ranum, 2005, Ranum and Cooper, 2006, Osborne and Thornton, 2006). Ceci a été démontré pour le canal chlore, dont la dérégulation d'épissage participe à des aspects précis de la myotonie (Wheeler et al., 2007). De même, le défaut d'épissage du récepteur à l'insuline conduit à une résistance à l'insuline (Savkur et al., 2001). De manière intéressante, cet effet *trans*-dominant sur l'épissage alternatif est également observé dans la DM2, où l'on observe aussi une séquestration du facteur d'épissage Mbnl1 dans les *foci* (Mankodi et al., 2001, Cardani et al., 2006, Cardani et al., 2009, Lin et al., 2006). Cet effet pourrait expliquer la similitude clinique entre les deux pathologies (Machuca-Tzili et al., 2005).

Organe	Transcrits dérégulés dans la DM1
Muscle squelettique	<ul style="list-style-type: none"> • Troponine T squelettique (TNNT3) • Canal chlore (CLCN-1) • Protéine affiliée à la myotubularine (MTMR1) • Récepteur à la Ryanodine (RyR) • Récepteur à l'insuline (IR) • Pompe ATPase Ca²⁺ du réticulum sarcoplasmique/endoplasmique (SERCA 1 et SERCA 2) • Muscleblind (Mbnl1 et 2)
Muscle cardiaque	<ul style="list-style-type: none"> • Troponine T cardiaque (TNNT2) • Protéine affiliée à la myotubularine (MTMR1)
Cerveau	<ul style="list-style-type: none"> • Protéine associée aux microtubules (Tau) • Protéine précurseur à l'amyloïde (APP) • Récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDAR1) • Muscleblind (Mbnl1)

Tableau 2 : Plusieurs transcrits dont l'épissage alternatif est dérégulé dans la DM1.

B.2.3) L'effet *trans*-dominant des CTG sur l'expression de gènes

Des modifications dans le niveau d'expression de gènes ont été rapportées chez des patients atteints de DM1 ainsi que dans plusieurs modèles transgéniques de la pathologie (Botta et al., 2007, Osborne et al., 2009, Ebralzide et al., 2004). Ces modifications peuvent être la conséquence d'altérations dans la disponibilité de facteurs de transcription due à leur séquestration par les CUG (Ebralzide et al., 2004).

Altérée dans la DM1, la protéine CUGBP1 peut également contribuer à ces modifications d'expression. Il faut rappeler ici que CUGBP1 est aussi bien impliquée dans l'épissage que dans la traduction, la déadénylation et la dégradation des ARN (Timchenko et al., 1999, Iakova et al., 2004, Mukhopadhyay et al., 2003, Paillard et al., 2003, Valasova and Bohjanen, 2008). Dans la DM1, CUGBP1 devient essentiellement localisée dans le noyau, ce qui altère ses activités cytoplasmiques (Timchenko et al., 2001, Timchenko et al., 2004). Dans le muscle squelettique, cette localisation a pour conséquence l'altération de la traduction de plusieurs de ses cibles, telles que le facteur de transcription MEF2A (Myocyte Enhancer Factor 2A) et la protéine du cycle cellulaire p21. Il a été montré que cet événement participe à l'atteinte musculaire (Timchenko et al., 2001, Timchenko et al., 2004). Dans le cœur, c'est le facteur de transcription NKX2-5 qui est altéré participant ainsi à l'atteinte cardiaque (Yadava et al., 2008).

Krol et ses collaborateurs ont proposé que les expansions de CUG étaient clivées par la ribonucléase Dicer pour produire plusieurs fragments de CUG qui viendraient alors inhiber l'expression par le principe d'ARN interférence (Krol et al., 2007). Récemment, l'équipe de Charles Thornton a décrit des modifications d'expression dans deux modèles transgéniques murins de la DM1: un modèle exprimant des expansions de triplets au sein du gène de l'actine (modèle HSALR) et un autre KO pour le gène *Mbnl1* (*Mbnl1* ^{-/-}) (Osborne et al., 2009). Les auteurs montrent, ici, que les deux modèles, qui récapitulent plusieurs phénotypes de la maladie, présentent des similitudes dans les modifications d'expression. Si ces résultats témoignent de l'importance de la perte de fonction de *Mbnl1* dans l'effet *trans*-dominant des CTG sur l'expression, ils montrent également que la perte de *Mbnl1* peut induire, à elle seule, des modifications d'expression. Ceci souligne la complexité du

problème et la part d'inconnu qui l'entoure. A ce jour, aucune fonction de Mbnl1 dans la régulation d'expression des gènes n'a été décrite.

L'effet *trans*-dominant sur l'expression de gènes est également observé dans la DM2 où l'on constate des modifications similaires à celles retrouvées dans la DM1 (Botta et al., 2007). Cet effet participe probablement à la similitude clinique entre les deux pathologies.

C) Implication des facteurs d'épissage des familles Muscleblind et CELF dans l'effet *trans*-dominant des expansions de CTG

Aujourd'hui, l'effet *trans*-dominant sur l'épissage alternatif est considéré comme le mécanisme majeur capable d'expliquer le phénotype multi-systémique de la maladie. Les anomalies d'épissage observées dans le muscle squelettique, le cœur et le cerveau dans la DM1 concernent des transcrits normalement régulés au cours du développement et conduisent à une expression majorée d'isoformes fœtales (Buj-Bello et al., 2002, Charlet-B et al., 2002b, Jiang et al., 2004, Kanadia et al., 2003, Philips et al., 1998, Savkur et al., 2001, Sergeant et al., 2001). La plupart de ces transcrits sont régulés par les facteurs d'épissage de la famille Mbnl et CELF connus pour jouer un rôle au cours du développement (Kalsotra et al., 2008, Huang et al., 2008, Ladd et al., 2001, Lin et al., 2006). Ces deux familles exercent des effets antagonistes sur l'épissage des transcrits dérégulés dans la DM1 et fournissent une part d'explication aux mécanismes sous-jacents à la pathologie.

C.1) Implication du facteur d'épissage MBNL1

Comme il a été décrit précédemment, le facteur d'épissage Mbnl1 se retrouve séquestré dans les *foci* ce qui conduit à sa perte de fonction (Fardaei et al., 2001, Mankodi et al., 2001, Mankodi et al., 2005, Jiang et al., 2004, Kanadia et al., 2003a). Mbnl1 n'est pas le seul de sa famille à être séquestré dans les foci puisque ses paralogues Mbnl 2 et 3 le sont également (Miller et al., 2000, Fardei et al., 2002, Mankodi et al., 2003). L'implication de

ces derniers dans l'effet *trans*-dominant sur l'épissage n'est pas très connue et seule celle de Mbnl1 sera abordée ici.

C.1.1) Mbnl1 entre dans la constitution des *foci*

Non seulement Mbnl1 co-localise avec les *foci*, mais il participe également à la formation et au maintien de ces structures. Un modèle transgénique de DM1 chez la *Drosophile* a montré la formation de *foci* dans des cellules musculaires, mais pas dans des cellules neuronales et cela en dépit de la présence de la DMPK mutée dans ces dernières (Houseley et al., 2005). La transfection de Mbnl1 dans les cellules neuronales a induit la formation de quelques *foci* révélant son implication dans la formation de ces structures. Dans des myoblastes de DM1, l'inactivation de Mbnl1 a conduit à une perte considérable du nombre de *foci*. Une telle conséquence souligne l'importance de Mbnl1 dans le maintien des *foci* (Dansithong et al., 2005). La figure 13 montre la co-localisation de Mbnl1 avec les *foci* dans le tissu cardiaque.



Figure 13: Co-localisation entre Mbnl1 et les *foci* d'ARN dans le cœur humain. Les *foci* sont révélés par Hybridation *in situ* et Mbnl1 par Immunofluorescence (De Mankodi et al., 2005)

C.1.2) Le facteur Mbnl1 régule l'épissage alternatif de plusieurs transcrits altérés dans la DM1

Que cela passe par une augmentation d'inclusion ou d'exclusion de l'exon régulé, Mbnl1 régule l'épissage alternatif de plusieurs transcrits altérés dans la DM1 (Lin et al., 2006, Kanadia et al., 2003a). C'est le cas pour la troponine T cardiaque (cTNT), dont l'un des exons alternatifs (l'exon 5) devient préférentiellement inclus dans la DM1 (Philips et al.,

1998). Pour cet exon, la surexpression de Mbnl1 induit une augmentation d'exclusion alors que sa perte de fonction provoque l'inclusion (Ho et al., 2004). Cet effet est en cohérence avec le postulat d'une perte de fonction de Mbnl1 dans sa contribution aux phénotypes d'épissage pathologiques (Kanadia et al., 2003a). L'exon fœtal (exon F) du transcrit de la troponine T squelettique est aussi régulé par Mbnl1 (Kanadia et al., 2003a, Kanadia et al., 2006). Pour le canal chlore, le défaut d'épissage dans la DM1 correspond à une insertion de l'intron 2 et des exons 6b, 7a (Charlet-B et al., 2002b, Mankodi et al., 2002). Ces dérégulations conduisent à l'apparition de codons stop prématurés et sont probablement responsables d'une dégradation du transcrit par le processus de NMD (Nonsense mediated decay) (Charlet-B et al., 2002b, Mankodi et al., 2002, Lueck et al., 2006). Dans des souris KO pour Mbnl1, l'exon 7a devient préférentiellement inclus démontrant que cet exon est régulé par Mbnl1 (Kanadia et al., 2003a). Un autre transcrit altéré dans le muscle squelettique de DM1 est le récepteur à l'insuline (Savkur et al., 2001, Savkur et al., 2004). Ici, l'exon 11 est préférentiellement exclu chez les patients atteints de DM1. Dans des cultures primaires de muscle squelettique de poulet, la surexpression de Mbnl1 amène à l'inclusion de l'exon 11, tandis que sa perte de fonction induit son exclusion (Ho et al., 2004). Dans des myoblastes humains, l'invalidation de Mbnl1 confirme l'exclusion de l'exon 11, tandis que sa surexpression n'a pas de conséquence (Danisthong et al., 2005). L'effet de ce facteur sur l'épissage est donc dépendant du contexte cellulaire. Dans le cerveau, le transcrit de Tau est altéré au niveau de différents exons alternatifs : les exons 2,3, 6 et 10 (Sergeant et al., 2001, Leroy et al., 2006a, Jiang et al., 2004, Dhaenens et al., 2008). L'altération d'épissage des exons 2, 3 et 10 dans la DM1 conduit à leur exclusion. Le cas de l'exon 6 est particulier. Cet exon possède, en effet, trois sites 3' d'épissage dont l'usage génère respectivement les isoformes 6c, 6p et 6d. Dans la DM1, il y a une baisse de l'isoforme 6c au profit de l'isoforme 6d. Quant à l'effet de Mbnl1 sur l'épissage de Tau, notre laboratoire a montré son effet sur les exons 2 et 3 (Dhaenens et al., 2008). Comme pour le récepteur à l'insuline, l'invalidation de Mbnl1 induit l'exclusion des exons 2 et 3, tandis que sa surexpression n'a pas d'effet (Dhaenens et al., 2008).

C.1.3) La perte de fonction de Mbnl1 reproduit plusieurs phénotypes de la DM1

Le facteur Mbnl1 semble jouer un rôle important dans les phénotypes pathologiques de la DM1. D'abord, des souris KO partiel pour Mbnl1 (Mbnl1 Δ E3/ Δ E3) montrent plusieurs caractéristiques phénotypiques communes avec des souris DM1 (HSALR) et les patients DM1 (Kanadia et al., 2003). L'invalidation de Mbnl1 dans ces souris induit des anomalies histologiques du muscle squelettique, une myotonie et une cataracte (Kanadia et al., 2003). Par contre, la surexpression de Mbnl1 dans des souris qui expriment des expansions de triplets CTG est capable de réduire considérablement la myotonie (Kanadia et al., 2006). Un modèle de DM1 dans la Drosophile a également montré que plusieurs aspects dégénératifs du muscle squelettique et de l'œil sont amoindris par la surexpression de Mbnl1 et aggravés par sa sous-expression (De Haro et al., 2006).

C.2) Implication des facteurs de la famille CELF

C.2.1) Implication de CUGBP1

La protéine CUGBP1 est soumise à plusieurs altérations dans la DM1. Des cultures de cellules et des souris transgéniques qui expriment la DMPK mutée ainsi que des tissus de patients de DM1 montrent que son taux protéique augmente dans le muscle squelettique et le cœur (Dansithong et al., 2005, Savkur et al., 2001, Timchenko et al., 2001, Timchenko et al., 2004, Wang et al., 2007, Orengo et al., 2008). Par ailleurs, la phosphorylation et la distribution cellulaire de CUGBP1 sont également altérées dans la DM1 (Roberts et al., 1997, Kuyumcu-Martinez et al., 2007). Plusieurs arguments montrent l'implication de CUGBP1 dans la physiopathologie de la DM1.

C.2.1.1) Le facteur CUGBP1 régule l'épissage alternatif de plusieurs transcrits altérés dans la DM1

Le premier élément qui plaide en la faveur d'un rôle de CUGBP1 dans la DM1 est son implication dans l'effet *trans*-dominant sur l'épissage alternatif. CUGBP1 régule l'épissage

de la troponine T cardiaque, du récepteur à l'insuline, du canal chlore et de la protéine affiliée à la myotubularine (Philips et al., 1998, Savkur et al., 2001, Ho et al., 2005, Ho et al., 2004, Charlet-B et al., 2002b). Dans le cas de tous ces transcrits, la surexpression de CUGBP1 provoque une augmentation des isoformes fœtales. De manière intéressante, l'expression de CUGBP1 diminue au cours du développement dans le muscle squelettique et le cœur (Ladd et al., 2005). Dans des souris transgéniques qui surexpriment CUGBP1 dans ces organes, un retour à un profil d'épissage de type fœtal est observé pour la troponine T cardiaque, le canal chlore et la protéine affiliée à la myotubularine (Ho et al., 2005).

Parmi les exemples qui illustrent le mieux le rôle de CUGBP1 dans l'effet *trans*-dominant sur l'épissage, on a la troponine T cardiaque et le récepteur à l'insuline. Des mutations dans les sites de liaison de CUGBP1 sur ces deux transcrits les rendent incapables de répondre à l'effet *trans*-dominant des expansions de triplets (Philips et al., 1998, Savkur et al., 2001). Si cette incapacité de réponse aux CTG prouve l'implication de CUGBP1 dans l'effet *trans*-dominant sur ces transcrits, elle montre aussi que Mbnl1 n'est pas le seul facteur à y contribuer.

C.2.1.2) La surexpression de CUGBP1 reproduit plusieurs phénotypes de la DM1

Des souris transgéniques qui surexpriment CUGBP1 dans le muscle squelettique et le cœur présentent un taux de mortalité d'autant plus élevé que l'expression de CUGBP1 est importante (Timchenko et al., 2004, Ho et al., 2005). Celles qui survivent présentent un retard de croissance avec plusieurs défauts histologiques du muscle squelettique. A l'inverse, les souris KO pour CUGBP1 ont des anomalies cardiaques qui sont très atténuées par la restauration du niveau d'expression de la protéine (Ladd et al., 2005). Chez la drosophile, la sous-expression de CUGBP1 atténue la dégénérescence et la perte musculaires dues aux expansions de triplets, tandis que sa surexpression aggrave ces phénotypes (De haro et al., 2006).

C.2.2) Implication du facteur ETR-3

Comme la protéine CUGBP1, le facteur ETR-3 est sujet à une dérégulation dans la DM1. Des souris transgéniques exprimant des expansions de triplets CTG de manière inductible dans le cœur montrent une augmentation dans le niveau protéique de ETR-3 après l'induction des CTG (Wang et al., 2007). De plus, et toujours comme pour CUGBP1, ce modèle montre que les expansions de triplets modifient la localisation cellulaire du facteur ETR-3, qui devient concentré au niveau nucléaire (Wang et al., 2007).

Enfin, ETR-3 régule l'épissage alternatif de plusieurs transcrits altérés dans la DM1, tels que cTNT, MTMR1, IR, NMDAR1 et Tau (Ladd et al., 2001, Faustino and Cooper, 2005, Zhang et al., 2002, Leroy et al, 2006).

(III) Tau et cTNT : deux transcrits à l'épissage alternatif altéré dans deux tissus atteints par la DM1

La dystrophie myotonique est essentiellement connue pour son atteinte musculaire. Parmi les muscles les plus touchés, on trouve ceux du squelette et du cœur. L'atteinte cardiaque concerne plus de 80% des patients de DM1. Elle est caractérisée par des défauts de conduction et de rythme cardiaques et peut s'avérer fatale (Bushby et al., 2003, Vinereanu et al., 2004). La DM1 se caractérise aussi par une atteinte du système nerveux qui implique la jonction neuromusculaire (Wheeler et al., 2007, Panaite et al., 2008) et les fonctions cérébrales. L'atteinte cérébrale conduit à une hypersomnie et à une dégénérescence du cerveau. Cette dernière est associée à un déclin cognitif ainsi qu'à des troubles de la personnalité (Rubinsztein et al., 1997, Bungener et al., 1998, Ogata et al., 1998, Ono et al., 1998, Modoni et al., 2008, Modoni et al., 2004, Kuo et al., 2008). Dans les formes congénitales de la DM1, on constate également un défaut du développement cérébral responsable d'un retard mental aigu (Mondoni et al., 2004).

Dans les cerveaux de patients atteints de DM1, on observe des dérégulations de l'épissage alternatif de plusieurs transcrits. Parmi eux, on compte celui de Tau qui participe très

probablement à l'atteinte cérébrale. Dans le cœur, l'un des transcrits dont l'épissage alternatif est dérégulé est celui de la Troponine T cardiaque (cTNT). Bien que la contribution de ce transcrit à l'atteinte cardiaque n'ait pas été démontrée, il reste parmi les plus étudiés.

A) Tau

Les protéines Tau font partie de la famille des protéines associées aux microtubules (Microtubule Associated Proteins, MAP). Elles sont principalement neuronales, mais certaines cellules non neuronales, telles que les cellules musculaires, sont capables de les synthétiser (Wei and Andreadis, 1998). Ces protéines lient et stabilisent les microtubules. Par cette fonction, elles jouent un rôle crucial dans la morphogénèse neuronale et le transport axonal.

A.1) Le gène, les isoformes et les protéines

- **Le gène:** Les protéines Tau sont synthétisées à partir d'un gène unique appelé MAPT, situé sur le bras long du chromosome 17 en position 17q21 (Neve et al., 1986). Son promoteur est mal défini. Il s'étend sur une région de 300 pb, région présente en amont de l'exon -1 (Figure 14A) (Andreadis et al., 1996, Sadot et al., 1996). Cette région ne contient pas de séquences TATA et CAAT box, mais son analyse révèle néanmoins la présence de plusieurs séquences consensus. L'une de ces séquences fixe les facteurs de transcription SP1 et AP2 capables d'activer la transcription du gène. L'autre fixe le facteur GCF qui, à l'inverse, exerce un effet inhibiteur (Andreadis et al., 1996). L'équipe d'Andreadis a proposé l'existence de plusieurs sites d'initiation de la transcription impliquant des régions promotrices supplémentaires (Andreadis et al., 1996), mais ces sites restent encore à déterminer.
- **Les isoformes :** Le gène de Tau contient 16 exons (Andreadis et al., 1992). L'exon -1 n'est pas traduit et l'exon 14 l'est rarement. En réalité, le gène de Tau contient deux codons stop: l'un situé dans l'intron entre les exons 13 et 14 et l'autre situé au sein de l'exon 14. Quant à l'épissage des exons de Tau, il est connu que 8 sont soumis à un

épissage constitutif (les exons 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 et 13) et que cinq exons sont épissés de manière alternative (les exons 2, 3, 4A, 6 et 10) (Goedert et al., 1989a et b, Kosik et al., 1989, Goedert et al., 1992, Couchie et al., 1992, Wei and Andreadis, 1998, Gao et al., 2000). Dans le cerveau humain adulte, l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 génère 6 isoformes différentes de Tau : 2+3+10+, 2+3+10-, 2-3-10+, 2+3-10-, 2+3-10+, 2-3-10- (Figure 14B) (Andreadis et al., 1992). Le cas de l'exon 3 est particulier puisqu'il ne peut être inséré dans le transcrit de Tau que lorsque l'exon 2 est lui-même inséré (Andreadis et al., 1995). Cependant, la présence de l'exon 2 n'entraîne pas systématiquement l'insertion de l'exon 3. Un autre cas particulier est celui de l'exon 6. Cet exon possède, en effet, trois sites 3' d'épissage dont l'usage génère respectivement les isoformes 6c, 6p et 6d (Wei and Andreadis, 1998, Luo et al., 2004a). Cette forme est très minoritaire dans le cerveau. Quant à l'exon 4A, il est spécifique au système nerveux périphérique (Georgieff et al., 1993, Nunez et al., 1997). Enfin, l'insertion de l'exon 8 a pu être décrite chez le boeuf mais pas chez l'homme (Himmler, 1989).

- **Les protéines** : Dans le cerveau adulte humain, six isoformes majoritaires de Tau sont donc générées par épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 (Figure 14B) (Goedert et al., 1989a). L'insertion de ces exons alternatifs a des répercussions sur la fonction de la protéine.

Au niveau de sa structure primaire, Tau est divisée en deux régions principales: la partie N-terminale encore appelée « domaine de projection » et la partie C-terminale appelée « domaine de liaison aux microtubules » (Figure 14C). Le domaine de projection tient son nom de son positionnement vis-à-vis des microtubules. Dans ce domaine, les exons 2 et 3 codent chacun pour une séquence de 29 acides aminés. Le rôle exact de ce domaine, et ainsi de ces deux exons, n'est pas encore bien élucidé. Plusieurs fonctions lui ont été attribuées. Parmi celles-ci, il y a l'espacement entre les microtubules au niveau axonal (Chen et al., 1992). En fonction de la longueur du domaine de projection, et donc de l'incorporation des exons 2 et 3, le diamètre des axones peut varier (Harada et al., 1994, Dawson et al., 2001). De plus, ce domaine peut être impliqué dans des interactions intramoléculaires avec le domaine de liaison aux microtubules (Goode et al., 1997). Par ailleurs, le domaine de projection est capable d'interagir avec la membrane plasmique (Arrasate et al., 2000, Arrasate et al., 1997, Brandt et al., 1995) et avec le complexe de

dynactin impliqué dans le transport axonal (Magnani et al., 2007). D'autre part, Tau est capable d'interagir avec des protéines de transduction du signal à domaine SH3, telles que fyn et la PLC gamma (Lee et al., 1998, Williamson et al., 2002, Jenkins et al., 1998, Hwang et al., 1996). D'autres travaux montrent également un rôle protecteur du domaine de projection contre l'apoptose (Amadoro et al., 2004).

Les protéines Tau ont été découvertes comme protéines liant les dimères de tubulines et permettant la polymérisation et la stabilité des microtubules dans la cellule (Drubin and Kirschner, 1986). Cette propriété est attribuée à la partie C-terminale de Tau. En fonction de l'épissage alternatif de l'exon 10, cette région peut être composée de 3 ou 4 domaines de séquences similaires et répétées de 31 à 32 acides aminés notées R1 à R4 (Repeat 1 à 4) (Figure 14C). Chacun de ces domaines répétés peut être divisé en deux parties : l'une de 18 acides aminés qui présente une homologie forte entre les 4 domaines répétés et qui est responsable de liaison avec la tubuline, et l'autre de 13 à 14 acides aminés, d'homologie plus faible, nommée « région inter-repeat ». Ces domaines sont encodés respectivement par les exons 9 à 12. Comme pour le domaine de projection, la composition du domaine de liaison aux microtubules varie en fonction de l'incorporation, ou non, de l'exon 10. En fonction de l'insertion ou non de cet exon, la capacité de Tau à lier les microtubules sera différente. En effet, les protéines Tau à 4 domaines de liaison aux microtubules (4R) lient et polymérisent plus efficacement les microtubules que les isoformes à 3 domaines (3R) (Goedert and Jakes, 1990). Cette propriété différentielle est très importante au cours du développement. Lors de l'embryogenèse, elle permet à l'isoforme fœtale (2-3-10-) d'assurer une flexibilité et un dynamisme des microtubules pour permettre la migration cellulaire et la mise en place de connections nerveuses. Après la naissance, le passage aux isoformes 4R est corrélé avec une stabilité plus importante du réseau microtubulaire et une diminution de la plasticité du cytosquelette (Goedert et al., 1989a, Kosik et al., 1989). Cette propriété est nécessaire pour le maintien des structures déjà mises en place.

Enfin, il faut noter que les protéines Tau sont sujettes à modifications post-traductionnelles et notamment à la phosphorylation et à la glycosylation (Buée et al., 2000, Lefebvre et al., 2003).

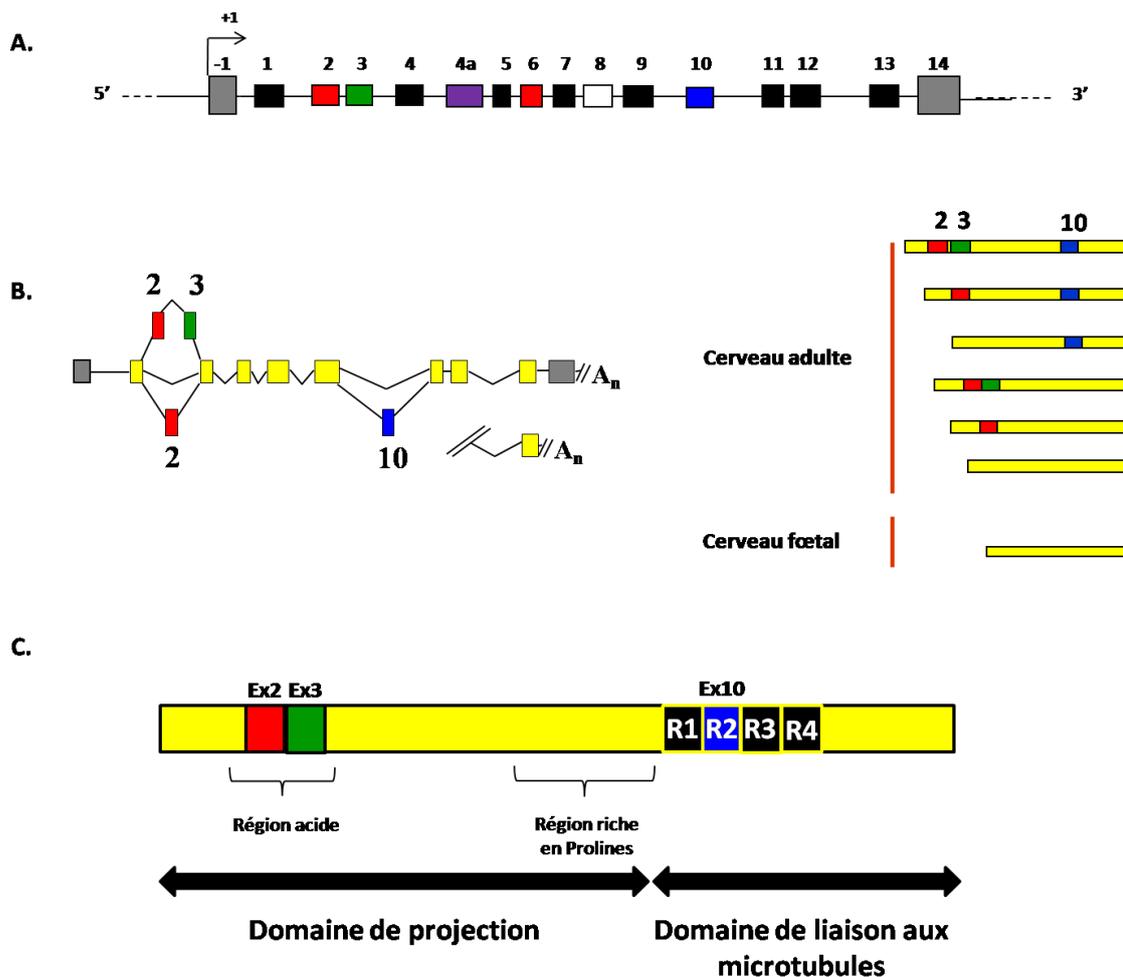


Figure 14 : Le gène, les isoformes et la structure de la protéine Tau. (A) Le gène de Tau est situé sur le chromosome 17 en position 17q21. Il est constitué de 16 exons. Les exons non traduits sont en gris et les exons constitutifs sont en noir. Les exons alternatifs sont représentés en couleurs. L'exon 8, dont l'inclusion dans le transcrit de Tau n'a jamais été décrite chez l'homme, est représenté en blanc. **(B)** Les différentes possibilités d'épissage alternatif du pré-messager de Tau dans le cerveau humain sont schématisées à gauche. La présence d'un signal polyA en amont de l'exon 14 donne lieu à un transcrit ne contenant pas cet exon. Les isoformes protéiques majoritaires dans le cerveau sont représentées à droite. Ce schéma ne prend pas en compte l'exon 6 qui est minoritaire. **(C)** Sur le plan fonctionnel, la protéine Tau est subdivisée en deux domaines: un domaine de projection et un autre de liaison aux microtubules. Le domaine de projection contient une région à charge acide et une autre riche en prolines. Le domaine de liaison aux microtubules contient les quatre domaines répétés (R1 à 4).

A.2) Epissage alternatif de Tau et dégénérescence neurofibrillaire

Les protéines Tau se retrouvent au centre de nombreuses pathologies neurodégénératives caractérisées par la « dégénérescence neurofibrillaire ». La dégénérescence neurofibrillaire, ou DNF, est une lésion cérébrale qui correspond à une accumulation

intracellulaire et anormale de fibrilles de protéines Tau agrégées dans le cytosol des neurones (Brion et al., 1984). Ces fibrilles sont constituées de protéines Tau hyperphosphorylées et anormalement phosphorylées (Brion et al., 1986, Delacourte and Defossez, 1986, Grundke-Iqbal et al., 1986, Wischik et al., 1988). Ces agrégats entraînent alors une rupture du réseau microtubulaire, conduisant à une destruction du cytosquelette et, finalement, à la mort du neurone par DNF (Buée et al., 2000).

La DNF a initialement été décrite par Alois Alzheimer dans le cerveau de patients atteints d'une démence appelée, par la suite, maladie d'Alzheimer. Depuis, la DNF a été retrouvée dans plus d'une vingtaine de maladies neurodégénératives regroupées sous le terme de « Tauopathies ». Parmi elles, on trouve des démences pures, comme la maladie d'Alzheimer et les démences frontotemporales, mais aussi des maladies autres, telles que le syndrome de Down et les Dystrophies Myotoniques de Type 1 et 2 (Figure 15A). La maladie d'Alzheimer représente le cas le plus connu des Tauopathies. Dans la maladie d'Alzheimer, la pathologie Tau est dépendante de la présence d'une autre lésion cérébrale absente des autres tauopathies. Il s'agit des dépôts amyloïdes, issus de clivages protéolytiques de l'APP produisant les peptides A β .

Les mécanismes moléculaires qui contribuent à la DNF sont multiples et restent encore à élucider. Bien que les signes cliniques des tauopathies soient très différents, sur le plan biochimique, celles-ci peuvent être classées en quatre catégories. Cette classification est basée sur le profil électrophorétique des isoformes agrégées et phosphorylées de Tau (Sergeant et al., 2005) (Figure 15B).

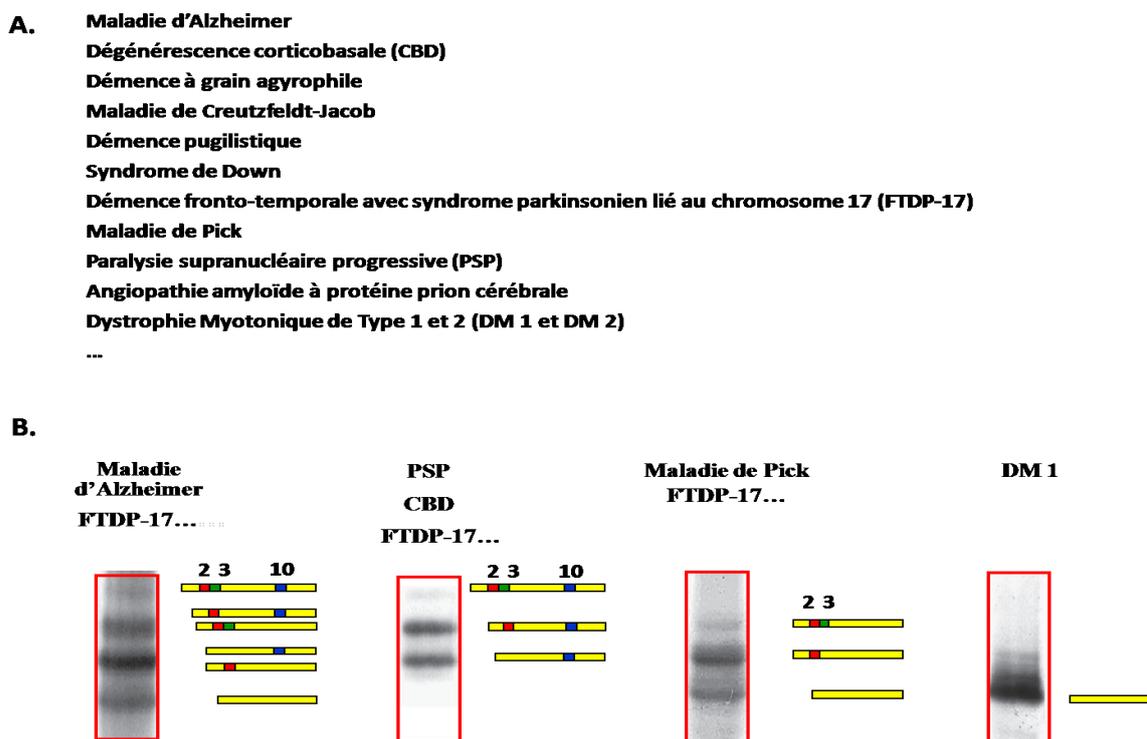


Figure 15: Les Tauopathies et leur classification biochimique (A) Différentes pathologies présentant une dégénérescence neurofibrillaire: les Tauopathies. **(B)** Le profil biochimique de Tauopathies. L'analyse électrophorétique des isoformes phosphorylées de Tau permet de classer les Tauopathies en 4 catégories selon les isoformes retrouvées dans les agrégats. (D'après Sergeant et al., 2005)

Si cette classification permet de mieux appréhender la DNF, elle n'en réduit pas pour autant la complexité. Dans certains cas, il est pensé que ce profil pourrait résulter d'un processus dégénératif sélectif à certaines populations neuronales, exprimant un lot spécifique d'isoformes de Tau (Buée and Delacourte, 2006). Dans d'autres cas, le profil d'isoformes agrégées de protéines Tau résulte d'un changement dans leur épissage alternatif. Il en est ainsi pour certains cas de démences frontotemporales avec syndrome parkinsonien lié au chromosome 17 (FTDP-17). Dans ces cas, la DNF est due à des mutations exoniques ou introniques qui perturbent l'épissage alternatif de l'exon 10. Ces mutations peuvent conduire à une augmentation d'inclusion (Hutton et al., 1998, Spillantini et al., 1998, D'Souza et al., 1999, Grover et al., 2002, Yoshida et al., 2002, Connell et al., 2005) ou d'exclusion de l'exon (D'Souza et al., 1999, Rizzu et al., 1999). Ces cas familiaux démontrent qu'une dérégulation de l'épissage alternatif de Tau peut être à l'origine de la DNF et souligne l'importance de la régulation spatio-temporelle de ce

processus dans la physiologie du neurone. Une rupture d'équilibre entre les isoformes de Tau a été reportée dans d'autres tauopathies. Par exemple, une association entre mutation du gène de Tau et un défaut d'épissage alternatif de l'exon 10 existe dans plusieurs cas de paralysie supranucléaire progressive (PSP) (Stanford et al., 2000, Pastor et al., 2002, D'Souza and Schellenberg, 2000, Ros et al., 2005). En outre, ici, il existe une association entre un haplotype de Tau, l'haplotype H1, la dérégulation de la balance 3R/4R et le risque de développer la maladie (Baker et al., 1999, Pittman et al., 2004, Di Maria et al., 2000, Houlden et al., 2001, Caffrey et al., 2006, Myers et al., 2007).

Par ailleurs, des dérégulations de l'épissage alternatif des exons 2 et 10 ont été décrits dans des cas sporadiques de la maladie d'Alzheimer (Conrad et al., 2007, Yasojima et al., 1999, Glatz et al., 2006, Ginsberg et al., 2006). Reste à expliquer la signification et la contribution de telles altérations à cette pathologie complexe et pas encore complètement élucidée.

Parmi les tauopathies, la Dystrophie Myotonique demeure un cas intéressant. En effet, une DNF ainsi qu'une baisse d'inclusion des exons 2 et 3 de Tau ont été observées dans la Dystrophie Myotonique de Type 1 et 2 (Vermerch et al., 1996, Sergeant et al., 2001, Maurage et al., 2005). De plus, une baisse d'inclusion de l'exon 10 a également été reportée dans la DM1 (Jiang et al., 2004). La DM1 constitue donc un cas où un défaut d'épissage alternatif de Tau semble être associé à une DNF. Néanmoins, il est important de rappeler ici que les dérégulations d'épissage alternatif dans les cerveaux de patients atteints de cette pathologie ne concernent pas uniquement le transcrite de Tau. De manière curieuse, en plus du transcrite du récepteur NMDAR1, le défaut d'épissage touche également le transcrite du précurseur du peptide amyloïde (APP) (Jiang et al., 2004). Dans la DM1, l'exon 7 de l'APP devient préférentiellement exclu. Les conséquences de cette dérégulation dans la DM1 ne sont toujours pas connues. Cependant, des travaux menés sur l'épissage alternatif de l'APP ont montré que l'exclusion des exons alternatifs 7 et 8 favorisait la production de peptides A β (Donev et al., 2007). Ainsi, il serait intéressant de savoir si la DM1 représente un deuxième cas similaire à la maladie d'Alzheimer, où la pathologie Tau interagirait avec la pathologie amyloïde.

A.3) Régulation et dérégulation de l'épissage alternatif de Tau dans la DM1

Dans le cerveau de patients atteints de DM1, le défaut d'épissage alternatif de Tau concerne tous ses exons alternatifs: 2, 3, 6 (même si son insertion au niveau du cerveau est mineure) et 10 (Sergeant et al., 2001, Jiang et al., 2004, Leroy et al., 2006a). Dans le cas des exons cassettes 2, 3 et 10, il s'agit d'une augmentation d'exclusion. Dans le cas de l'exon 6, c'est l'isoforme 6c qui diminue au profit de l'isoforme 6d. Un défaut d'épissage alternatif de l'exon 2 de Tau a également lieu dans le muscle (Leroy et al., 2006a). Ici aussi, comme dans le cerveau, il s'agit d'une augmentation d'exclusion. En revanche, la dérégulation de l'exon 6, qui a lieu dans le cerveau, ne se produit pas dans le muscle. Cette différence souligne l'importance de la spécificité tissulaire dans la régulation et la dérégulation de l'épissage alternatif dans la DM1.

- **Exon 2**

Dans le cerveau, l'épissage alternatif de l'exon 2 conduit à son inclusion dans à peu près 50% des transcrits de Tau. On le retrouve ainsi dans le cortex cérébral, le cervelet et l'hippocampe. Dans la moelle épinière, il est exprimé à des proportions un peu moins importantes. Il est aussi présent dans le système nerveux périphérique et le muscle squelettique où il est constitutivement inclus (Andreadis, 2005, Wei et al., 1998, Leroy et al., 2006a).

L'exon 2 est régulé par plusieurs éléments *cis* régulateurs. Au sein de l'exon, on trouve un élément «silencer» situé dans les 20 premiers nucléotides au niveau de l'extrémité 5' de l'exon (Wang et al., 2005). Cette séquence est riche en pyrimidine et permet la fixation d'un complexe protéique SRp30/SRp55/htra2 β 1 (Wang et al., 2005). En juxtaposition à ce «silencer», se trouve un élément «enhancer» particulièrement fort correspondant à une séquence riche en purines (Wang et al., 2005). A travers cet «enhancer», agissent les facteurs Nova1, SLM1 et 2 et CELF 4 (Figure 16) (Li et al., 2003). Un autre élément de régulation de l'exon 2 est présent, cette fois-ci, au niveau intronique, en aval de l'exon, entre +471 et +840 nucléotides (Li et al., 2003). Il s'agit d'un élément «silencer». La région contenant cet élément possède des motifs de fixation pour les facteurs PTB, nPTB et CELF4,

tous capables de réguler l'épissage de l'exon 2 (Figure 16). Un «silencer» intronique est également présent en amont de l'exon, entre les nucléotides -571 et -281 (Li et al., 2003). Par ailleurs, l'épissage de cet exon est influencé par les exons flanquants (Li et al., 2003). L'implication d'autres facteurs *trans* dans la régulation de l'épissage alternatif de l'exon 2 a été mise en évidence dans notre laboratoire. Il s'agit de facteur ETR-3 qui exerce un effet répresseur et Mbnl1 qui, lui, exerce un effet activateur (Leroy et al., 2006b, Dhaenens et al., 2008). Les éléments *cis* impliqués dans l'effet de ces facteurs n'ont cependant pas encore été identifiés (Figure 16).

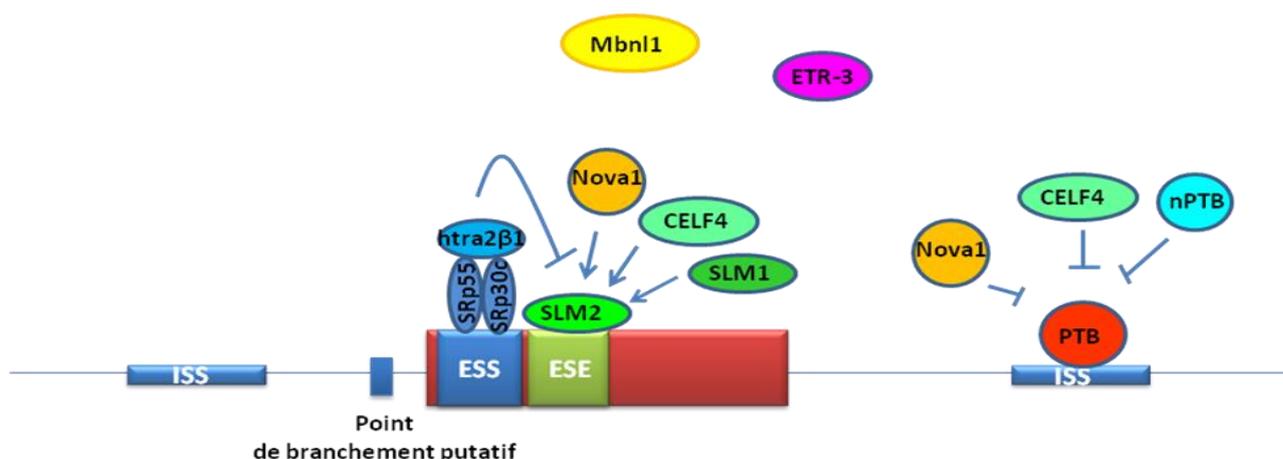


Figure 16: Régulation de l'épissage alternatif de l'exon 2 de Tau. En amont de l'exon 2 se trouve un point de branchement putatif. L'exon contient un élément enhancer « ESE » et un silencer « ESS ». L'ESS fixe le complexe protéique SRp55, SRp30c et htra2β1 qui inhibe son épissage. L'ESE, en revanche, active l'épissage à travers les facteurs SLM1 et 2, Nova1 et CELF4. SLM2 fixe l'ESE tandis que Nova 1 agit de manière indirecte. Au niveau intronique, on retrouve deux ISS, l'un en amont et l'autre en aval de l'exon. L'ISS présent en aval fixe la protéine PTB. Son action est inhibée par Nova1, nPTB et CELF4. Les facteurs ETR-3 et Mbnl1 régulent l'épissage de l'exon 2, mais leurs sites de fixations sont inconnus. Les flèches indiquent des effets activateurs et les traits des effets inhibiteurs. Cette représentation n'est pas à l'échelle. (D'après Andreadis, 2005)

• Exon 3

Comme pour l'exon 2, les fonctions exactes de l'exon 3 sont mal établies. Dans le système nerveux central, cet exon est épissé de manière alternative et s'exprime dans le cortex cérébral, le cervelet et l'hippocampe dans 10% des transcrits. On le retrouve également dans le système nerveux périphérique, mais, ici, il devient constitutivement inclus. Le muscle représente un organe où l'exon 3 est particulièrement enrichi puisque, ici, il est incorporé dans 20 à 40% des transcrits (Andreadis, 2005).

L'exon 3 de Tau représente un cas rare dans la régulation de l'épissage alternatif. En effet, l'exon 3 n'est jamais inclus sans l'exon 2, mais l'inclusion de l'exon 2 n'induit pas forcément celle de l'exon 3. Au point de vue de la régulation, en *cis*, l'exon 3 fait appel à des points de branchement et des séquences polypyrimidine de faibles effets (Andreadis et al., 1995, Arikan et al., 2002). En réalité, la région intronique en amont de l'exon 3 contient deux points de branchement avec deux séquences polypyrimidine. La séquence nucléotidique du premier point de branchement est très proche de la séquence consensus, mais se situe un peu loin du site 3' accepteur d'épissage, à -90 nucléotides (Figure 17). Le deuxième point de branchement, plus proche (situé à -50 nucléotides), est plus dégénéré avec une séquence polypyrimidine plus courte (Figure 17) (Andreadis et al., 1995). Cette inefficacité des sites de branchement joue un rôle inhibiteur dans la régulation de l'épissage alternatif de l'exon 3 (Arikan et al., 2002). L'exon 2 contribue aussi à cette régulation, mais la présence de ce dernier a plutôt un effet activateur (Andreadis et al., 1995). Enfin, la régulation en *cis* de l'exon 3 implique plusieurs éléments régulateurs exoniques de types «enhancers» et «silencers». L'un des «silencers» contient une séquence TTAG forte, impliquée dans la répression de l'épissage de l'exon 10 de Tau (Gao et al., 2000, D'Souza et al., 1999). Quant aux «enhancers», l'un d'entre eux agit en diminuant la complémentarité de la snRNP U1 avec le site 5' donneur d'épissage (Figure 17).

Au niveau de la régulation en *trans*, les protéines SRp55, SRp75 et SLM2 agissent comme activateurs, tandis que SRp20, SRp30 b et c, htra2β1, ASF, hnRNP A1, SWAP, Nova1, KSRP, et les protéines de la famille CELF, CELF3 et CELF4 sont répresseurs (Arikan et al., 2002, Stoss et al., 2001, Andreadis et al., 2005). La figure 17 montre un modèle proposé de régulation de l'épissage alternatif de l'exon3.

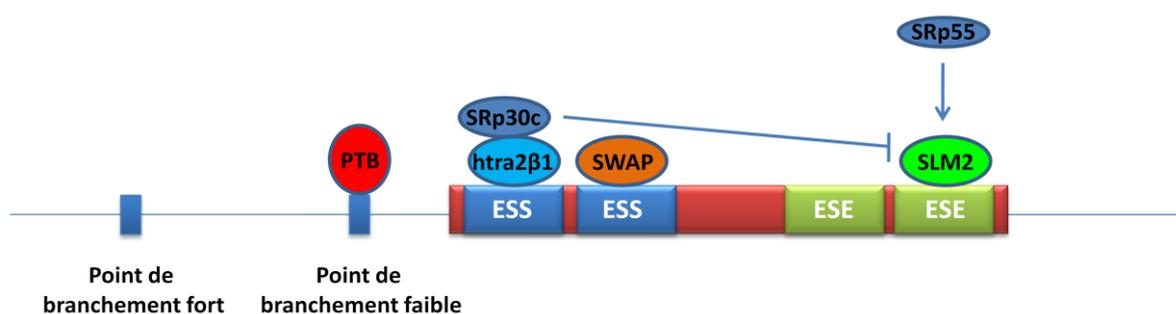


Figure 17: Régulation de l'épissage alternatif de l'exon 3 de Tau. L'exon 3 de Tau contient deux éléments «enhancers» et deux éléments «silencers». Au niveau intronique, la régulation de l'épissage alternatif de l'exon 3 implique deux sites de branchement. En *trans*, les protéines htra2β1, SWAP et SRp30c agissent comme répresseurs, tandis que SLM2 et SRp55 agissent comme activateurs. Les flèches indiquent des effets activateurs et les traits des effets inhibiteurs. (D'après Andreadis, 2005)

• Exon 6

Parmi les exons alternatifs de Tau dans le cerveau, l'exon 6 fait exception puisque c'est le seul inclus dans le cerveau fœtal (Wei and Andreadis, 1998). Une autre particularité de cet exon est sa capacité à utiliser trois sites 3' accepteurs d'épissage. En plus du site canonique, appelé 6c, son épissage peut impliquer deux sites cryptiques nommés 6p et 6d (Figure 18) (Wei et al., 2000, Wei and Andreadis, 1998). L'utilisation de ces sites cryptiques génère un codon STOP juste en aval de l'exon. Comme conséquence de ce décalage du cadre de lecture, on aboutit à la synthèse de protéines Tau sans domaine de liaison aux microtubules (Figure 18) (Luo et al., 2004a). Les fonctions de l'exon 6 sont mal connues. Son inclusion dans une région charnière après le domaine de projection allonge ce domaine et pourrait ainsi intervenir dans l'espacement entre les microtubules (Gache et al., 1993, Mavilia et al., 1994). Les isoformes 6p et 6d, qui ne possèdent pas de domaine de liaison aux microtubules, pourraient exercer un effet compétiteur avec les protéines Tau entières et ainsi réguler leur effet (Wei and Andreadis, 1998). De plus, l'exon 6 est potentiellement impliqué dans la différenciation neuronale où il jouerait un rôle inhibiteur (Luo et al., 2004b).

Cet exon est mineur. Son insertion dans l'ARNm est faible chez le fœtus et devient plus forte chez l'adulte. Il est exprimé dans le système nerveux central (cervelet et hippocampe), et, plus fortement, dans la moelle épinière et le muscle squelettique (Wei and Andreadis, 1998). Dans le cerveau, l'isoforme majoritaire est la 6c, tandis que la moelle épinière et le muscle expriment les isoformes 6c et 6p. Dans la DM1, une altération de l'épissage alternatif de cet exon conduit à une baisse de l'isoforme 6c au profit de l'isoforme 6d (Leroy et al., 2006a). Cette dérégulation observée dans le cerveau est absente dans le muscle (Leroy et al., 2006a), mettant en évidence le fait que certaines dérégulations de l'épissage alternatif dans la DM1 peuvent être tissus spécifiques.

Quant à la régulation de l'épissage de cet exon, le ratio entre les 3 isoformes, et donc le choix dans l'utilisation des sites cryptiques, repose sur l'affinité entre leur point de branchement et la machinerie d'épissage (Wei et al., 2000). L'intron situé directement en amont de l'exon 6 joue également dans sa régulation (Wei et al., 2000). A cela, vient s'ajouter un rôle des exons flanquants (Andreadis et al., 1993). Il a en effet été montré que

l'exon 5 favorise l'inclusion de l'exon 6 alors que l'exon 7 entre en compétition avec lui (Wei and Andreadis, 1998).

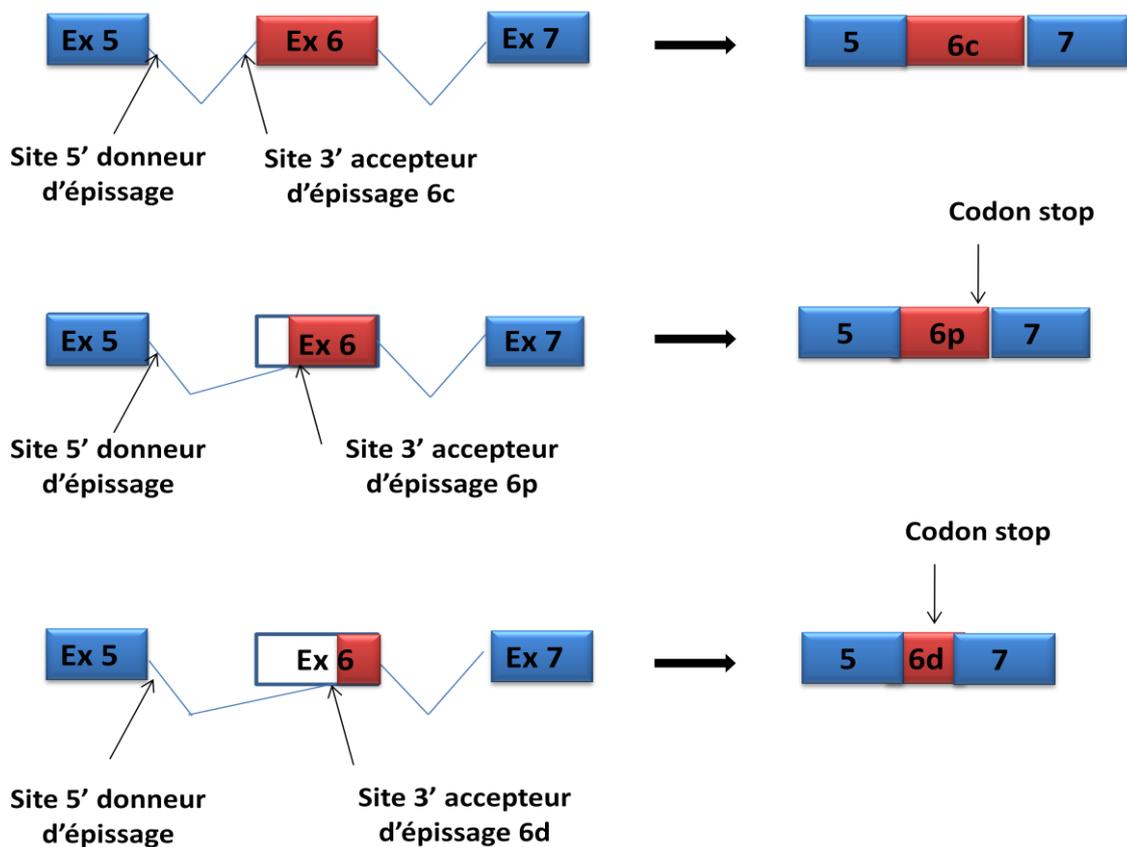


Figure 18: Epissage alternatif de l'exon 6 de Tau. En plus du site 3' accepteur canonique, l'épissage alternatif de l'exon 6 peut faire appel à deux sites cryptiques. L'utilisation du site canonique, 6c, génère une isoforme de Tau qui contient l'exon 6. En revanche, l'utilisation des sites cryptiques 6p et 6d génère des isoformes tronquées par apparition d'un codon stop prématuré. Ces isoformes ne possèdent donc pas de domaine de liaison aux microtubules.

Quant à la régulation en *trans* de cet exon, il est connu que les points de branchement de l'exon 6 sont régulés par les facteurs U2AF, PTB, nPTB, hnRNPA1, hnRNPG, YT521BB, SWAP, Nova1, SLM 1 et 2, CELF 5 et 6, 9G8, SRp20, SRp40, SRp55, SRp75, SRp30c, KSRP et ASF (Wei et al., 2000, Leroy et al., 2006b, Wang et al., 2007a).

• Exon 10

Comme les exons 2 et 3, l'exon 10 est exprimé dans le système nerveux central où il est épissé de manière alternative. Dans le cerveau, il est inclus dans à peu près 50% des transcrits. En revanche, dans le système nerveux périphérique, il est constitutivement inclus. Cet exon s'exprime également dans le muscle squelettique où il est incorporé dans la moitié des ARNm de Tau (Andreadis, 2005, Goedert et al., 1989a, Couchie et al., 1992, Goedert et al., 1992, Gao et al., 2000).

La plupart des informations dont on dispose sur la régulation de l'exon 10 viennent d'études de tauopathies. En effet, cet exon a longtemps focalisé les regards sur lui pour son implication dans les démences de type FTDP-17. En réalité, c'est la découverte de mutations dans le gène de Tau dans cette pathologie qui a permis de démontrer qu'une anomalie de la protéine pouvait déclencher une neurodégénérescence sévère (Poorkaj et al., 1998, Hutton et al., 1998, Spillantini et al., 1998). Parmi ces mutations, certaines touchent à la séquence codante du gène (exons 1, 9, 10, 11, 12, 13). Il s'agit ici de mutations faux-sens et de délétions qui modifient l'affinité de Tau pour les microtubules. La deuxième classe de mutations correspond à celles altérant l'épissage alternatif de l'exon 10. Ces mutations sont des mutations faux-sens, des mutations silencieuses, des délétions et des mutations introniques. Elles affectent des éléments *cis* régulateurs d'épissage, ou le site 5' donneur de l'exon, ayant pour conséquence un changement du ratio 3R/4R dans le neurone (Hutton et al., 1998, Spillantini et al., 1998, D'Souza et al., 1999, Grover et al., 2002, Yoshida et al., 2002, Connell et al., 2005, Rizzu et al., 1999). C'est ainsi que la découverte de ces mutations a permis d'identifier plusieurs éléments *cis* régulateurs exoniques et introniques et de révéler la présence d'une structure secondaire impliquée dans la régulation de l'épissage de l'exon 10 (D'Souza and Schellenberg, 2005, Andreadis, 2005).

L'extrémité 5' de l'exon 10 contient 3 éléments «enhancers» : un «enhancer» SC-35 Like, un «enhancer» riche en purines (Polypurine Enhancer, PPE) et un «enhancer» riche en A et C (ACE riche enhancer) (Figure 19). A la suite de cette région, se trouve un «silencer» exonique, suivi par un dernier «enhancer» situé à l'extrémité 3' de l'exon (Figure 19). Ainsi, presque tout l'exon est impliqué dans sa régulation. Au niveau intronique se trouve un

élément bipartite composé d'un «silencer» (ISS) et d'un modulateur (ISM) (Figure 19). Il est intéressant de noter ici que l'ISS et l'ISM exercent des effets opposés (D'Souza and Schellenberg, 2000). L'ISM n'a pas d'effet en lui-même, mais agit en contrebalançant l'effet du «silencer». En plus des éléments *cis*, l'exon 10 fait également appel à la structure pour réguler son épissage. La haute auto-complémentarité à l'interface exon-intron au niveau de l'extrémité 3' de l'exon suggère la présence d'une structure en tige et boucle à ce niveau (Figure 18).

Plusieurs facteurs régulant l'épissage alternatif de l'exon 10 sont connus à ce jour. Parmi eux, on trouve des activateurs tels que ASF, SC35, SRp30c, htra2β1 et les CELF 3 et 4. Mais, on trouve aussi beaucoup de répresseurs comme SRp20, 9G8, SRp54, SRp55, SRp75, PTB, hnRNP G, SWAP, KSRP et Nova1 (Andreadis et al., 2005, Liu and Gong, 2008).

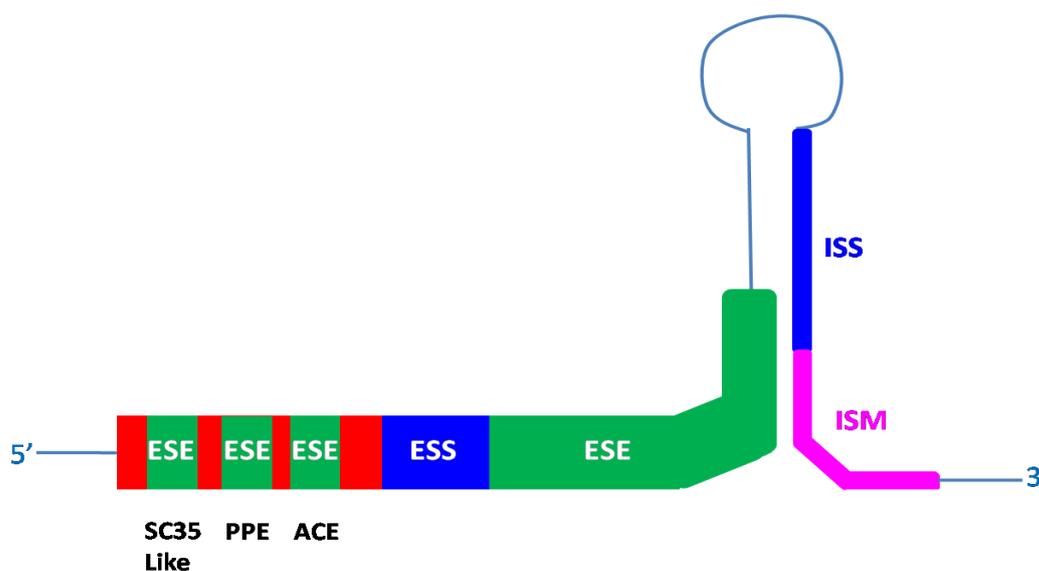
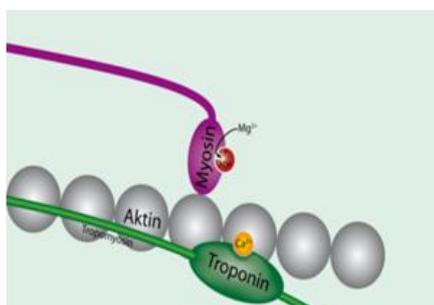


Figure 19: Structure de l'exon et de l'intron 10 de Tau. L'exon 10 contient plusieurs éléments de régulation: quatre enhancers (ESE) et un silencer (ESS). Les trois premiers ESE du côté 5' de l'exon correspondent respectivement à une séquence SC-35, un enhancer polypurine (PPE) et un enhancer riche en A/C (ACE). Ces éléments sont suivis par un ESS qui juxtapose un autre ESE à effet plus faible. L'intron 10 contient également des éléments de régulation. Il s'agit d'un silencer (ISS) suivi d'un élément modulateur d'épissage (ISM). Une complémentarité entre les nucléotides présents du côté 3' de l'exon et l'intron 10 conduit à la formation d'une structure secondaire en tige et boucle. (D'après Liu and Gong, 2008)

B) La Troponine T cardiaque (cTNT)

La troponine est un hétérotrimère qui comprend la troponine C, la troponine I et la troponine T. Dans ce complexe de troponines, la troponine T agit avec la tropomyosine pour réguler la contraction du muscle grâce à son interaction avec les filaments d'actine et de myosine. La troponine T assure le lien entre le complexe de la troponine et la tropomyosine pour participer à un changement conformationnel qui conduit à l'interaction entre actine et myosine et donc à la contraction du muscle (Figure 20). Cette protéine est sensible aux variations du taux de calcium intracellulaire qui régule indirectement son action (Figure 19) (Solaro and Van Eyk, 1996). La troponine T cardiaque (cTNT) correspond à la forme cardiaque de la troponine T, mais elle est également exprimée dans le muscle squelettique. cTNT joue un rôle dans la fibrillogénèse du muscle (White et al., 1987, Epstein and Fischman, 1991) et sa mutation conduit à des cardiomyopathies (Thierfelder et al., 1994, Maron et al., 2002, Kamisago et al., 2000).

A.



B.

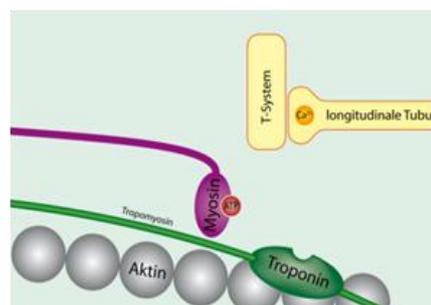


Figure 20: Rôle du complexe de troponine dans la contraction musculaire. (A) En présence de calcium, la tropomyosine est liée à l'actine permettant l'action de la myosine. **(B)** En absence de calcium, la tropomyosine est non liée à l'actine ce qui empêche l'action de la myosine. (D'après Wikipedia)

B.1) Le gène, les isoformes et les protéines

- **Le gène** : Le gène de la troponine T (*TNNT2*) se situe sur le chromosome 1 en position 1q32. Il s'étend sur 17 kb.
- **Les isoformes** : *TNNT2* est composé de 17 exons. Parmi eux, les exons 4 et 5 sont alternatifs et codent pour des peptides présents coté N-terminale de la protéine. L'exon 4 code pour 5 acides aminés tandis que l'exon 5 code pour 10 acides aminés. Leur épissage génère quatre isoformes appelées TnT 1 à 4 qui correspondent respectivement aux isoformes 4+5+, 4-5+, 4+5-, et 4-5-. Ces quatre isoformes s'expriment dans le cœur et le muscle squelettique, mais leur expression évolue au cours du développement (Anderson et al., 1995, Mesnard et al., 1995). Dans le cœur fœtal, l'isoforme majeure est laTnT1 où on retrouve les deux exons alternatifs. Chez l'adulte, l'exon 5 devient exclu et c'est l'isoforme 4+5- qui devient dominante. Dans le muscle squelettique, *TNNT2* s'exprime chez le fœtus, mais devient silencieux chez l'adulte (Cooper et al., 1984).
- **Les protéines**: La présence de différentes isoformes de cTNT est importante pour la régulation de la contraction musculaire en fonction de la teneur en calcium. Il a été montré que l'isoforme 4+5+ était plus sensible à la variation du calcium que les isoformes 4+5- et 4-5-. Les exons alternatifs de cTNT, et notamment l'exon 5, sont donc importants pour le contrôle de la force musculaire (Gomes et al., 2004, Reiser et al., 1992, Ogut et al., 1999, Nassar et al., 1991).

B.2) Régulation et dérégulation de l'épissage alternatif de cTNT dans la DM1

La régulation de la Troponine T cardiaque (cTNT) au cours du développement représente l'un des cas les mieux illustrés dans la littérature. Un changement dans le profil d'épissage de l'exon 5 de cTNT de l'inclusion vers l'exclusion au cours du développement est un phénomène qui est hautement conservé parmi les espèces. Ce changement est, en effet, retrouvé chez l'homme, la souris, le rat et le poulet (Cooper and Ordahl, 1985, Jin and Lin, 1989, Townsend et al., 1995). Ceci suggère l'existence de mécanismes de régulation communs entre les espèces, ce qui a valu à cTNT une attention particulière. Dans la DM1,

le défaut d'épissage de cTNT conduit à une inclusion préférentielle de l'exon 5, ce qui correspond à un profil d'épissage de type fœtal (Philips et al., 1998).

Chez le poulet, il a été montré que la régulation d'épissage alternatif de l'exon 5 implique un «enhancer» exonique et plusieurs «enhancers» introniques (Figure 21). L'enhancer exonique (ESE) se situe du côté 5' de l'exon et lie les facteurs SRp40, SRp55, SRp75 et SRp30a (Figure 21) (Ramchatesingh et al., 1995, Nagel et al., 1998, Stark et al., 1998). Au niveau intronique, l'équipe de Tom Cooper a décrit quatre enhancers (ISE) situés dans les régions proches de l'exon. L'un d'entre eux est situé en amont de l'exon et les trois autres en aval (Ryan et al., 1996, Cooper, 1998). L'effet de ces ISE fait intervenir des facteurs dont l'expression dépend du facteur de transcription myogénique MyoD. Pour cette raison, l'équipe de Cooper les a baptisés MSE, pour Muscle Specific Enhancers (Figure 21). La présence d'un Silncer intronique (ISS) au sein du MSE2 a également été suspectée, mais n'a pas été démontrée pour autant (Cooper, 1998).

Au cours du développement, la régulation de l'exon 5 de cTNT résulte d'un contrôle combinatoire entre facteurs à effets activateurs et répresseurs. Parmi les facteurs activateurs, toutes les protéines de la famille CELF induisent l'inclusion de l'exon 5 de cTNT du poulet (Figure 21) (Philips et al., 1998, Ladd et al., 2001, Ladd et al., 2004, Charlet-B et al., 2002a). L'effet de ces activateurs est contrebalancé par celui des protéines répresseurs, PTB et Mbnl1. Ces dernières lient les éléments introniques pour induire l'exclusion de l'exon 5 (Figure 21) (Charlet-B et al., 2002a, Ho et al., 2004). Il est intéressant de noter que, lors du développement du cœur, le changement d'épissage de l'exon 5 est corrélé à des variations d'expression des facteurs régulateurs antagonistes. L'expression des répresseurs diminue alors que celle des activateurs persiste permettant, de cette manière, l'inclusion de l'exon chez l'adulte (Ladd et al., 2001, Ladd et al., 2005, Kalsotra et al., 2008, Wang et al., 2007b, Ho et al., 2005). La figure 21 récapitule nos connaissances sur la régulation de l'exon 5 de cTNT chez le poulet.

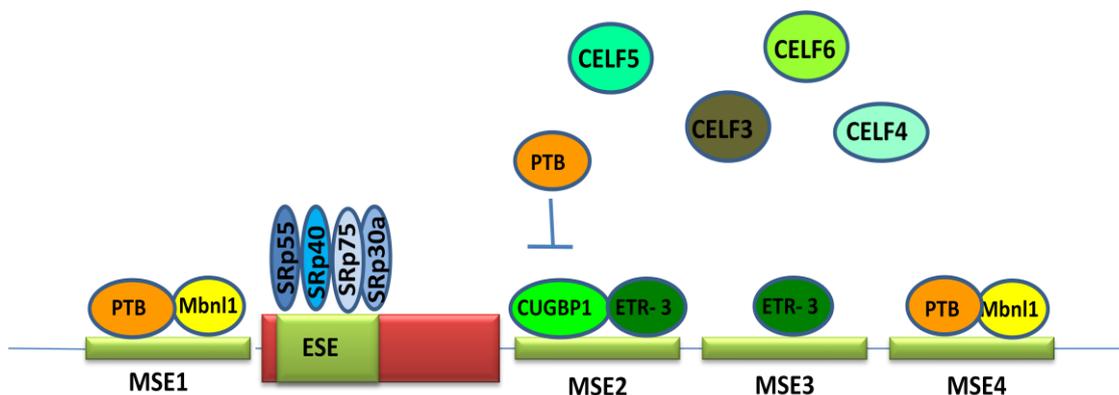


Figure 21: Régulation de l'épissage alternatif de l'exon 5 de la Troponine T cardiaque (cTNT) du poulet. L'exon 5 de cTNT est régulé par un «enhancer» exonique (ESE), et quatre autres introniques appelés MSE 1 à 4 (Muscle Specific Enhancers). Ils tirent leur nom de leur implication dans une régulation spécifique du muscle. Plusieurs protéines SR favorisent l'inclusion de l'exon en fixant l'ESE. Au niveau intronique, PTB et Mbn1 qui lient les MSE1 et 4 inhibent l'épissage, tandis que toutes les protéines CELF l'activent. ETR-3 fixe le MSE 2 et 3, tandis que CUGBP1 ne se fixe que sur le MSE2. PTB peut entrer en compétition avec CUGBP1 et empêcher son action sur ce site. (Daprès Ladd et al., 2005)

Récemment, il a été montré que ETR-3 se fixait en aval de l'exon 5 de cTNT pour recruter la snRNP U2 au niveau du site de branchement présent, lui, en amont de l'exon (Goo et al., 2009). Cette capacité à recruter le spliceosome sur un site présent du côté opposé de l'exon souligne le dynamisme des interactions ARN/protéine et l'importance des remaniements de l'ARN dans ces mêmes interactions. De même, il a été montré que le facteur Mbn1 se fixait en amont de l'exon 5 sur le transcrit humain pour induire l'exclusion de l'exon par la stabilisation d'une structure secondaire en tige et boucle (Warf and Berglund, 2007).

Objectifs de l'étude

La Dystrophie Myotonique de type 1 est une maladie génétique à transmission autosomique dominante. Elle est due à une mutation particulière qui correspond à une expansion pathologique de triplets CTG non traduits. A ce jour, l'hypothèse physiopathologique majeure expliquant l'atteinte multi-systémique de la DM1 est celle de l'effet *trans*-dominant sur l'épissage alternatif. Les organes les plus touchés sont le muscle squelettique, le cœur et le cerveau où les défauts d'épissage alternatif concernent plusieurs transcrits et favorisent l'expression d'isoformes fœtales. Il est largement admis que la majorité de ces défauts d'épissage sont dus aux altérations des facteurs régulateurs des familles CELF et Muscleblind. Ces facteurs sont impliqués dans la régulation développementale de l'épissage alternatif de plusieurs transcrits altérés dans la DM1 (Kalsotra et al., 2008, Lin et al., 2006). Ces observations évoquent l'éventuelle possibilité d'un mécanisme de dérégulation commun aux différents transcrits impliquant les familles Muscleblind et CELF. Afin d'envisager une telle hypothèse, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de dérégulation de l'épissage alternatif des transcrits de Tau et cTNT, tous les deux altérés dans la DM1. Nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur les éléments *cis* régulateurs d'épissage afin de déterminer les éléments ciblés par l'effet de la mutation et de vérifier si ces mêmes éléments étaient impliqués dans l'effet des facteurs Muscleblind et CELF.

Dans le cas du transcrit de Tau, une altération de l'épissage alternatif des exons 2, 3, 6 et 10 a été décrite dans les cerveaux de patients atteints de DM1. Ces altérations d'épissage sont accompagnées par une dégénérescence neurofibrillaire, signe histopathologique d'une atteinte cérébrale. Des cas familiaux rares de démences héréditaires de type Tauopathies (FTDP-17) ont permis de mettre en évidence plusieurs éléments *cis* régulateurs d'épissage de l'exon 10. Cependant, ceux de l'exon 2, incorporés dans 50% des transcrits de Tau dans le cerveau, restent encore mal connus. C'est pourquoi nous avons cherché à identifier les éléments *cis* impliqués dans la régulation de l'épissage alternatif de l'exon 2 en temps normal et en réponse aux expansions de triplets CTG.

La régulation en *cis* de l'épissage alternatif du transcrit de cTNT est elle aussi peu connue. En effet, la majorité des travaux ont été menés sur le poulet et peu d'informations existent sur la régulation chez l'homme. Ainsi, nos travaux ont également pour but d'explorer les mécanismes de régulation et de dérégulation d'épissage du transcrit humain de cTNT, transcrit dont les mécanismes de dérégulation dans la DM1 restent très étudiés.

Matériels et Méthodes

I) CULTURE CELLULAIRE

A.1) Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires SY5Y et T98 sont d'origine cérébrale et proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection). Les SY5Y sont un sous-clone de la lignée de neuroblastome humain SK-N-SH et les T98 sont issues d'un glioblastome humain.

A.2) Entretien des lignées

Les cellules sont entretenues dans des boîtes de culture où elles poussent en monocouche dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium ; Gibco Invitrogen Corporation®) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (PPA®), 50 Unités/ml de pénicilline/stréptomycine (Gibco Invitrogen Corporation®), 2mM de L-glutamine (Gibco Invitrogen Corporation®) et 1% d'acides aminés non essentiels (Gibco Invitrogen Corporation®). Les cellules sont cultivées en atmosphère humide contenant 5% de CO₂ à 37°C.

Le milieu de culture est changé tous les deux jours et les cellules réensemencées à sub-confluence.

A.3) Différenciation neuronale

La différenciation des SY5Y en cellules de type neuronal a lieu dans des flasques revêtues d'une couche de poly-L-Lysine et de Laminine. La différenciation est réalisée de trois manières différentes:

- Différenciation à l'acide rétinoïque : Ici les cellules sont ensemencées à 10% de confluence puis la différenciation induite par un traitement de 10 jours avec 10 µM d'acide rétinoïque (Sigma Aldrich®) dans un milieu DMEM F12 (Gibco Invitrogen Corporation®) dépourvu de sérum et contenant 1% de l'Insuline-Transferrine-Selenium

1X (Gibco Invitrogen Corporation®), 6,3 µg/ml de progestérone (Sigma Aldrich®), 50 µg/ml de gentamycine (Gibco Invitrogen Corporation®), 0,1% d'Ampho B (Sigma Aldrich®), 2mM de L-Glutamine (Gibco Invitrogen Corporation®) et 1% d'acides aminés non essentiels (Gibco Invitrogen Corporation®). Les cellules traitées sont maintenues à l'abri de la lumière.

- Différenciation par l'acide rétinoïque puis le BDNF : Les cellules sontensemencées à 10% de confluence, puis traitées avec l'acide rétinoïque à 10 µM (Sigma Aldrich®) pendant 5 jours puis par le BDNF (PeproTech®) à 50 ng/ml pendant 7 jours. La différenciation a lieu dans un milieu Neurobasal (Gibco Invitrogen Corporation®) complété avec du B27 (Gibco Invitrogen Corporation®) (5ml de B27 pour 100ml de Neurobasal) et de la L-Glutamine (Gibco Invitrogen Corporation®) à 500µM.
- Différenciation par l'acide rétinoïque puis le dibutyryl AMP cyclique : Les cellules sontensemencées à 10% de confluence puis traitées à l'acide rétinoïque (Sigma Aldrich®) à 10 µM pendant 5 jours puis par le dbAMPc (Sigma Aldrich®) à 50ng/ml pendant 7 jours. La différenciation a lieu dans le même milieu Neurobasal décrit dans le paragraphe ci-dessus

B) Transfections

B.1) Les vecteurs plasmidiques

B.1.1) Les minigènes

Le minigène ayant servi dans ces études est placé dans le vecteur pSVIRB et provient du Dr A. Andreadis (Université du Massachusetts, Waltham, Massachusetts, USA). Ce minigène a été décrit dans Andreadis et al., (1993) et Andreadis et al., (1995). Il contient trois exons du gène de l'insuline de rat et une portion de leurs séquences introniques flanquantes. Les séquences de Tau et cTNT sont insérées au sein d'un site EcoRI situé dans la région intronique entre les exons 2 et 3 de l'insuline.

Les minigènes 2Δ3 et 2/3 ont été élaborés dans le laboratoire de Dr Andreadis. Le 2Δ3 contient l'exon 2 de Tau avec 878 nucléotides de l'intron situé en amont de l'exon et 2092 nucléotides de l'intron en aval. Le minigène 2/3 contient les exons 2 et 3 de Tau avec 878

nucléotides de l'intron en amont de l'exon 2, 2439 nucléotides de l'intron situé entre les deux exons et 1467 nucléotides de l'intron en aval de l'exon 3. Pour le restant des minigènes de Tau et cTNT, la taille des introns flanquant l'exon est indiquée par le nom du minigène. L'ensemble des minigènes tronqués, à l'exception du 500 E2 2100 ont été élaborés dans le laboratoire du Dr C. Branlant. Le 500 E2 2100 a été élaboré dans notre laboratoire. Le tableau 3 récapitule l'ensemble des minigènes utilisés dans ce travail.

Nom de la construction (E= exon)	Taille de l'intron en amont de l'exon alternatif	Taille de l'intron en aval de l'exon alternatif
Minigènes Tau		
2Δ3	878 pb	2092 pb
2/3	878 pb en amont de l'exon 2 2439 pb en amont de l'exon 3	2439 pb en aval de l'exon 2 1467 pb en aval de l'exon 3
250 E2 250	250 pb	250 pb
500 E2 500	500 pb	500 pb
800 E2 500	800 pb	500 pb
878 E2 1050	878 pb	1050 pb
500 E2 2100	500 pb	2100 pb
Minigènes cTNT		
175 E5 250	175 pb	250 pb
175 E5 150	175 pb	150 pb
150 E5 150	150 pb	150 pb
100 E5 100	100 pb	100 pb
75 E5 75	75 pb	75 pb
50 E5 50	50 pb	50 pb
100 E5 150	100 pb	150 pb
50 E5 150	50 pb	150 pb
150 E5 100	150 pb	100 pb
150 E5 50	150 pb	50 pb

Tableau3: Les différentes constructions de minigènes Tau et cTNT.

B.1.2) Les expansions de triplets

Les constructions contenant les répétitions de CTG sont un don du Dr. T.A. Cooper (Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA) et correspondent à des plasmides pcDNA3.1-V5-His (Invitrogen®) avec un promoteur CMV. Les plasmides contenant 5 et 200 triplets de CTG contiennent une partie de la région 3'UTR de la DMPK de part et d'autre des triplets. Le plasmide contenant 960 triplets CTG contient les 5 derniers exons de la DMPK bordés par leurs introns et l'entièreté de la région 3'UTR. Les 960 répétitions de CTG sont interrompus toutes les 20 répétitions par une séquence CTCGA.

B.1.3) Les facteurs d'épissage

Le vecteur exprimant le facteur d'épissage ETR-3 provient du Dr. T.A. Cooper (Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA). Il a été décrit dans Ladd et al., (2001). Ici, l'ADNc de ETR-3 a été placé dans le vecteur pcDNA3.1-His (Invitrogen®). Quant au facteur d'épissage Mbnl1, il a été cloné dans le laboratoire où l'ADNc de l'isoforme 43 a été placé dans un vecteur pDEST 53-GFP (Invitrogen®).

B.2) Transfections

Les cellules T98 et SY5Y ont été transfectées avec les vecteurs plasmidiques grâce au Fugene HD (Roche®). Les cellules sont transfectées dans des plaques 6 ou 12 puits à 80% de confluence dans un milieu dépourvu d'antibiotiques. La formation du complexe ADN (2µg) / Fugene (6µl) a lieu dans un milieu Optimem (Gibco Invitrogen Corporation®) pendant 20 minutes à température ambiante. En cas de transfection avec deux plasmides différents, les deux plasmides ont été transfectés avec un rapport 1:1. Les cellules sont lysées 48 heures après la transfection et les ARN extraits pour l'analyse.

B.3) Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux des cellules sont extraits sur colonne de silice grâce au kit d'extraction Macherey-Nagel (Nucleospin RNA II, Macherey Nagel®) selon les instructions du fabricant. La concentration et la pureté des ARN est déterminée par mesure de l'absorption par le Nanodrop ND-1000 à 260 nm par rapport à l'absorption à 260/280 nm.

B.4) RT-PCR semi-quantitative

La transcription inverse des ARN en vue de leur analyse par PCR a été réalisée grâce à l'enzyme M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen[®]) et à des amorces d'hexamères aléatoires (Amersham[®]) à partir de 1,5µg d'ARN. Après une dénaturation à 68°C pendant 10 minutes, le mélange réactionnel est chauffé pendant 1 heure à 37°C puis 15 minutes à 70°C. L'ADNc est dilué au ¼ et 5µl sont utilisés pour la réaction de PCR qui est réalisée grâce au kit Platinum PCR SuperMix (Invitrogen[®]). La réaction correspond à une dénaturation de 3 minutes à 94°C suivie de plusieurs cycles d'amplification selon le couple d'amorces utilisé (Voir tableau 3). Un cycle d'amplification correspond à une dénaturation de 30 secondes à 94°C suivie de 30 secondes à la température d'hybridation puis de 1 minute d'élongation à 72°C. L'étape finale d'élongation est effectuée à 72°C pour une durée de 7 minutes.

B.5) Analyse des produits amplifiés

Les produits de RT-PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose de concentration adéquate (3 ou 3,5% d'agarose) et contenant 1% de bromure d'éthidium (Euromedex[®]). Les ampligènes sont visualisés sous ultra-violets grâce au Fluorolmager scanner (Claravision[®]) et quantifiés grâce au logiciel MultiGauge (Fujifilm[®]). Les analyses statistiques ont été effectuées par le test de Mann et Whithney (Mann-Whithney U-test) à partir d'au moins trois expériences indépendantes.

Séquences amplifiées (E=exon)	Amorces utilisées (de 5' vers 3', S=sens, AS=antisens)	Température d'hybridation	Taille des produits amplifiés
Tau E1-E13	S : GTTGGGGGACAGGAAAGATC AS : GTCTACCATGTCGATGCTGC	65°C	1200 pb (2+3+10+)

			1113 pb (2+3-10+) 1107 pb (2+3+10-) 1026 pb (2-3-10-) 1020 pb (2+3-10-) 933 pb (2-3-10-)
Tau E9-E13	S : CATGGCAGACCTGAAGAATGTCAAG AS : TCACAAACCCTGCTTGCCA	65°C	580 pb (10+) 487 pb (10-)
Tau E1-E4	S : TACGGGTTGGGGGACAGGAAAGAT AS : GGGGTGTCTCCAATGCCTGCTTCT	65°C	286 pb (2+3+) 199 pb (2+3-) 112 pb (2-3-)
Minigènes Tau INS1-INS3	S : CAGCTACAGTCGGAAACCATCAGCAAGCAG AS : CACCTCCAGTGCCAAGGTCTGAAGGTCACC	65°C	470 pb (2+3+) 380 pb (2+3-) 290 pb (2-3-)
Minigènes cTNT INS1-INS3	S : CAGCTACAGTCGGAAACCATCAGCAAGCAG AS : CACCTCCAGTGCCAAGGTCTGAAGGTCACC	65°C	310 pb (5+) 290 pb (5-)
18S	S : AAACGGCTACCACATCCAAG AS : CGCTCCCAAGATCCAACACTAC	58°C	250 pb
APP E6-E10	S: GAG GAA CCC TAC GAA GAA CC AS: TTC CTG TTC CAA AGA TTC CA	55°C	503 pb (7+8+) 369 pb (7+8-) 178 pb (7-8-)

Tableau4: Oligonucléotides utilisés en analyse semi-quantitative.

Résultats

I) Phénotype d'épissage fœtal de Tau et effet transdominant des expansions de triplets CTG

Dans le cerveau de patients atteints de DM1, une dérégulation de l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 de Tau conduit à une expression préférentielle de l'isoforme fœtale. Celle-ci correspond à l'exclusion de ces 3 exons alternatifs.

La dérégulation de l'épissage alternatif des exons 2 et 3 dans les cerveaux de patients atteints de DM1 a été mise en évidence dans notre laboratoire (Sergeant et al., 2001). La première phase de ce travail de thèse a consisté à vérifier le lien entre l'expansion de triplets CTG et la diminution d'inclusion de ces deux exons. C'est par la transfection des cellules de glioblastome humain (cellules T98) avec des plasmides exprimant 5, 200 ou 960 triplets CTG que j'ai pu montrer que 960 triplets CTG provoquaient une diminution d'inclusion des exons 2 et 3 de Tau dans ce modèle cellulaire. Ce travail a été réalisé en complément à celui de Claire-Marie Dhaenens qui a montré ce lien dans la lignée cellulaire du col de l'utérus humain (HeLa) (Dhaenens et al., 2008). Ces études ont également mis en évidence que la perte de fonction du facteur Mbnl1 induisait le même effet que les expansions de triplets CTG, à savoir une diminution d'inclusion des exons 2 et 3 de Tau. Ces recherches ont fait l'objet d'une publication qui est jointe ici sous la rubrique « article 1 ».

Une fois établi le lien entre expansions de triplets CTG et dérégulation de l'épissage alternatif des exons 2 et 3 de Tau, nous avons cherché à mieux comprendre les mécanismes moléculaires responsables du phénotype d'épissage pathologique. Cette recherche s'est notamment appuyée sur l'étude d'une lignée cellulaire qui exprime un phénotype d'épissage de Tau semblable à celui trouvé dans la DM1, la lignée de neuroblastome humain (SY5Y). Ces cellules n'expriment pas les expansions de triplets CTG caractéristiques de la DM1. Cependant, d'un point de vue phénotypique sur l'épissage, elles présentent une exclusion des exons 2 et 3 de Tau conformément à ce que l'on observe dans les cerveaux de patients atteints de DM1. Cette observation a alors soulevé

une question: Existe-t-il plusieurs mécanismes moléculaires pour arriver à ce même phénotype d'exclusion? Autrement dit, le mécanisme impliqué dans la DM1 est-il le même que celui responsable du phénotype d'épissage dans la lignée SY5Y?

L'épissage alternatif est régulé par des éléments *cis* et des facteurs *trans*. Son profil final résulte d'un effet combinatoire des ces différents éléments de régulation. Pour mieux comprendre le mécanisme moléculaire à l'origine du profil d'exclusion des exons 2 et 3 de Tau dans la lignée SY5Y, nous avons étudié leur épissage en l'absence de certains éléments *cis* de régulation. Dans ce but, nous avons utilisé un minigène rapporteur d'épissage qui contient les exons 2 et 3 de Tau avec seulement une partie de leur région intronique environnante, ce minigène s'appelle 2/3 (Figure 22A). De manière intéressante, la transfection du minigène 2/3 dans la lignée cellulaire SY5Y montre une inclusion préférentielle de ces deux exons et cela en complète opposition avec le profil d'épissage de Tau endogène, qui, lui, présente une exclusion (Figure 22B). Un résultat similaire est obtenu avec un minigène contenant l'exon 2 avec juste une partie de sa région intronique environnante. Il s'agit du minigène 2Δ3 (Figure 22A et B). Ces résultats démontrent que les régions introniques de Tau endogène, régions manquantes dans les deux minigènes, sont nécessaires à l'exclusion des exons 2 et 3 dans les SY5Y. Ces régions contiennent des éléments *cis* régulateurs nécessaires à l'action des facteurs d'épissage responsables du profil d'exclusion des SY5Y. Ces éléments *cis* doivent être des « silenciers » introniques, puisque, en leur absence, on passe d'un profil d'exclusion des exons 2 et 3 vers un profil d'inclusion.

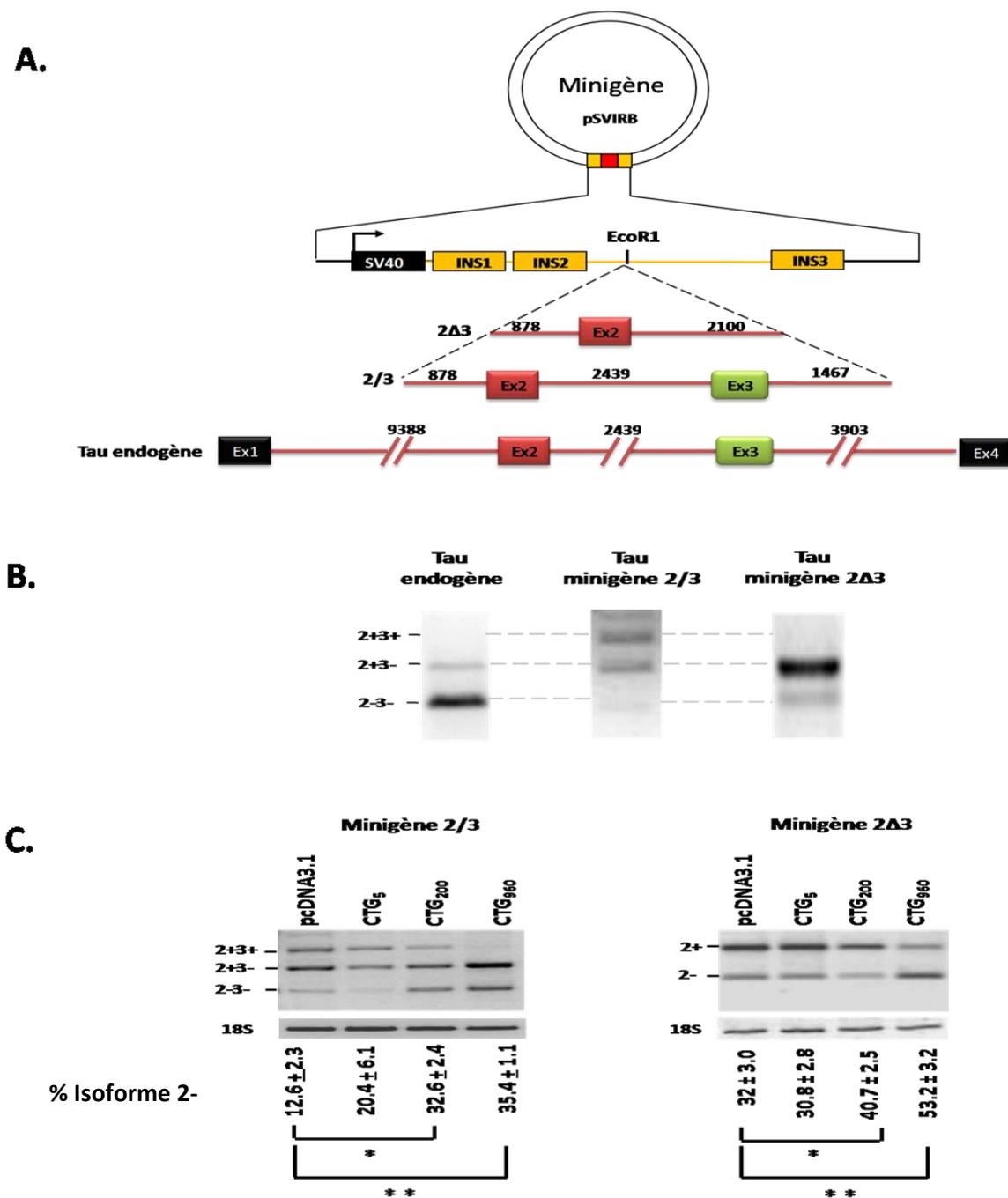


Figure 22: Epissage alternatif de Tau endogène et Tau minigène dans les cellules SY5Y. (A) Le minigène pSVIRB contient un promoteur SV40 suivi par des régions exoniques et introniques de l'insuline de rat (Andreadis et al., 1993). Les exons sont représentés par des rectangles et les introns par des traits. Les séquences introniques de Tau des minigènes 2Δ3 et 2/3 ainsi que du transcrite endogène sont indiquées en paire de base au-dessus de l'intron correspondant. **(B)** L'épissage de Tau a été analysé par RT-PCR grâce à des amorces ciblant les exons 1 et 4 pour le transcrite endogène et les exons INS 1 et 3 pour le transcrite en minigènes. **(C)** Epissage alternatif des minigènes 2Δ3 et 2/3 après leur co-transfection dans les SY5Y, soit avec un plasmide pcDNA vide, soit avec un plasmide pcDNA contenant 5, 200 ou 960 triplets CTG. La significativité des résultats est indiquée par * quand $p < 0.05$ et ** quand $p < 0.001$.

Mais qu'en est-t-il du mécanisme en jeu dans l'effet *trans*-dominant? Implique-t-il les mêmes séquences et les mêmes facteurs? Afin de répondre à cette question, nous avons recherché si les minigènes Tau, bien qu'ils soient dépourvus d'une grande part des éléments *cis* responsables du phénotype d'épissage foetal, étaient capables, ou non, de répondre à l'effet *trans*-dominant des expansions de triplets. Pour cela, chacun des minigènes a été transfecté avec des plasmides contenant 5, 200 ou 960 triplets CTG. Nos résultats montrent que ces minigènes sont capables de répondre à l'effet des expansions. En effet, l'exclusion des exons 2 et 3 augmente en présence des CTG 960 (Figure 22C). Cela signifie que les séquences de Tau insérées dans les minigènes contiennent les éléments *cis* nécessaires à l'action des facteurs d'épissage impliqués dans l'effet *trans*-dominant des CTG. Cet effet des expansions sur les minigènes 2/3 et 2Δ3 de Tau a été confirmé dans une autre lignée cellulaire: la lignée de glioblastome humain T98 (Article 2).

En conclusion, ce travail révèle l'existence de deux voies moléculaires qui mènent au même phénotype d'épissage: l'exclusion des exons 2 et 3 de Tau. Dans l'une des voies, des facteurs d'épissage agissent sur un ou plusieurs «silencers» introniques, présents sur le transcrit endogène et absents des minigènes. Dans l'autre, des éléments *cis* présents dans le transcrit endogène et dans les minigènes sont mis à contribution par l'effet *trans*-dominant des expansions de CTG. Ainsi, un seul et unique profil d'épissage peut être obtenu par plusieurs mécanismes moléculaires. Pour mieux comprendre les mécanismes responsables des défauts d'épissage dans la DM1, il est important de déterminer les éléments *cis* et les facteurs *trans* impliqués dans le processus d'épissage pathologique.

Ce travail a fait l'objet d'un article qui est attaché ici sous la rubrique (Article 2).

Article 1

Overexpression of Mbnl1 fetal isoforms and modified splicing of Tau in the DM1 brain: Two individual consequences of CUG trinucleotide repeats

Available online at www.sciencedirect.com

Experimental Neurology 210 (2008) 467–478

**Experimental
Neurology**

www.elsevier.com/locate/yexnr

Overexpression of MBNL1 fetal isoforms and modified splicing of Tau in the DM1 brain: Two individual consequences of CUG trinucleotide repeats

C.M. Dhaenens^{a,b}, S. Schraen-Maschke^{a,b}, H. Tran^{a,b}, V. Vingtdeux^{a,b}, D. Ghanem^{a,b},
O. Leroy^{a,b}, J. Delplanque^{a,b}, E. Vanbrussel^{a,b}, A. Delacourte^{a,b}, P. Vermersch^f,
C.A. Maurage^{a,b}, H. Gruffat^c, A. Sergeant^c, M.S. Mahadevan^d, S. Ishiura^e, L. Buée^{a,b},
T.A. Cooper^g, M.L. Caillet-Boudin^{a,b,1}, N. Charlet-Berguerand^{h,1},
B. Sablonnière^{a,b}, N. Sergeant^{a,b,*}

^a Inserm, U837, place de Verdun, 59045 Lille, France^b Université Lille 2, Faculté de Médecine, Institut de Médecine prédictive et de Recherche thérapeutique, Centre de Recherches Jean-Pierre Aubert, place de Verdun, 59045 Lille, France^c Inserm, U758, ENS-Lyon, Laboratory of g-Herpes Virus Molecular Biology, IFR128 Bioscience Lyon Gerland, 46 allée d'Italie, F-69364 Lyon Cedex 07, France^d Department of Pathology, University of Virginia, Charlottesville, VA-22908, USA^e Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, Japan^f Department of Neurology D, Roger Salengro Hospital, CHRU Lille, 59037 Lille Cedex, France^g Department of Pathology, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Houston, TX-77030, USA^h Inserm AVENIR Group, IGBMC, 1 Rue Laurent FRIES, 67404 Illkirch, France

Received 6 August 2007; revised 15 November 2007; accepted 16 November 2007

Available online 4 December 2007

Abstract

Neurofibrillary degeneration is often observed in the brain of patients with type 1 myotonic dystrophy (DM1). It consists principally of the aggregation of Tau isoforms that lack exon 2/3 encoded sequences, and is the consequence of the modified splicing of Tau pre-mRNA. In experimental models of DM1, the splicing of several transcripts is modified due to the loss of Muscleblind-like 1 (MBNL1) function. In the present study, we demonstrate that the MBNL1 protein is also present in the human brain, and consists of several isoforms, as shown by RT-PCR and sequencing. In comparison with controls, we show that the adult DM1 brain exhibits modifications in the splicing of MBNL1, with the preferential expression of long MBNL1 isoforms — a splicing pattern similar to that seen in the fetal human brain. In cultured HeLa cells, the presence of long CUG repeats, such as those found in the DM1 mutation, leads to similar changes in the splicing pattern of MBNL1, and the localization of MBNL1 in nuclear RNA foci. Long CUG repeats also reproduce the repression of Tau exon 2/3 inclusion, as in the human disease, suggesting that their effect on MBNL1 expression may lead to changes in Tau splicing. However, while an overall reduction in the expression of MBNL1 mimics the effect of the DM1 mutation, none of the MBNL1 isoforms tested so far modulates the endogenous splicing of Tau. The modified splicing of Tau thus results from a possibly CUG-mediated loss of function of MBNL1, but not from changes in the MBNL1 expression pattern.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Neuromuscular disease; Neurodegeneration; Microtubule-associated protein Tau; Splicing; Muscleblind-like protein

Abbreviations: DM, Myotonic dystrophy; IR, Insulin receptor; DMPK, Myotonic dystrophy protein kinase; MBNL, Muscleblind-like; PCR, Polymerase chain reaction; TNT, Troponin T; UTR, Untranslated region.

* Corresponding author. Inserm U837, Neurodegenerative diseases and Neuronal Death, 1, place de Verdun, F-59045 Lille, France.

E-mail address: sergeant@lille.inserm.fr (N. Sergeant).

¹ Equal contribution to the present work.

0014-4886/\$ - see front matter © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.expneurol.2007.11.020

Introduction

Type 1 myotonic dystrophy (DM1) is an autosomal dominant multisystemic disorder caused by the unstable expansion of CTG trinucleotide repeats located in the 3' untranslated region (UTR) of the gene encoding the myotonic dystrophy protein kinase (DMPK). The number of CTG repeats varies from 50 to

more than 4000 in affected individuals, and is correlated with disease severity and inversely correlated with the age at onset (Harley et al., 1992; Ashizawa et al., 1992). The clinical expression of DM1 includes myotonia and progressive muscle weakness, frontal baldness, cataracts, cardiac conduction defects, hypogonadism, endocrine deficiency and cognitive impairment (Harper, 1989). A neurodegenerative process is often observed in the brain of aged DM1 patients (Vermersch et al., 1996; Kiuchi et al., 1991; Oyamada et al., 2006), characterized by the presence of neurofibrillary tangles in the neocortex and in the subcortical nuclei. These neurofibrillary tangles consist of the intraneuronal aggregation of abnormally modified microtubule-associated Tau proteins.

The etiology of DM1 implies that the disease is due to an RNA gain-of-function. CUG repeats accumulate in the nucleus in the form of ribonuclear inclusions, named foci (Taneja et al., 1995). These ribonuclear inclusions contain several proteins, among which the Muscleblind-like 1 (MBNL1) protein is predominant (Mankodi et al., 2001; Jiang et al., 2004). The sequestration of MBNL1 leads to the loss of its function. The disruption of the mouse *MBNL1* gene thus reproduces the trans-dominant effect of the CUG repeats (Kanadia et al., 2003), which in turn results in the modified splicing of a growing list of transcripts, including cardiac troponin T (cTNT), the insulin receptor (IR), the muscle-specific chloride channel (ClC-1), myotubularin-related protein 1, fast skeletal troponin T, the NMDA NR1 receptor, ryanodine receptor 1, the amyloid beta precursor protein and Tau (Jiang et al., 2004; Kanadia et al., 2003; Savkur et al., 2001; Sergeant et al., 2001; Buj-Bello et al., 2002; Charlet et al., 2002; Lin et al., 2006; Kimura et al., 2005).

In *Drosophila*, in which they were initially characterized, Muscleblind proteins have been shown to be required for the terminal differentiation of myocytes and photoreceptors (Begeemann et al., 1997; Artero et al., 1998); for review see (Pascual et al., 2006). In humans, the MBNL genes consist of three paralogous: MBNL1, MBNL2 and MBNL3. MBNL1 and MBNL2 are found in numerous tissues, with MBNL1 expression at its strongest in muscle and the heart (Miller et al., 2000). MBNL3 is mostly expressed in the placenta. The human *MBNL1* gene is located on chromosome 3, and alternative splicing generates several isoforms (Mankodi et al., 2001; Miller et al., 2000; Kino et al., 2004; Fardaei et al., 2002), which have been characterized in skeletal muscle (Kanadia et al., 2006).

MBNL1 proteins regulate the splicing of both cTNT and IR pre-mRNAs (Ho et al., 2004). Some MBNL1 isoforms also bind double-stranded RNA, a property that might be in balance with their role as a modulator of transcript splicing. The presence of the sequence encoded by exon 4 is essential for MBNL1 to bind to CUG repeats (Kino et al., 2004). Together, these results suggest a dual, and possibly interrelated, function for MBNL1 isoforms, as double-stranded RNA binding proteins, and as trans-regulatory splicing factors.

Although MBNL1 has been characterized in skeletal muscle to some extent (Kanadia et al., 2006), little is known about its expression in the brain, under either normal or pathological conditions. The aim of the present work was to study the expression of MBNL1 in the brain of DM1 patients and control

individuals, as well as its relationship to Tau splicing. We show here that a fetal isoform of MBNL1 is overexpressed in the brain tissue of DM1 patients. The expression of this fetal isoform can be reproduced by the ectopic expression of long CUG repeats *in vitro*. We also show that the Tau mis-splicing observed in DM1 is reproduced by the ectopic expression of CUG repeats or the RNA interference-mediated inactivation of MBNL1. In contrast, the expression of adult or fetal MBNL1 isoforms does not affect Tau exon 2/3 inclusion. Taken together, our results suggest that in the DM1 brain, MBNL1 and Tau splicing are targets of the trans-dominant effect of CUG repeats and that the silencing of MBNL1 results in alterations in Tau splicing.

Materials and methods

Human brain tissue samples

DM1 brain tissue samples were obtained at autopsy from 3 patients aged of 42, 53 and 64 years. Two patients (DM1.1 and DM1.3) had an adult form of DM1, while the third had a congenital form of DM1 (DM1.2). These cases have been previously described (Leroy et al., 2006a). Three control individuals were included in the study. The brain tissues were obtained from the Department of Neurology, University Hospital Centre of Lille, France, in accordance with the protocol of the local ethics committee. Post-mortem delays were below 48 h, and brain tissue was stored at -80°C . Four cortical brain regions, the temporal, occipital, frontal and parietal, were dissected for analysis. The genetic diagnosis of DM1 was confirmed by a long PCR assay. For the analysis of the expression of different human MBNL1 transcripts during an early stage of development, we analyzed first strand cDNA preparations from a human fetal brain (Human fetal MTC™ panel, BD Biosciences, Clontech, California, USA).

Semi-quantitative analysis

Total RNA was isolated from brain tissue using RNeasy (Promega, France) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was isolated from cells using the Nucleospin® RNA II kit (Macherey Nagel, Düren, Germany). RNA concentration was determined by absorption at 260 nm. RT-PCR was performed in triplicate with 1 μg of total RNA using random hexamers (5 μM /l) and the M-MLV reverse transcriptase (Promega, France) according to standard protocols. No DNA amplification was observed in the RT controls. PCR was carried out in a final volume of 25 μl , with 15 pM of each primer (primer sequences are detailed in Table 1), 1.5 mM MgCl_2 and 1 U of Taq polymerase (Invitrogen), under the following conditions: 5 min at 94°C , 22 to 30 cycles of a 1 min denaturation step at 94°C , annealing for 2 min at the temperature indicated in Table 1, 2 min of extension and 7 min of final extension at 72°C . GAPDH was used as an internal control. The reaction products were resolved by electrophoresis using a 4% or 5% polyacrylamide gel, and bands were stained with SYBR Gold (Molecular Probes, Oregon, USA). The intensity of SYBR Gold luminescence was measured using a FluoroImager scanner (Clarevision, France). The mRNA signals were normalized to that of GAPDH mRNA.

Table 1
Primers and PCR reactions

Sequence amplified	Sense primers	(Exon location)	Antisense primers	(Exon location)	PCR conditions	Fragment size (bp)
MBNL1 _{41/43}	5'-ATTACAACCCGTGCCAATGT-3'	(3/4)	5'-CACCATGGGAACAACACTTGTA-3'	(8/9)	1.0 mM MgCl ₂ 60 °C	676/730
MBNL1 _{40/42}	5'-CCCATTAACAACCCGTGCCAAT-3'	(3/4)	5'-ATGGGAAGTGGTGGGAGAA-3'	(7/9)	1.5 mM MgCl ₂ 60 °C	640/694
MBNL1 exon 5	5'-AATTGCAACCGAGGAGAAAA-3'	(5)	5'-CAGCCTGGTTGACCTGGTAT-3'	(5)	1.5 mM MgCl ₂ 60 °C	199
MBNL1 exon 6	5'-AATTGCAACCGAGGAGAAAA-3'	(5)	5'-AGGGGTGCTTCAGTGATT-3'	(6)	1.5 mM MgCl ₂ 60 °C	269
MBNL1 exon 8	5'-CAAAGAGGCTGCTCTTAA-3'	(7)	5'-CAACACTTGGTAGCGGGTGC-3'	(8)	1.5 mM MgCl ₂ 60 °C	159
MBNL1 exon 6–8	5'-GCAACCTTTGACTGGGAAT-3'	(6/7)	5'-ATTGAGCCTGGTGGGAGAA-3'	(7/8)	1.5 mM MgCl ₂ 60 °C	167
MBNL1 exon 3–11	5'-ACTAGCCAATGCCATGATGC-3'	(3)	5'-TTGTGGTAGTCAGATGTTTCG-3'	(11)	1.5 mM MgCl ₂ 60 °C	588–882
hcTNT exon 5	5'-CATTACCACATTGGTGTGC-3'		5'-AGGTGCTGCCCGGGCGGTGGCTG-3'		1.5 mM MgCl ₂ 64 °C	109, 139
Tau exon 2/3	5'-TACGGGTTGGGGACAGGAAAGAT-3'	(1)	5'-GGGGTGTCTCCAATGCCTGCTTCT-3'	(4)	1.5 mM MgCl ₂ 65 °C	112, 199, 286
DMPK 3'UTR	5'-TGTCTGTCCACCTAGGAC-3'		5'-GCTAGCTCTCCACAGACCTT-3'		1.5 mM MgCl ₂ 60 °C	171
GAPDH	5'-CCATGGCACCGTCAAGGCTGA-3'		5'-GCCAGTAGAGGCAGGGATGAT-3'		1.5 mM MgCl ₂ 62 °C	440

List of primers used to analyze the expression of MBNL1 isoforms and the alternative splicing of Tau exon 2 and 3 and hcTNT exon 5. The first column indicates the sequences that were amplified. The second and third columns are the sequence of the forward and reverse primers used, and their exonic location. The concentration of MgCl₂, annealing temperature and size of the fragments are also indicated.

Real time RT-PCR

The expression levels of MBNL1 exon 6, exon 8 and exon 5 were studied by real time RT-PCR. The primers used are indicated in Table 1. We analyzed the expression of MBNL1 transcripts containing both exon 6 and exon 8 (exons 6–8) using a forward primer overlapping exons 6 and 7, and a reverse primer overlapping exons 7 and 8 (Table 1). The levels of MBNL1 were assessed relative to the level of β -actin. The PCR was performed with a Light Cycler (Roche, Mannheim, Germany). The master mix contained Taq DNA polymerase and SYBR Green I dNTPs (Light Cycler® FastStart DNA Master SYBR Green, Roche, Mannheim, Germany). The primers were used at a final concentration of 0.5 μ M. The conditions required for amplification included 2.5 μ M of MgCl₂ and annealing at 62 °C for exon 6, and 4 μ M of MgCl₂ and annealing at 64 °C for exon 8. The amplification of exon 5 and exons 6–8 required 2.5 μ M of MgCl₂ and annealing at 60 °C, over 40 cycles.

Antiserum production and purification

Antibodies were raised by immunizing rabbits (Eurogentec, Liege, Belgium) with a specific MBNL1 N-terminal peptide, 9-RDTKWLTLEV-18 (numbering according to MBNL1₄₂; Swiss-Prot ref. MBNL1_Human Q9NR56), which was coupled at its C-terminal end to keyhole limpet hemocyanin. The specificity of the antiserum was tested using HeLa cells transfected with MBNL1 or non-transfected controls (Kino et al., 2004).

Cloning of MBNL1 isoforms and molecular constructs

To screen for the different MBNL1 isoforms, we selected primers delimiting the coding sequence between exon 2 and exon 11 of MBNL1. These exons are common to the isoforms previously described (Kino et al., 2004). Total cDNA sequences were obtained by amplification of DM1 and control cDNA, with DYNazyme EXT™ Taq polymerase (Finnzymes, Espoo, Finland). PCR products were cloned into the PCR-TOPO TA Cloning vector (Invitrogen, California, USA) for sequencing. Plasmid DNA was purified using the Nucleobond® AX kit (Macherey Nagel, Düren, Germany). Other plasmids were constructed for each MBNL1 isoform, with the addition of N-terminal GFP and V5-tags to the coding sequence. Briefly, MBNL1 cDNAs in TOPO vectors were subcloned into the Gateway® system (Invitrogen) and inserted into pDEST 53-GFP and pCDNA 3.1-nV5. All constructs were double-strand sequenced. Plasmids containing the 3'UTR of DMPK with 5 or 200 CTG repeats were derived from previously described constructs under a rodent ROSA promoter (Amack et al., 1999). The constructs were subcloned into pCDNA 3.1 under the control of the CMV promoter; the empty pCDNA plasmid was used as a control during transfection. The plasmid containing the 3'UTR of DMPK with 960 interrupted CTGs was a minigene construct also under the control of the CMV promoter. It contained the last 5 exons of DMPK followed by the full length DMPK 3'UTR, with 960 CTG repeats interrupted at every 20th repeat by CTCGA motif (Ho et al., 2005). The conservation of the number of CUG repeats was verified by a long PCR assay. The RTB300 minigene containing

exon 5 of human cTNT (hcTNT) has been previously described (Cooper, 1998).

Cell culture and transfection

HeLa or COS cells were grown in monolayer cultures in 6 well plates in Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM) (Invitrogen, California, USA) supplemented with 10% FBS and 0.5% Penicillin/Streptomycin, at 37 °C in a humidified CO₂ (5%)

incubator. Cells grown to ~50% confluence were transiently transfected with 2 µg of plasmid DNA, using the Superfect ExGene 500 transfection reagent (Fermentas), or growing doses of plasmids (from 0.5 to 4 µg). Total RNA was analyzed 48 h post-transfection, with GAPDH as an internal loading standard except where otherwise mentioned. For silencing experiments, siRNAs were synthesized by Eurogentec. The sense strand sequences of the siRNAs designed to target MBNL1 mRNA transcripts were as follows: siMBNL1a 5'-CGCAGUUGGAGAUAAAUGG-3',

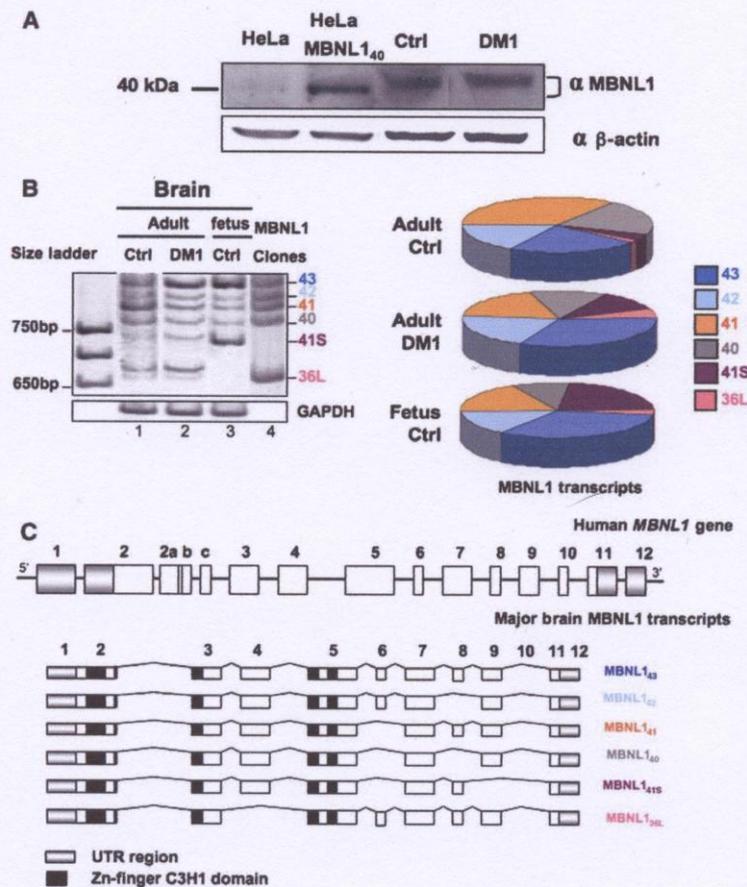


Fig. 1. MBNL1 expression in control and DM1 brain tissues. A. MBNL1 protein expression. Western blotting of protein extracts from untransfected HeLa cells (lane 1) or cells transfected with the MBNL1₄₀ expression vector (lane 2). MBNL1 protein expression was also analyzed in control (lane 3) and DM1.3 (lane 4) frontal cortical homogenates. Proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane and probed with our MBNL1 antiserum (α MBNL1), then stripped and re-probed with a β-actin antibody (α β-actin). B. MBNL1 transcript expression. Left panel: RT-PCR analysis of total RNA from adult control (lane 1), DM1.3 (lane 2) and fetal control (lane 3) brain tissue using oligonucleotides complementary to MBNL1 exons 3 and 11. Five brain transcripts (36L, 40, 41, 42 and 43) were identified by RT-PCR followed by cDNA cloning and sequencing (lane 4), as described in the Materials and methods. MBNL1_{41S} was identified by isolating the band from the acrylamide gel and sequencing. GAPDH was used as an internal loading standard. Pie chart showing the distribution of the six major MBNL1 transcripts (36L, 40, 41, 41S, 42 and 43) in the control (Ctrl), DM1 and fetal brain. C. Representation of the MBNL1 gene and major brain transcripts. The human MBNL1 gene is located on chromosome 3q25. The MBNL1 primary transcript contains 15 exons. Grey boxes represent untranslated regions (UTRs). Exons are represented as boxes and introns as lines. Exon 1 and part of exon 2 correspond to the 5'UTR. Two thirds of exon 11 and the entire exon 12 encode the 3'UTR. Black boxes represent the four C3H1 type Zinc-finger motifs which bind to RNA. The Zinc-finger motifs are encoded by exons 2, 3 and 5. Only the five major brain transcripts with a molecular mass ranging from 36 to 43 kDa are represented. The nomenclature used corresponds to that of Kino et al. (2004) and Kanadia et al. (2006).

and siMBNL1b 5'-CAGACAGACUUGAGGUAUG-3' (Ho et al., 2004). A scrambled siRNA and an siRNA against β -actin were also designed as controls. The siRNAs were transfected using JetSI[®]-Endo (Eurogentec) according to the manufacturer's instructions. Growing concentrations were used (1–200 nM) for the dose response effect.

Protein extraction and western blot analysis

DM1 and control brains were homogenized with a Dounce homogenizer in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP40, 0.5% deoxycholate) with the addition of 1 mM Na_3VO_4 , 125 nM okadaic acid, protease and DNase inhibitors. The resulting homogenates were sonicated, and spun at 13,000 g for 20 min at 4 °C. The supernatants were transferred and the concentration of proteins measured. The pellets were sonicated again, warmed and centrifuged. The supernatants were diluted with Laemmli Buffer with or without RNase (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ribonuclease A, Fermentas, Canada). The protein extracts (50 μg each) were used for SDS-PAGE (4–12%; Nupage[®] Bis-Tris gels, Invitrogen, California, USA) and transferred onto Hybond nitrocellulose membranes (G&E Amersham) using the XCell[™] II Blot Module (Invitrogen). The proteins were reversibly stained with Ponceau red in order to control for the amount of protein loaded. After blocking with 5% of skimmed milk in TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl and 0.1% Tween-20), the membranes were incubated overnight at 4 °C with MBNL1 antiserum (1:1000) in the same buffer. Membranes were subsequently incubated with a peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Sigma-Aldrich) (1:4000 in the same buffer) and antibody complexes were revealed using ECL[™] and Hyperfilms (G& Amersham) according to the manufacturer's instructions.

Immunofluorescence microscopy

HeLa or COS cells were grown in cell culture chamber slides (Labtek) in DMEM supplemented with 10% FBS. HeLa cells were transfected with either (CTG)₅-pcDNA or (CTG)₉₆₀-pcDNA alone, or co-transfected with the MBNL1 isoforms pDEST 53GFP-36L, pDEST 53GFP-40, pDEST 53GFP-42 or pDEST 53GFP-43. COS cells were transfected with MBNL1 isoforms alone. After 48 h, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PBS) for 30 min at room temperature, and permeabilized with 0.25% Triton X-100 in PBS. After blocking with 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS, the fixed cells were incubated for 2 h at room temperature with the primary antibody in PBS with 1% BSA and 0.25% Triton X-100. The anti-GFP antibody was used to probe for the MBNL1 isoforms and to study their localization. After washing, cells were incubated with Alexa Fluor[®] 568-conjugated secondary antibodies (Invitrogen). Nucleic acids were stained using TOPRO[®]-3. The coverslips were mounted onto slides with Vectashield (Vector laboratories). Images were acquired with a Leica TCS NT laser scanning confocal microscope. All data were analyzed using Leica image analysis software.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using the non-parametric Mann-Whitney test, with the help of Prism Software (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

Results

MBNL1 protein expression is not decreased in the DM1 brain

To investigate any change in MBNL1 expression in DM1, we first compared the expression of MBNL1 protein in the frontal cortex of control and DM1 brains by western blot analysis using a

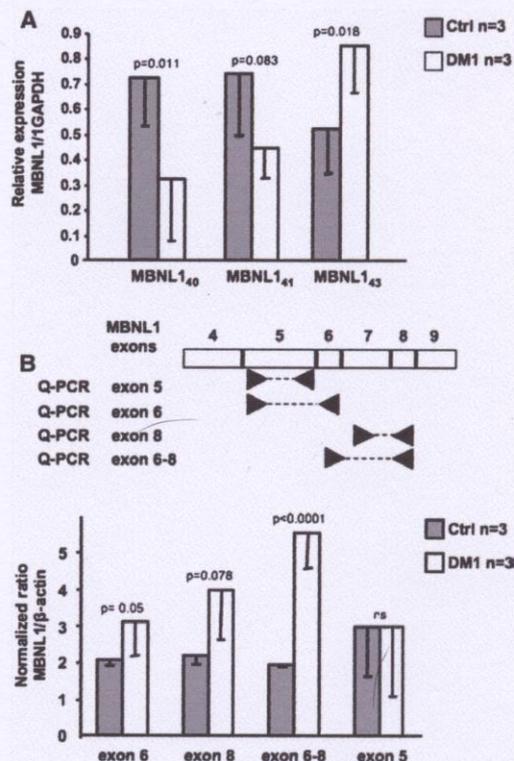


Fig. 2. Semi-quantitative analysis of exon 6 and 8 in control and DM1 tissues. A. Quantification of MBNL1 splice variants by RT-PCR of total RNA from normal and DM1 brain tissues. Primer sets MBNL1_{41/43} and _{40/42} (Table 1) were used to amplify selected sets of MBNL1 isoforms. Each primer set simultaneously amplified two transcripts that could be distinguished by their size, according to the insertion or deletion of exon 6. After polyacrylamide gel electrophoresis, the bands were quantified and the results expressed relative to GAPDH, used as an internal loading standard. The histogram represents the mean \pm standard deviation of measurements obtained from three different brain samples for each patient. B. Quantitative RT-PCR of MBNL1 transcripts. The relative positions of the primers used are indicated above the histogram in the form of arrows. The first primer set, located in the constitutive exon 5, was used to quantify the total level of MBNL1 transcripts. The other primer sets allowed the specific quantification of MBNL1 transcripts containing exon 6, exon 8 or both exons 6 and 8. Actin was used as the internal standard. All results were obtained from at least three independent experiments.

rabbit polyclonal antibody against the N-terminal region of MBNL1 (see Materials and methods; Fig. 1A). As a control for antibody specificity, we used protein extracts from HeLa cells transfected with the MBNL1₄₀ expression vector. A single band at 40 kDa was detected by immunoblotting using our MBNL1 antiserum in these extracts, whereas no immunoreactivity was observed in extracts from non-transfected cells. In extracts from human brain tissue, the antibody revealed a broad band with an apparent molecular mass of 41–43 kDa. No difference in expression levels was seen between control and DM1 brains (Fig. 1A). There did appear to be a slight variation in electrophoretic mobility. However, SDS-PAGE followed by western blotting was insufficient to discriminate between the different MBNL1 isoforms.

MBNL1 splicing is modified and the expression of a fetal isoform increased in the DM1 brain

We analyzed MBNL1 transcript expression in control, DM1 and fetal brain tissues (Fig. 1B), by polyacrylamide gel electrophoresis of the RT-PCR products. As shown in Fig. 1B (lanes 1 and 2) several RT-PCR products were obtained using MBNL1

primers located in exon 3 and 11 (Table 1). After cloning and sequencing, we identified several human MBNL1 isoforms (Fig. 1B, lane 4). The relative distribution of these different MBNL1 brain isoforms is represented in the form of pie charts (Fig. 1C). The major transcripts expressed in the adult control brain are MBNL1₄₀, MBNL1₄₁ and MBNL1₄₃ (Fig. 1B lane 1 and Fig. 1C). In the DM1 brain, MBNL1₄₀ and MBNL1₄₁ isoforms are significantly less abundant whereas MBNL1₄₃ is overexpressed (Fig. 1B, lanes 1–2, and Fig. 1C). Interestingly, we observed that MBNL1₄₃ is also one of the major fetal brain transcripts (Fig. 1B, lane 3, and Fig. 1C). The MBNL1₄₃ transcript corresponded to the MBNL1₄₂ of Kino's classification (Kino et al., 2004), with the addition of exon 8 (Fig. 2D). Such a transcript has also been identified recently by Kanadia et al. in mouse skeletal muscle (Kanadia et al., 2006). MBNL1_{36L} corresponds to MBNL1₃₆, with the inclusion of the exon 6 sequence (Fig. 2C).

Increased inclusion of MBNL1 exon 6 and 8 in DM1 brain

After qualitative analysis of the pattern of MBNL1 transcript expression in control and DM1 brains, we conducted a semi-

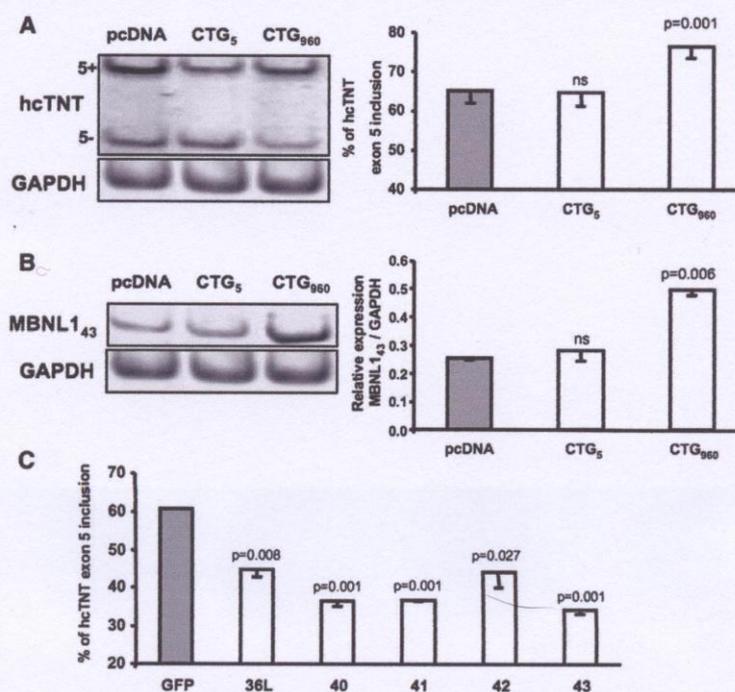


Fig. 3. Effect of long CUG repeats on MBNL1 and hcTNT splicing in HeLa cells. A. Regulation of human hcTNT exon 5 splicing by DMPK 3'UTR CUG repeats. Total RNA was analyzed from HeLa cells co-transfected with the hcTNT minigene and the 3'UTR of human DMPK containing the number of CTG indicated above each lane. The histogram is representative of three individual experiments, and represents the percentage of transcripts that include exon 5. B. Regulation of human MBNL1 by DMPK 3'UTR CUG repeats. Total RNA was analyzed from HeLa cells co-transfected with MBNL1 and the 3'UTR of the human DMPK containing the number of CTG indicated above each line. Results are expressed as the level of MBNL1₄₃ expression relative to GAPDH. Histograms represent the mean and SD of three individual experiments. C. hcTNT exon 5 inclusion is similarly repressed by several MBNL1 isoforms. HeLa cells were co-transfected with hcTNT minigene and MBNL1 isoforms 36L, 40, 41, 42 or 43, and exon 5 splicing analyzed by RT-PCR. The histogram is representative of three individual experiments and the percentage of transcripts that include exon 5 is expressed as the mean ± standard deviation of the three experiments.

quantitative analysis, using three pairs of primers designed to selectively amplify MBNL1₄₀, MBNL1₄₁, and MBNL1₄₃ isoforms (Table 1). The significant increase in MBNL1₄₃ ($p=0.018$), and decrease in MBNL1₄₀ ($p=0.011$) expression levels (Fig. 2A) confirmed our previous observations (Fig. 1B, pie charts). A decrease in the expression of MBNL1₄₁ was also observed, but was not found to be statistically significant (Fig. 2A, $p=0.083$).

MBNL1₄₃ contains both exon 6 and exon 8 whereas MBNL1₄₀ lacks these exons, suggesting a possible change in the splicing of exon 6 and 8. These exons were quantified as described above, and compared to exon 5, which is constitutive (Fig. 2B). We observed a significant increase in the inclusion of exon 6 ($p=0.05$) between control and DM1 brains. A 2-fold increase in the inclusion of exon 8 was also observed in the DM brain when compared to healthy controls. While this difference was not found to be statistically significant in the current study, subsequent comparisons with a larger number of brains might prove that exon 8 as well as exon 6 are affected in DM1. At the present time, however, the results suggest that the disrupted splicing of MBNL1 is the result of the increased inclusion of exon 6, or of a combination of exon 6 and 8 ($p<0.0001$). It is worth noting that no difference was observed between control and DM1 brains in the level of MBNL1 exon 5 (Fig. 2B), thus confirming previous data showing that the overall expression of MBNL1 was not altered.

Expanded CUG repeats modify MBNL1 splicing and promote the expression of a fetal transcript

The trans-dominant effect of expanded CUG repeats in DM1 has been directly related to the disrupted splicing of several transcripts, such as hcTNT or IR. Based upon the evidence we found for altered MBNL1 isoform expression in the DM1 brain, we asked whether or not the CUG repeats were also responsible for the modified splicing of MBNL1. HeLa cells were used throughout this study. Unlike the neuroblastoma cell lines tested so far (e.g. SY-5Y, N2a, hNT), we observed an alternative splicing of Tau exon 2/3 in HeLa cells. As a positive control for the trans-dominant effect of expanded CUG repeats, the hcTNT minigene was co-transfected with the 3'UTR of human DMPK, containing 5 or 960 CTG repeats expressed under the control of the CMV immediate early promoter (Fig. 3A). The expression of CUG repeats was assessed by RT-PCR of the 3'UTR of DMPK. We also verified that the number of CTG repeats remained unchanged 48 h after transfection (data not shown). A 15% increase in the inclusion of hcTNT exon 5 was observed with CTG₉₆₀, but not with the CTG₅ minigene. HeLa cells were then transfected with CTG₉₆₀ alone (Fig. 3B) and MBNL1₄₃ transcript expression was examined by RT-PCR with the primers MBNL1_{41/43} (Table 1). In the latter cells, we observed a 1.5 fold increase in the expression of MBNL1₄₃ (Fig. 3B), demonstrating that endogenous MBNL1₄₃

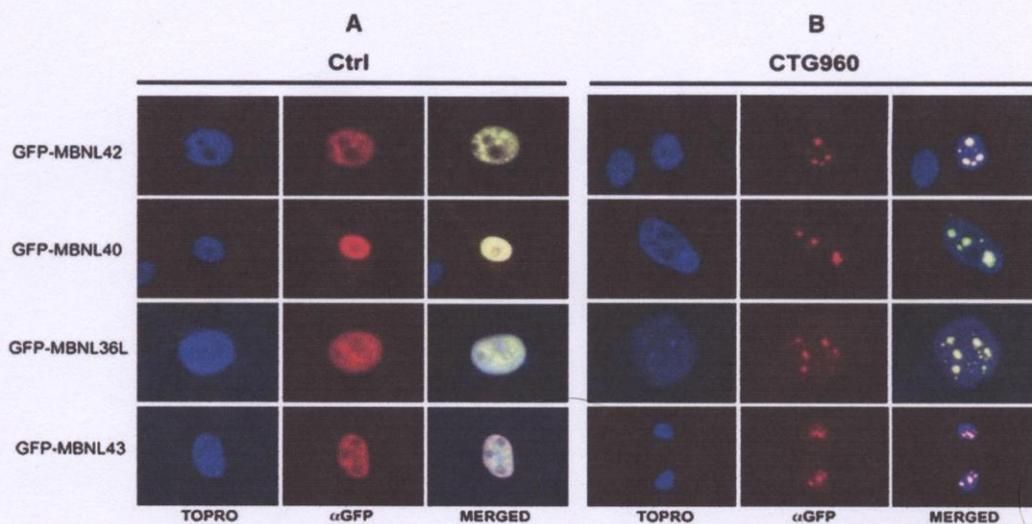


Fig. 4. Intranuclear localization of MBNL1 isoforms in the presence or absence of long CUG repeats. HeLa cells were transfected with GFP-MBNL₄₂, GFP-MBNL₄₀, GFP-MBNL_{36L}, and GFP-MBNL₄₃ alone (panel A) or together with pcDNA-CTG₉₆₀ (panel B). In each panel, the first column shows the cell nucleus stained with TOPRO. The second column shows the distribution of the GFP-tagged protein, revealed by an anti-GFP antibody. The last column corresponds to the merged images obtained from TOPRO and anti-GFP staining, showing the localization of MBNL1 isoforms in nuclear RNA foci when co-expressed with long CUG repeats. GFP fluorescence completely overlapped with that observed with an anti-GFP antibody. Cells with a moderate level of expression were selected to illustrate the localization of MBNL1 isoforms, as high cellular expression levels resulted in partial cytosolic localization (data not shown), possibly due to the titration of nuclear import factors.

is overexpressed as a result of the trans-dominant effect of long CUG repeats.

Trans-repression of hcTNT exon 5 inclusion by MBNL1 isoforms, and cellular localization

The modified pattern of MBNL1 isoform expression in DM1 led us to consider whether the MBNL1 isoforms had similar or opposing splicing functions. We examined the trans-regulatory function of these isoforms on hcTNT exon 5 splicing. HeLa cells were co-transfected with the hcTNT minigene and GFP–MBNL1 isoforms (Fig. 3C) or V5–MBNL1 isoforms (data not shown). As a positive control for these constructs, we confirmed the decreased inclusion of hcTNT exon 5 induced by MBNL1₄₀ (Fig. 3C). We observed that MBNL1₄₃ and MBNL1_{36L} decreased exon 5 inclusion, in a manner similar to MBNL1₄₀, MBNL1₄₁ and MBNL1₄₂.

We next investigated the possibility that another function, such as cell localization or the propensity of CUG repeats to recruit MBNL1 isoforms in nuclear foci, was also modified. All GFP–MBNL1 isoforms showed diffuse nuclear staining and were excluded from the nucleoli (Fig. 4A, control panel). We also tested our constructs in COS cells since Lin et al. recently

showed that MBNL1 isoform lacking the sequence encoded by exon 7 had a nucleocytoplasmic localization (Lin et al., 2006). MBNL1₄₀ isoform which lacks the sequence encoded by exon 7 is localized in the cytoplasm and nucleus of COS whereas the other MBNL1₄₃, ₄₂ and _{36L} isoforms, having the exon 7 encoded sequence, were preferentially observed in the nucleus (supplementary Fig. 1). Control HeLa cells transfected with GFP alone or co-transfected with pcDNA-CTG₅ also revealed the diffuse cellular distribution of GFP (data not shown). In contrast, in HeLa cells co-transfected with GFP–MBNL1 isoforms in addition to pcDNA-CTG₉₆₀, GFP–MBNL1 staining was concentrated at large foci in the nucleus (Fig. 4B), even though the level of protein expression of the GFP–MBNL1 isoforms was found to be invariant between the different experimental groups (western blotting; data not shown).

Loss of MBNL1 expression is responsible for the Tau splicing pattern observed in DM1

We have previously described the preferential expression and aggregation of fetal Tau protein in degenerating neurons in the brain of DM1 patients (Sergeant et al., 2001). The increased expression of fetal Tau isoforms results from the reduced

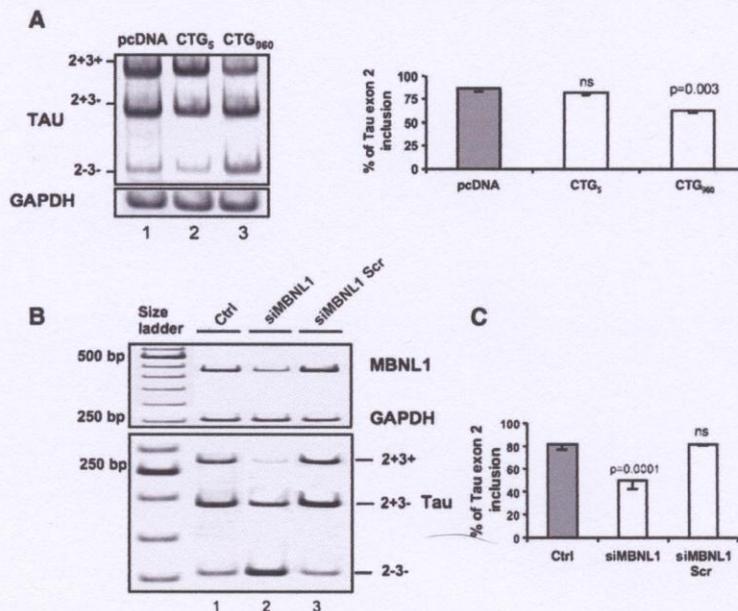


Fig. 5. Effect of long CUG repeats and loss of MBNL1 expression levels on the inclusion of Tau exon 2. A. Reduced Tau exon 2 inclusion in the presence of long CUG repeats. The proportion of Tau transcripts including exons 2 and 3 was analyzed in HeLa cells transfected with the 3'UTR of the human DMPK gene containing 5 or 960 CTG repeats, by RT-PCR. The bands were quantified and the results expressed as the percentage of transcripts including exon 2. GAPDH was used as the internal loading standard. B. Loss of MBNL1 expression reduces Tau exon 2 inclusion. An RNA duplex (siMBNL1a) against human MBNL1 (siMBNL1, lane 2) or a scrambled duplex (siMBNL1 Scr, lane 3) were used for transfection into HeLa cells. In controls (Ctrl, lane 1), the transfection agent alone was used. Note the reduced expression of MBNL1 in presence of the siMBNL1 and not of the siMBNL1 Scr (upper panel B, lane 3). RT-PCR using primers surrounding exon 2/3 were used to analyze the pattern of Tau splicing (lower panel B). Tau isoforms are indicated on the right. C. Histogram of the percentage of transcripts including exon 2. The mean and standard deviation were calculated from three individual experiments. Histograms are representative of the mean \pm standard deviation of three independent experiments in A and C.

inclusion of Tau exon 2/3. As shown here, MBNL1 isoform expression is also modified in the DM1 brain, raising the question of whether it is the CUG repeats or the MBNL1 fetal isoforms that are responsible for the modified splicing of Tau. To answer this question, we first analyzed the consequences of the ectopic expression of CUG repeats on the splicing of Tau in HeLa cells (Fig. 5A). Under control conditions, endogenous Tau exon 2/3 were alternately spliced in HeLa cells (Fig. 5A, lane 1). As Tau exon 3 never appears independently of exon 2,

three PCR products are observed, corresponding to 2+3+, 2+3- and 2-3- transcripts. However, the expression of CUG₉₆₀ (Fig. 5A, lane 3), but not CUG₅ (Fig. 5A, lane 2) by HeLa cells induced a significant 25% decrease in exon 2 inclusion, demonstrating that the reduced inclusion of Tau exon 2/3 resulted from the trans-dominant effect of CUG repeats (Fig. 5A).

We next examined whether or not the loss of MBNL1 expression induced the preferential exclusion of Tau exon 2/3. Two siRNAs against human MBNL1 and two scrambled RNA

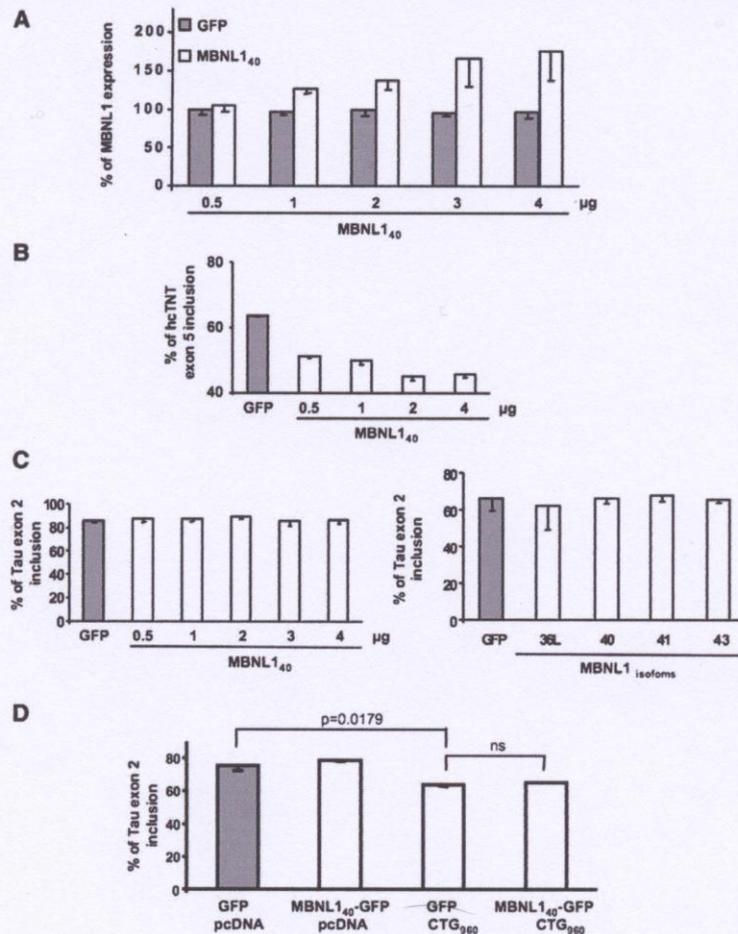


Fig. 6. Effect of MBNL1 isoforms ectopic expression on hcTNT exon 5 and Tau exon 2 splicing. A. Dose expression of MBNL1₄₀. A growing quantity of MBNL1₄₀ plasmid (in microgram) was transfected. The amount of MBNL1₄₀ mRNA expressed is represented as the percentage to the control expression. A plasmid containing the GFP alone was used as a control of ectopic expression (grey bars). Note that GFP does not affect endogenous MBNL1 expression. B. Dose response exclusion of hcTNT exon 5 in presence of growing amount of MBNL1. A growing quantity of MBNL1₄₀ plasmid was co-transfected with hcTNT minigene. Exon 5 splicing was analyzed by RT-PCR and results are represented as the percentage of exon 5 inclusion. C. Tau exon 2 inclusion is not modulated by MBNL1₄₀ expression nor by MBNL1 isoforms. Endogenous splicing of Tau exon 2 was analyzed after transfection of HeLa cells with an increased amount of MBNL1₄₀ plasmid. Two microgram of MBNL1 isoforms (36L, 40, 41 and 42) were transfected in HeLa and endogenous splicing of Tau exon 2 was analyzed by RT-PCR. The plasmid expressing GFP was used as a control. D. Tau exon 2 inclusion is unmodified by MBNL1₄₀ ectopic expression in presence or absence of long CUG repeats. The level of Tau exons 2 and 3 was analyzed by RT-PCR in HeLa cells transfected with the human DMPK 3'UTR containing 960 CTG repeats, in the presence or absence of cotransfection with MBNL1₄₀. The bands were quantified and results were expressed as percentage of transcripts that included exon 2. Histograms are representative of the mean \pm standard deviation of three independent experiments in A to D.

duplexes were used (only one is shown). MBNL1 expression level (Fig. 5B, upper panel) and the splicing pattern of endogenous Tau (Fig. 5B, lower panel) were determined by RT-PCR. The MBNL1-specific RNA duplex reduced the expression level of MBNL1 mRNA (Fig. 5B, lane 2). We also observed a reduction in the expression of Tau isoforms including exon 2/3, and the increased expression of Tau isoforms lacking these exons, with this RNA duplex (Fig. 5B, lane 2), whereas the scrambled siRNA had no obvious effect on Tau splicing (Fig. 5B, lane 3). Quantitative analysis showed that the MBNL1 duplex induced a significant decrease ($p=0.0001$) in the level of exon 2 inclusion, when compared to either non-RNA controls or a scrambled RNA duplex (Fig. 5C). This decrease was not induced by an RNA duplex against β -actin (not shown). To further ascertain that the reduced inclusion of Tau exon 2 is due to the loss of MBNL1 expression, we performed a dose response effect of the loss of MBNL1 expression on Tau exon 2 splicing (supplementary Fig. 2). HeLa cells were transfected with a growing concentration of siMBNL1 duplex and endogenous MBNL1 expression and Tau exon 2 inclusion were assessed by RT-PCR. From 1 to 100 nM of duplex there was a linear decrease of MBNL1 mRNA expression (supplementary Fig. 2). In parallel, we observed a decreased percentage of Tau exon 2 inclusion from 5 to 40%, demonstrating that the reduced Tau exon 2 inclusion is in close relationship with the loss of MBNL1 expression and reproduces the splicing pattern of Tau observed in the DM1 brain.

Loss of MBNL1 function mimics DM1 phenotype and supposes that MBNL1 regulates Tau exon 2 splicing. To further address this question, a growing quantity of MBNL1₄₀ was expressed in HeLa cells. Fig. 6A shows that we could reach a 50% increase of MBNL1 expression by increasing the quantity of plasmid transfected. This incremental expression of MBNL1 induced a progressive decreased of hCNT exon inclusion (Fig. 6B). The splicing of Tau exon 2 was insensitive to MBNL1₄₀ expression, whatever the level of expression (Fig. 6B). Moreover, none of the isoforms tested modified the splicing of Tau exon 2 (Fig. 6C) showing that splicing of Tau exon 2 is not affected by a specific isoform, as the fetal MBNL1₄₃ isoform. In order to investigate a recent claim that the overexpression of MBNL1 reverses the trans-dominant effect of CUG repeats by correcting for MBNL1 functional deficits (Kania et al., 2006), we co-transfected HeLa cells with CUG₉₆₀ and MBNL1₄₀, and analyzed the endogenous splicing pattern of Tau exon 2/3. We observed that the overexpression of MBNL1₄₀ did not restore normal endogenous splicing of Tau to control levels (Fig. 6D).

Discussion

MBNL1 expression is central to DM1 pathophysiology, and the loss of MBNL1 function leads to the altered splicing of several transcripts in the muscle tissue of DM1 patients. Several transcripts, including those of Tau, are modified in the brain tissue of DM1 patients. However, our knowledge of MBNL1 in the human brain is limited to the fact that it is expressed at low levels (Miller et al., 2000) and is localized in the nuclear RNA

foci of neocortical neurons in DM1 patients (Jiang et al., 2004). We show here that in adult human brain tissue, long MBNL1 protein isoforms, especially MBNL1₄₁ and/or MBNL1₄₂, are preferentially expressed. We characterize several transcripts and show a modification in the splicing pattern of MBNL1 in the brain tissue of DM1 patients. In addition, we show that this splicing pattern is induced by long CUG repeats, and therefore is a result of the trans-dominant effect of RNA bearing the DM1 mutation. However, this observation further adds to the complexity of the pathophysiology of DM1. For instance, the trans-dominant effect of the CUG repeats could result either from the loss of MBNL1, or from the re-expression of MBNL1 isoforms that are normally expressed early in development.

The altered splicing of MBNL1 has also been reported recently in DM1 and DM2 muscle tissue by Lin et al. (Lin et al., 2006). In the DM1 brain, in addition to the altered splicing of exon 6 seen in muscle (called exon 7 in Lin et al. (2006)), we demonstrate the preferential inclusion of MBNL1 exons 6 and 8. Moreover, we show that an increased number of MBNL1 isoforms are expressed in the DM1 brain, and that these isoforms include both exons 6 and 8, with or without exon 4. A consequence of the presence of CUG repeats is the expression of a combination of adult and fetal protein isoforms due to the trans-dominant effect. The altered splicing of MBNL1 in the human brain is consistent with the increased expression of a fetal isoform of MBNL1. MBNL1 isoforms including exons 6 and 8 are preferentially found in the fetal human brain, whereas MBNL1 isoforms lacking exon 6 are expressed in adult tissue. For instance, the predominant adult isoform is MBNL1₄₁.

The identification of additional MBNL1 isoforms raises the question of their cellular localization and trans-regulatory splicing properties. Are these isoforms neutralized by expanded CUG repeats? In HeLa cells, all MBNL1 isoforms in our study showed diffuse nuclear localization. However, it has previously been shown that the cellular localization of MBNL1 in COS cells is modulated by the presence or absence of exon 6 but not that of exon 8 (Lin et al., 2006). In both studies, MBNL1 isoforms were fused to GFP. However, in the present work, GFP has been placed at the N-terminus of the MBNL1 isoforms, whereas Lin et al. (Lin et al., 2006) used MBNL1 isoforms with GFP fused to the C-terminus. By transfecting GFP-MBNL1 fused constructs in COS cells, we confirm that exon 6 contributes to the nuclear localization of MBNL1. GFP position does not interfere with MBNL1 cell localization. In contrast, we show here that MBNL1 cell localization is cell-type specific as the nuclear localization of MBNL1 isoforms was not affected in HeLa. Therefore, both MBNL1 primary sequence and the cell system used should be considered to investigate MBNL1 nucleocytoplasmic shuttling. Although a difference in trans-regulatory function could not be proven using the hCNT exon 5 splicing assay, we cannot exclude the hypothesis that MBNL1 isoforms have different trans-regulatory properties toward other targets. Therefore, the altered pattern of MBNL1 expression may contribute further to the multisystemic expression of DM1 than the mere loss of its function due to titration by CUG repeats.

In vitro experiments have suggested that the spacer between the two Zinc-finger domains is essential for the binding of MBNL1 to

CUG repeats (Kino et al., 2004). Interestingly, in our study, all the MBNL1 isoforms examined, including MBNL1_{36L}, which lacks the exon 4-encoded spacer between the two Zinc-finger domains, are localized to nuclear foci in the presence of long CUG repeats. Our results suggest therefore that *in vivo*, all MBNL1 isoforms, even those lacking the exon 4-encoded sequence, associate with double-stranded RNA.

In the present study, we show that the modified splicing of Tau pre-mRNAs is induced by CUG repeats, as previously observed in the DM1 brain (Sergeant et al., 2001). However, this effect only occurs with very long expansions (CUG₉₆₀) and not with moderate ones (CUG₂₀₀) (not shown). Our results are consistent with those previously shown for hTNT exon 5, where the level of inclusion of exon 5 appears to follow CUG repeat length (Savkur et al., 2001; Philips et al., 1998). This suggests that, depending on the number of repeats, different sets of transcripts might be affected. In particular, in tissues where somatic mosaicism is important and expansion increases with age, we can hypothesize that some transcripts will only be altered at more advanced ages, leading to the late expression of specific clinical signs. This is the case in the DM1 brain, where we have previously demonstrated the importance of somatic instability; the number of CUG repeats is heterogeneous between brain regions, and very large expansions of over 4000 CUG repeats are observed (Sergeant et al., 2001).

The mechanism by which CUG repeat RNAs exert their effect is thought to involve the interaction of the CUG repeats with proteins, especially the MBNL1 protein family. One possibility is that MBNL1 sequestration in foci leads to a loss of function of MBNL1 and the disrupted splicing of several target pre-mRNAs. In the present study, we show that the modified splicing of Tau pre-mRNA is induced by long CUG repeats (see also (Sergeant et al., 2001)) or by the loss of MBNL1 expression, as observed in the DM1 brain. Moreover, the reduced Tau exon 2 inclusion is dose-dependent since we showed that a growing loss of MBNL1 expression results in a growing decrease of Tau exon 2 inclusion. Conversely, incremental expression of MBNL1 or the expression of several MBNL1 isoforms does not modify the splicing pattern of Tau, whereas these isoforms and the increment expression of MBNL1 have similar trans-regulatory properties towards hTNT exon 5 splicing. Moreover, the reduced inclusion of Tau exon 2/3 induced by the presence of long CUG repeats is not reversed by the overexpression of MBNL1₄₀, supporting the hypothesis that the trans-dominant effect of CUG repeats toward Tau splicing is mediated by a complete loss of MBNL1 function. A recent study demonstrated coordinated physical and functional interactions between hnRNPH, CUG-BP1 and MBNL1 in the regulation of IR splicing (Paul et al., 2006). Although the mechanism of Tau exon 2/3 splicing is currently unclear, MBNL1 could be one element of a protein complex that regulates spliceosome activity. We have recently shown that ETR-3, a member of the CELF family of splicing factors, acts as a strong repressor of Tau exon 2/3 inclusion (Leroy et al., 2006b). Other proteins potentially involved in MBNL1-mediated Tau splicing could be CUG-BP1 or hnRNPH.

A growing body of evidence, including our results, supports the hypothesis that the DM1 phenotype is in part related to a

change in the splicing program due to the trans-dominant effect of CUG repeats, resulting in the mixed expression of adult and fetal isoforms of various proteins, including Tau and MBNL1. Moreover, the reactivation of fetal-like splicing machinery in adult neurons is also a concept that should be explored in the case of Tauopathies.

Acknowledgments

This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM, NM10908, NM 12126, NM 12570), INSERM, CNRS, IMPRT and Université de Lille II. Valérie Vingtdeux is a recipient of a fellowship from the Association France Alzheimer. Tom Cooper is supported by the Muscular Dystrophy Association and National Institute of Health AR45653. Mani Mahadevan is supported by the Muscular Dystrophy Association and the US National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases. We are grateful to Martial Flactif from the Centre of Imaging of the IMPRT for his expert technical assistance with confocal microscopy. This manuscript was prepared with help from Gap Junction (www.gap-junction.com).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.expneurol.2007.11.020.

References

- Artero, R., Prokop, A., Paricio, N., Begemann, G., Pueyo, I., Mlodzik, M., Perez-Alonso, M., Baylies, M.K., 1998. The muscleblind gene participates in the organization of Z-bands and epidermal attachments of *Drosophila* muscles and is regulated by Dmef2. *Dev. Biol.* 195, 131–143.
- Amack, J.D., Pagnio, A.P., Mahadevan, M.S., 1999. Cis and trans effects of the myotonic dystrophy (DM) mutation in a cell culture model. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1975–1984.
- Ashizawa, T., Dunne, C.J., Dubel, J.R., Perryman, M.B., Epstein, H.F., Boerwinkle, E., Hejtmancik, J.F., 1992. Anticipation in myotonic dystrophy. I. Statistical verification based on clinical and haplotype findings. *Neurology* 42, 1871–1877.
- Begemann, G., Paricio, N., Artero, R., Kiss, I., Perez-Alonso, M., Mlodzik, M., 1997. Muscleblind, a gene required for photoreceptor differentiation in *Drosophila*, encodes novel nuclear Cys3His-type zinc-finger-containing proteins. *Development* 124, 4321–4331.
- Buj-Bello, A., Furling, D., Tronchere, H., Laporte, J., Lerouge, T., Butler-Browne, G.S., Mandel, J.L., 2002. Muscle-specific alternative splicing of myotubularin-related 1 gene is impaired in DM1 muscle cells. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2297–2307.
- Charlet, B.N., Savkur, R.S., Singh, G., Philips, A.V., Grice, E.A., Cooper, T.A., 2002. Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol. Cell* 10, 45–53.
- Cooper, T.A., 1998. Muscle-specific splicing of a heterologous exon mediated by a single muscle-specific splicing enhancer from the cardiac troponin T gene. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4519–4525.
- Fardaei, M., Rogers, M.T., Thorpe, H.M., Larkin, K., Hamshere, M.G., Harper, P.S., Brook, J.D., 2002. Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, colocalize *in vivo* with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum. Mol. Genet.* 11, 805–814.
- Harley, H.G., Brook, J.D., Rundle, S.A., Crow, S., Reardon, W., Buckler, A.J., Harper, P.S., Housman, D.E., Shaw, D.J., 1992. Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy. *Nature* 355, 545–546.

- Harper, P.S., 1989. *Myotonic Dystrophy*. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Jiang, H., Mankodi, A., Swanson, M.S., Moxley, R.T., Thornton, C.A., 2004. Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Hum. Mol. Genet.* 13, 3079–3088.
- Kanadia, R.N., Johnstone, K.A., Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C.A., Esson, D., Timmers, A.M., Hauswirth, W.W., Swanson, M.S., 2003. A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science* 302, 1978–1980.
- Kanadia, R.N., Shin, J., Yuan, Y., Beattie, S.G., Wheeler, T.M., Thornton, C.A., Swanson, M.S., 2006. Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11748–11753.
- Kimura, T., Nakamori, M., Lueck, J.D., Pouliquin, P., Aoike, F., Fujimura, H., Dirksen, R.T., Takahashi, M.P., Dulhunty, A.F., Sakoda, S., 2005. Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* 14, 2189–2200.
- Kino, Y., Mori, D., Oma, Y., Takeshita, Y., Sasagawa, N., Ishiura, S., 2004. Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats. *Hum. Mol. Genet.* 13, 495–507.
- Kiuchi, A., Otsuka, N., Namba, Y., Nakano, I., Tomonaga, M., 1991. Presenile appearance of abundant Alzheimer's neurofibrillary tangles without senile plaques in the brain in myotonic dystrophy. *Acta Neuropathol. (Berl)* 82, 1–5.
- Ho, T.H., Charlet, B.N., Poulos, M.G., Singh, G., Swanson, M.S., Cooper, T.A., 2004. Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *EMBO J.* 23, 3103–3112.
- Ho, T.H., Savkur, R.S., Poulos, M.G., Mancini, M.A., Swanson, M.S., Cooper, T.A., 2005. Colocalization of muscleblind with RNA foci is separable from mis-regulation of alternative splicing in myotonic dystrophy. *J. Cell Sci.* 118, 2923–2933.
- Leroy, O., Wang, J., Maurage, C.A., Parent, M., Cooper, T., Buee, L., Sergeant, N., Andreadis, A., Caillet-Boudin, M.L., 2006a. Brain-specific change in alternative splicing of Tau exon 6 in myotonic dystrophy type 1. *Biochim. Biophys. Acta* 1762, 460–467.
- Leroy, O., Dhaenens, C.M., Schraen-Maschke, S., Belarbi, K., Delacourte, A., Andreadis, A., Sablonniere, B., Buee, L., Sergeant, N., Caillet-Boudin, M.L., 2006b. ETR-3 represses Tau exons 2/3 inclusion, a splicing event abnormally enhanced in myotonic dystrophy type 1. *J. Neurosci. Res.* 84, 852–859.
- Lin, X., Miller, J.W., Mankodi, A., Kanadia, R.N., Yuan, Y., Moxley, R.T., Swanson, M.S., Thornton, C.A., 2006. Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 15, 2087–2097.
- Mankodi, A., Urbinati, C.R., Yuan, Q.P., Moxley, R.T., Sansone, V., Krym, M., Henderson, D., Schalling, M., Swanson, M.S., Thornton, C.A., 2001. Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2165–2170.
- Miller, J.W., Urbinati, C.R., Teng-Umuay, P., Stenberg, M.G., Byrne, B.J., Thornton, C.A., Swanson, M.S., 2000. Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *EMBO J.* 19, 4439–4448.
- Oyamada, R., Hayashi, M., Katoh, Y., Tsuchiya, K., Mizutani, T., Tominaga, I., Kashima, H., 2006. Neurofibrillary tangles and deposition of oxidative products in the brain in cases of myotonic dystrophy. *Neuropathology* 26, 107–114.
- Pascual, M., Vicente, M., Monferrer, L., Artero, R., 2006. The muscleblind family of proteins: an emerging class of regulators of developmentally programmed alternative splicing. *Differentiation* 74, 65–80.
- Paul, S., Dansithong, W., Kim, D., Rossi, J., Webster, N.J., Comai, L., Reddy, S., 2006. Interaction of muscleblind, CUG-BP1 and hnRNP H proteins in DM1-associated aberrant IR splicing. *EMBO J.* 25, 4271–4283.
- Philips, A.V., Timchenko, L.T., Cooper, T.A., 1998. Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* 280, 737–741.
- Savkur, R.S., Philips, A.V., Cooper, T.A., 2001. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat. Genet.* 29, 40–47.
- Sergeant, N., Sablonniere, B., Schraen-Maschke, S., Ghestem, A., Maurage, C.A., Watzet, A., Vermersch, P., Delacourte, A., 2001. Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2143–2155.
- Taneja, K.L., McCurrach, M., Schalling, M., Housman, D., Singer, R.H., 1995. Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *J. Cell Biol.* 128, 995–1002.
- Vermersch, P., Sergeant, N., Ruchoux, M.M., Hofmann-Radvanyi, H., Watzet, A., Petit, H., Dwailly, P., Delacourte, A., 1996. Specific tau variants in the brains of patients with myotonic dystrophy. *Neurology* 47, 711–717.

Article 2

Altered splicing of Tau in DM1 is different from the foetal splicing process



Altered splicing of Tau in DM1 is different from the foetal splicing process

Dana Ghanem^{a,b}, Hélène Tran^{a,b}, Claire-Marie Dhaenens^{a,b}, Suzanna Schraen-Maschke^{a,b}, Bernard Sablonni  re^{a,b}, Luc Bu  e^{a,b}, Nicolas Sergeant^{a,b,1,*}, Marie-Laure Caillet-Boudin^{a,b,1,*}

^aInserm U837 – Jean-Pierre Aubert Research Centre, Université de Lille, Institut de Médecine Prédictive et Recherche Thérapeutique, Place de Verdun, F-59045 Lille Cedex, France
^bUniversit   de Lille II, Faculté de Médecine, Institut de Médecine Prédictive et Recherche Thérapeutique, Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert, Place de Verdun, 59045 Lille Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 8 October 2008
 Revised 18 December 2008
 Accepted 30 December 2008
 Available online 21 January 2009

Edited by Jesus Avila

Keywords:
 Microtubule-associated protein Tau
 Alternative splicing
 Myotonic dystrophy
 Development
 Brain

ABSTRACT

Among the different mechanisms underlying the etiopathogenesis of myotonic dystrophy type 1 (DM1), a backward reprogramming to a foetal splicing machinery is an interesting hypothesis. To address this possibility, Tau splicing, which is regulated during development and modified in DM1, was analyzed. Indeed, a preferential expression of the foetal Tau isoform, instead of the six normally found, is observed in adult DM1 brains. By using two cell lines, we show here that the cis-regulating elements necessary to generate the unique foetal Tau isoform are dispensable to reproduce the trans-dominant effect induced by DM1 mutation on Tau exon 2 inclusion. Our results suggest that the mis-splicing of Tau in DM1 is resulting from a disease-associated mechanism.
    2009 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Myotonic dystrophy of type 1 (DM1) is a multisystemic disorder characterized by myotonia, progressive muscle weakness, wasting of skeletal muscle and extramuscular symptoms including brain dysfunctions (for review see [1,2]). Neurological symptoms include mental retardation, sleep disorders, behavioural changes, alterations in brain structure and cognitive deficits (for review see [3,4]).

DM1 is caused by a pathological expansion of an unstable CTG repeat ($n > 50$) located in the 3' untranslated region of *myotonic dystrophy protein kinase* gene (*DMPK*) [5]. Clinical expression of DM1 is likely the consequence of a pathogenic RNA gain of function mechanism by which the CUG repeats alter the function of splicing factors such as MBNL and CELF families [6]. As a consequence, alternative splicing of cardiac Troponin T (hcTNT), Insulin Receptor (IR), Tau and muscle-specific Chloride Channel-1 (ClC-1) tran-

scripts is altered in several organs (heart, skeletal muscle, brain, etc.) (for review see [7]). The modified splicing of these transcripts is paralleled by the clinical symptoms.

Noteworthy, the splicing defect consists of the preferential expression of the foetal isoforms of numerous transcripts targeted by the *trans* effect of the mutation (reviewed in [7]). This observation could suggest that CUG repeats induce an adult to foetal reprogramming of the splicing machinery in DM1. Alternatively, the DM1 foetal-type pattern could result from a disease-associated mechanism. In the brain and muscles of DM1 patients, we and others reported a modified splicing of Tau that clearly favours the expression of the unique foetal human brain isoform [8–11]. In adult human central nervous system, six major isoforms of Tau are expressed that differ from each other by the inclusion or exclusion of exons 2, 3 and 10 (For review see [12]). In the human foetal brain, one Tau isoform lacking exons 2, 3 and 10 is expressed. Thus, as described for other transcripts such as hcTNT and IR, the DM1 altered splicing leads to an increased expression of the unique foetal isoform of Tau.

In the present study, we evaluated whether the splicing mechanism leading to a foetal-type splicing of Tau results from an adult to foetal reprogramming of the splicing machinery or from DM1 specific mechanism. Because Tau exon 2 is largely included in human adult brain and preferentially excluded in DM1 brain, we focused our study on exon 2 splicing mechanism. We compared the splicing effect of CTG repeats on exon 2 splicing from endogenous

Abbreviations: DM, myotonic dystrophy; DMPK, dystrophin myotonia protein kinase; cTNT, cardiac troponin T; ClC-1, chloride channel-1; IR, insulin receptor

* Corresponding authors. Address: Inserm U837 – Jean-Pierre Aubert Research Centre, Université de Lille 2, Institut de Médecine Pr  dictive et Recherche Th  rapeutique, Place de Verdun, F-59045 Lille Cedex, France. Fax: +33 320622079.

E-mail addresses: nicolas.sergeant@inserm.fr (N. Sergeant), marie-laure.caillet-boudin@inserm.fr (M.-L. Caillet-Boudin).

URL: <http://www.lille.inserm.fr/site/unite422/en/> (M.-L. Caillet-Boudin).

¹ Authors equally contribute to the work.

676

D. Ghanem et al./FEBS Letters 583 (2009) 675–679

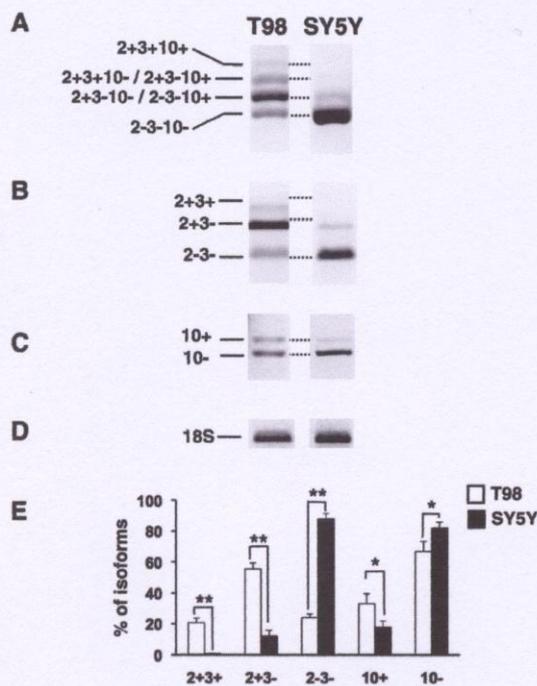


Fig. 1. Alternative splicing of endogenous Tau in human Glioblastoma T98 and Neuroblastoma SY5Y cell lines. Splicing profile is analyzed by RT-PCR using Tau E1/E13 primer pair in (A), Tau E1/E4 primer pair in (B) and Tau E9/E13 (C) (see Table 1 for the localization of Tau primers). 18S amplification is used as control of the RNA quantity amplified in (D). Note the preferential inclusion of exon 2 of Tau in T98 cell line and its preferential exclusion in SY5Y cell line. The quantitative analysis of Tau isoform expression is represented in (E). Significant differences in the isoforms expression between the two cell lines are indicated by asterisks (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

or minigene tau transcripts in two human cell lines characterized by a different Tau splicing pattern.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and transfection

Human glioblastoma T98G (T98) and neuroblastoma SK-N-SH SY5Y (SY5Y) cell lines were maintained in DMEM medium supplemented with 10% foetal calf serum, 50 IU/ml penicillin, 50 μ g/ml

streptomycin and 4 mmol/L glutamine. Cell-transfections were performed using Fugene HD transfection reagent (Roche, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions.

2.2. Plasmids

Human cells were transfected with pcDNA3 plasmids containing 5, 200 or 960 CTG triplets [11] or co-transfected with human Tau 2/3 or 2 Δ 3 minigenes as described [13]. Tau 2/3 and 2 Δ 3 minigenes differ from the endogenous *MAPT* gene by a truncation of intron 1–2: the sequence of the intron upstream the exon 2 was limited to the 878 nucleotides located in the 5' region before exon 2 (instead of the 9388 nt) (Fig. 2A). The length of intron 2–3 is identical to *MAPT* gene in Tau 2/3 minigene whereas the 3' intron 2–3 region is shorter in the Tau 2 Δ 3 minigene (2092nt instead of 2439 nt in *MAPT* gene) (Fig. 2A).

Plasmids containing the 3'UTR of DMPK with 5 or 200 CTG repeats were derived from previously described constructs under a rodent ROSA promoter [14]. Briefly, the plasmids contained 5 or 200 CTG triplets flanked by the 3'UTR sequences neighboring (about 800 and 600 bp upstream and downstream) the CTG triplets. The constructs were subcloned into pcDNA 3.1 under the control of the CMV promoter [11]. The plasmid containing the 3'UTR of DMPK with 960 interrupted CTGs was a minigene construct also under the control of the CMV promoter. It contained the last 5 exons of DMPK followed by the full length DMPK 3'UTR, with 960 CTG repeats interrupted at every 20th repeat by CTCGA motif [15].

Plasmids DNA were purified using Nucleobond AX (Macherey-Nagel).

2.3. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted from cells 48 h post-transfection using a total RNA extraction kit (Nucleospin RNA II- Macherey-Nagel). Total RNA (1.5 μ g) was reverse transcribed using pd(N)₆ random hexamer (Amersham 27-2166-01) and Superscript First strand synthesis system for RT-PCR, according to the supplier's instructions (Invitrogen). After reverse transcription, the reaction mixture was diluted four times. Five microliters of the diluted cDNAs were amplified using Platinum PCR super mix (Invitrogen, California, USA). Briefly, the PCR mixture was heated at 94 °C for 3 min and followed by 25–35 cycles with 30 s at 94 °C, 30–60 s at the correct annealing temperature, depending on the primer pair used (see Table 1), 1 min extension at 72 °C and a final extension step at 72 °C for 7 min. RT-PCR products were analyzed by 3% (wt/vol) agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. RT-PCR experiment was at least performed three times with total RNA extracted from three different passages of cell culture. 18S mRNA amplification was used as a control of RNA quantity [9]. Quantification of ethidium bromide luminescence was measured using a

Table 1

List of primers used to analyze the expression of Tau isoforms and the alternative splicing of Tau exons 2 and 3. The first column indicates the sequences that were amplified (Exon: E). The second contains the sequence of the forward and reverse primers (Sense/Antisense). PCR conditions and size of the fragments are indicated in the last two columns.

Sequence amplified	Sense/antisense primers	PCR conditions: T ^m Hybridization, cycle number	Fragment size (bp)
Tau E1 > E13	5'-GTTGGGGGACAGGAAGATC-3' 5'-GTCTACCATGTCCGATGCTGC-3'	65 °C, 35 cycles	933, 1020, 1026, 1107, 1113, 1200
Tau E1 > E4	5'-TACGGGTGGGGGACAGGAAGATC-3' 5'-GGGGTGTCTCCAATGCCTGCTTCT-3'	65 °C, 35 cycles	112, 199, 286
Tau exon 2/3, Ins1 > Ins3	5'-CAGCTACAGTCGGAAACCATCAGCAAGCA-3' 5'-CACCTCCAGTCCCAAGGCTCTGAAGGTCACC-3'	65 °C, 25 cycles	290, 380, 470
Tau exon 2 Δ 3, Ins1 > Ins3	5'-CAGCTACAGTCGGAAACCATCAGCAAGCA-3' 5'-CACCTCCAGTCCCAAGGCTCTGAAGGTCACC-3'	65 °C, 25 cycles	290, 380
TauE9 > E13	5'-CATGGCAGACCTGAAGAATGTCAAG-3' 5'-TCACAAACCTGCTTGGCCA-3'	65 °C, 35 cycles	580, 487
ARN18S	5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3' 5'-CGCTCCCAAGATCCAACCTAC-3'	58 °C, 15 cycles	250

Fluorolmager scanner (Clarithvision, France) and quantified using MultiGauge software (Fujifilm). Statistic analyses of a minimum of three individual experiments were calculated using Prism Software and a Mann–Whitney *U*-Test.

3. Results

Several human cell lines were analyzed in order to identify two distinct splicing patterns of Tau: one corresponding to the adult pattern and the second corresponding to the foetal profile of Tau splicing. The endogenous Tau splicing pattern was analyzed in nervous system derived human cells lines T98 and SY5Y cells. Using the Tau E1/E13 primer pair (Table 1), we observed four bands in T98 cell RNAs with a size corresponding to the four expected bands, if all 6 adult isoforms of Tau are expressed (1200 bp, ± 1100 bp, ± 1000 bp, and 933 bp) (Fig. 1A). These bands were cloned and sequenced to confirm the identity of the isoforms of Tau (not shown). In SY5Y cells, a major band corresponding to the foetal isoform of Tau, without exons 2, 3 and 10, was mainly observed. A minor band, corresponding to the isoform of Tau with only one exon (exon 2 or 10), was also faintly detected. RT-PCR analysis with Tau E2/E3 primers confirmed that exon 2 of Tau was preferentially included in T98 cells and excluded in SY5Y cells (Fig. 1B). Using Tau E9/E13 primer pair to analyze the splicing of exon 10, we detected a higher inclusion of exon 10 in T98 ($33.2 \pm 6.5\%$) than in SY5Y ($17.9 \pm 3.8\%$) cells (Fig. 1C and E). Thus, sequencing of the bands amplified with Tau E1/E13 primer pair as well as the separated analysis of exons 2/3 (Tau E1/E4 primer

pair) and 10 (Tau E9/E13 primer pair) are in favour of a splicing pattern of Tau in T98 cells similar to an adult brain pattern, whereas in SY5Y, Tau splicing pattern is similar to a foetal one, as quantified on Fig. 1E.

In order to determine whether the RNA cis-regulating element required to reproduce the foetal pattern of Tau splicing is similar or distinct from the one implicated in the trans-dominant effect of CUG repeats, we used Tau minigenes (Fig. 2B). T98 and SY5Y cells were transfected with minigenes Tau 2/3 or Tau 2 Δ 3 alone. The dominant pattern was the inclusion of Tau exon 2 in both cell lines (Fig. 2C). In T98 cells, the splicing pattern of Tau minigenes is comparable to the endogenous one. In sharp contrast, we observed an alternative splicing of Tau exons 2 or 2/3 from minigenes in SY5Y cells. Indeed, Tau exon 2 is mainly included in SY5Y using Tau 2/3 and Tau 2 Δ 3 minigenes (Fig. 2C: $12.2 \pm 0.4\%$ and $32.2 \pm 3.0\%$ of Tau exon 2 exclusion, respectively) that is strikingly different from endogenous repression of Tau exon 2 inclusion (more than 90% exclusion). Therefore, the cis-regulating elements of Tau minigenes are sufficient to reproduce the adult pattern of Tau splicing but intronic splicing silencers necessary to reproduce the foetal splicing pattern of Tau are likely missing since the inclusion of Tau 2 is not completely repressed in SY5Y. If the cis-regulating element for the trans-dominant effect of CUG repeats and foetal pattern of exon 2 splicing is the same, then Tau minigenes should not respond to CUG repeats. Therefore, we took advantage of the differences between T98 and SY5Y cell lines to analyze the effects of CUG repeats ($n = 5, 200$ or 960) on Tau exon 2 splicing from both endogenous or minigene transcripts.

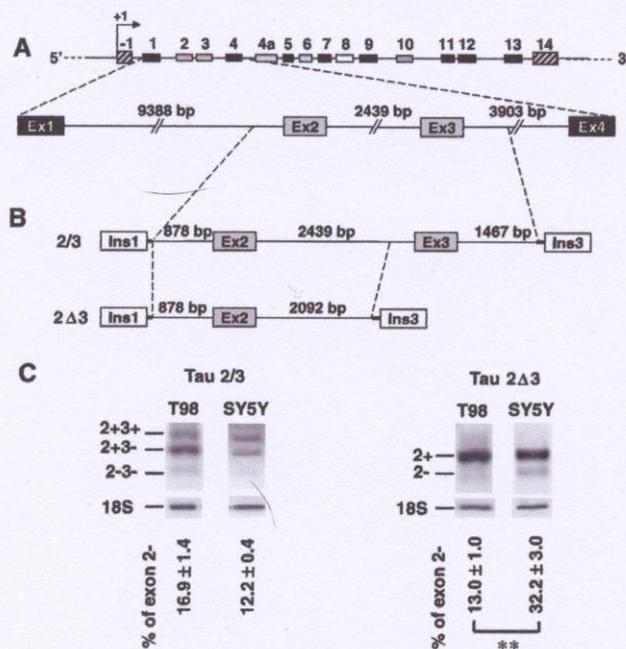


Fig. 2. Structure of the human *MAPT* gene and minigenes. (A) Schematic representation of the human *MAPT* gene with the untranslated exons in hatched squares, the constitutive ones in black squares, the alternatively spliced ones in grey and the exon 8 which is always skipped is in white. Lines represent intronic regions. Note that the scale of the *MAPT* exons and introns is artificial. *MAPT* gene is constituted of 16 exons among which 5 are being alternatively spliced. Exons 2, 3 and 10 are adult-specific exons in the human central nervous system. In order to compare the *MAPT* sequence to that of Tau minigenes, we have represented an enlargement of the *MAPT* exons 1–4 and their surrounding introns. (B) Schematic representation of Tau minigenes: Tau 2/3 and Tau 2 Δ 3. Rat insulin exonic and intronic sequences of the parental vector are, respectively, represented with white squares and bold lines. The length of the intronic sequences surrounding exons 2 and 3 in the human gene and minigenes are indicated above. (C) Splicing of Tau 2/3 and Tau 2 Δ 3 minigenes in T98 and SY5Y cell lines. Identity of the bands amplified by RT-PCR using Ins1 and Ins3 primer pair are indicated (, $P < 0.01$).

As observed in Fig. 3A, transfection with 960 CTG repeats induced a significant increase of the exclusion of the endogenous Tau exon 2 (from $26.1 \pm 2.3\%$ to $40 \pm 5.2\%$, $P < 0.01$) in T98 cells. Noticeably, 200 CTG moderately modified the inclusion of Tau exon 2 when compared to the normal CTG allele bearing 5 CTG repeats (Fig. 3A). In SY5Y, endogenous exon 2 exclusion was not further enhanced by CTG repeats, suggesting that the repression of exon 2 inclusion was maximum in this cell line. In contrast, the CTG 960 repeats induced a clear and significantly increased exon 2 exclusion in both T98 and SY5Y when these cell lines were co-transfected with Tau 2Δ3 or Tau 2/3 minigenes (Fig. 3B and C). Noticeably, 200 CTG repeats lightly but significantly modified the exclusion of Tau exon 2 from 2Δ3 and 2/3 minigene transcripts in SY5Y (Fig. 3B and C). Our results demonstrated that inclusion

of exon 2 in minigene transcripts could be repressed by long CUG tracks in both cell lines, and contrast with the endogenous splicing pattern of Tau. We also verified that 3'UTR of *DMPK* constructs bearing the CTG repeats were overexpressed at the same level by performing a RT-PCR of the region just downstream the repeats (data not shown). Altogether, our results obtained using Tau minigenes show that the *cis*-regulating element(s) necessary to produce the foetal Tau isoform are dispensable for the trans-dominant effect of CUG repeats.

4. Discussion

In this study, the question addressed, as far as Tau splicing is concerned, was to determine whether the modified splicing of

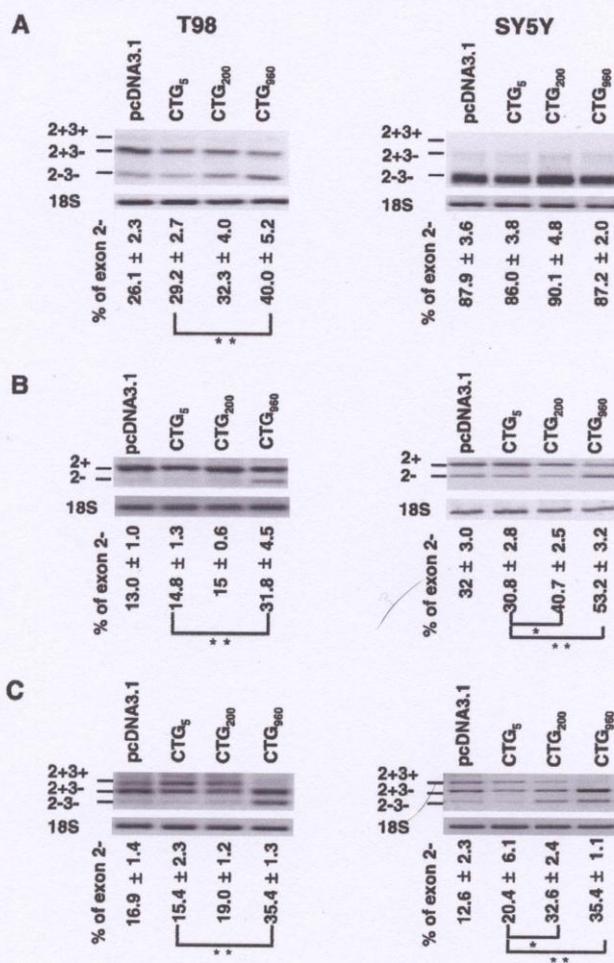


Fig. 3. Effect of CUG repeats expression on the alternative splicing of exon 2 or exons 2/3 of Tau. (A) Analysis of endogenous Tau splicing in both T98 and SY5Y cell lines transfected with pcDNA3.1 empty vector or pcDNA containing 5, 200 or 960 CTG repeats as indicated above the lanes. PCR were performed using Tau E1/E4 primers. (B) and (C) Analysis of minigene splicing after co-transfection of the CTG plasmids with Tau 2Δ3 or Tau 2/3 minigenes, respectively. The plasmids were transfected with a 1:1 ratio. Minigene splicing was analyzed by RT-PCR using Ins1/Ins3 primers. CTG 960 repeats favoured the exclusion of exon 2 from both minigenes in both cells. PCR products were quantified as detailed in materials and methods. The number underneath each lane indicates the percentage of Tau exon 2 exclusion (averaged ± S.E.M. for at least three independent experiment). Significant differences are indicated by asterisks: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Tau observed in DM1 implies a developmental or a disease-associated mechanism. The congenital form of DM1, which is the most severe expression of the disease, is certainly resulting from a defective development of several organs, including the brain. In the adult form, the development is "normal" and the onset and severity of the disease depend upon the length of CUG repeats in RNAs translated by the mutated *DMPK* gene. The dynamic instability and mosaicism of the mutation should also be considered as important promoting factors. Nevertheless, long CUG repeats induce a modified splicing of Tau leading to the greatly increased expression of the foetal isoform [10,11]. The defective splicing of Tau affects the three adult cassettes consisting of exons 2, 3 and 10 [8,10–11]. Herein, we focused on Tau exons 2 and 3 as we previously showed that the modified splicing of those exons was reproduced in presence of long CUG tracks [11].

Alternative splicing implies cis- (RNA) and trans-regulating (proteins) elements. In regard to Tau, several repressing factors of the inclusion of Tau exon 2 have been characterized, such as ETR-3 and MBNL1 [9,11,16]. However, less is known about the cis-regulating elements and more particularly about the intronic cis-regulating sequences. The Tau exon 2 default pattern of splicing is the inclusion [13]. Therefore, the skipping of this exon is probably due to a trans-repressing factor that recognizes an intronic splicing silencer element. Our results are in favour of such a hypothesis. In SY5Y cells, the endogenous exon 2 and exon 3 are mainly excluded whereas they are mainly included when using Tau minigenes. In contrast, exon 2 and exon 3 were mainly included in endogenous Tau transcripts of T98 cells. There is one weak exonic splicing silencer in exon 2 and one intronic splicing silencer in the 3' region of intron 2–3 [17]. As these two elements are present in both endogenous *MAPT* and Tau minigenes, the difference of Tau splicing pattern is likely not mediated via those regulatory elements. Another possibility would be that an intronic repressing element, yet unidentified, is present in the intron 1–2 sequence. The intron 1–2 is shorter in the minigene than in *MAPT*. The missing sequence may contain one or several intronic splicing silencers that are essential to produce the foetal isoform of Tau expressed in SY5Y cells. In regards to DM1 pathophysiology, if the modified splicing pattern of Tau results from an adult to foetal reprogramming of the splicing machinery, the intronic splicing silencer necessary to produce the foetal Tau isoform in SY5Y may also be the one targeted by the trans-dominant effect of CUG repeats. To determine whether those sequences were also necessary to mediate the trans-dominant effect of CUG repeats, the minigenes Tau 2Δ3 and 2/3 were co-expressed with 5, 200 or 960 CTG repeats in both T98 and SY5Y. Inclusion of the exon 2 of Tau from the minigenes was strongly repressed by CTG 960 demonstrating that there is a cis-repressing element in Tau minigenes. Moreover, this repressing sequence implies an inducible mechanism that is not functional by default. Thus, the repression of Tau exon 2 inclusion is only activated following transfection of CTG 960 and not observed using minigenes alone. Our results demonstrate that the sequence targeted by the trans-splicing effect of CTG repeats is necessarily located in the minigenes. A foetal Tau isoform is expressed in SY5Y. However, Tau minigenes are lacking the cis-regulating elements necessary to reproduce this foetal splicing. In contrast, Tau minigenes have a cis-repressing element sensitive to CTG repeats, which together suggest that the latter splicing mechanism is a disease-associated mechanism. This mechanism is likely independent of the foetal splicing process, as far as Tau exon 2/3 splicing is concerned.

In conclusion, our data strongly suggest that the mechanism leading to a defective inclusion of exons 2 and 3 in DM1 is likely different from the one taking place during development. Therefore, we propose that the modified splicing of Tau in DM1 may not be

the consequence of an adult to foetal reprogramming of the splicing machinery. A disease-associated mechanism would be induced by CUG repeats in mutated *DMPK* RNAs. Our results are important in a therapeutic point of view since molecules that would restore the normal splicing of Tau may not interfere with the mechanisms implicated to generate the Tau adult isoforms. Our data strongly suggest that both mechanisms are independent.

Acknowledgements

This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM, NM10908, NM13510, NM12570), INSERM, CNRS, IMPRT and Université de Lille 2. Dana Ghanem is a recipient fellowship of the French ministry of research. Helene Tran is recipient fellowship of Inserm region Nord-Pas-de-Calais. We are grateful to Athena Andreadis, Tom Cooper and Mani Mahadevan who kindly provided us with Tau 2/3 and 2Δ3 constructs and CTG960, CTG200 and CTG5, respectively. We are very grateful to the French consortium on Myotonic Dystrophy that is supported by AFM and their members Isabelle Behm-Ansmant, Christaine Branlant, Nicolas Charlet, Denis Furling, Mario Gomes-Pereira, Geneviève Gourdon, Nathalie Gourrier, Fabrice Leclerc and Joëlle Marie for their helpful discussion.

References

- [1] Machuca-Tzili, L., Brook, D. and Hilton-Jones, D. (2005) Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: a review. *Muscle Nerve* 32, 1–18.
- [2] Ranum, L.P. and Cooper, T.A. (2006) RNA-mediated neuromuscular disorders. *Annu. Rev. Neurosci.* 29, 259–277.
- [3] Meola, G. and Sansone, V. (2007) Cerebral involvement in myotonic dystrophies. *Muscle Nerve* 36, 294–306.
- [4] de Leon, M.B. and Cisneros, B. (2008) Myotonic dystrophy 1 in the nervous system: from the clinic to molecular mechanisms. *J. Neurosci. Res.* 86, 18–26.
- [5] Brook, J.D. et al. (1992) Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 69, 385.
- [6] Orengo, J.P. and Cooper, T.A. (2007) Alternative splicing in disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 623, 212–223.
- [7] Cho, D.H. and Tapscott, S.J. (2007) Myotonic dystrophy: emerging mechanisms for DM1 and DM2. *Biochim. Biophys. Acta* 1772, 195–204.
- [8] Jiang, H., Mankodi, A., Swanson, M.S., Moxley, R.T. and Thornton, C.A. (2004) Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Hum. Mol. Genet.* 13, 3079–3088.
- [9] Leroy, O., Wang, J., Maurice, C.A., Parent, M., Cooper, T., Buee, L., Sergeant, N., Andreadis, A. and Cailliet-Boudin, M.L. (2006) Brain-specific change in alternative splicing of Tau exon 6 in myotonic dystrophy type 1. *Biochim. Biophys. Acta* 1762, 460–467.
- [10] Sergeant, N., Sablonniere, B., Schraen-Maschke, S., Ghestem, A., Maurice, C.A., Watzte, A., Vermersch, P. and Delacourte, A. (2001) Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum. Mol. Genet.* 10, 2143–2155.
- [11] Dhaenens, C.M. et al. (2008) Overexpression of MBNL1 fetal isoforms and modified splicing of Tau in the DM1 brain: two individual consequences of CUG trinucleotide repeats. *Exp. Neurol.* 210, 467–478.
- [12] Sergeant, N. et al. (2008) Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease and related neurological disorders. *Expert Rev. Proteomics* 5, 207–224.
- [13] Andreadis, A., Broderick, J.A. and Kosik, K.S. (1995) Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons. *Nucleic Acids Res.* 23, 3585–3593.
- [14] Amack, J.D., Paguio, A.P. and Mahadevan, M.S. (1999) Cis and trans effects of the myotonic dystrophy (DM) mutation in a cell culture model. *Hum. Mol. Genet.* 8, 1975–1984.
- [15] Ho, T.H., Savkur, R.S., Poulos, M.G., Mancini, M.A., Swanson, M.S. and Cooper, T.A. (2005) Colocalization of muscleblind with RNA foci is separable from misregulation of alternative splicing in myotonic dystrophy. *J. Cell Sci.* 118, 2923–2933.
- [16] Leroy, O., Dhaenens, C.M., Schraen-Maschke, S., Belarbi, K., Delacourte, A., Andreadis, A., Sablonniere, B., Buee, L., Sergeant, N. and Cailliet-Boudin, M.L. (2006) ETR-3 represses Tau exons 2/3 inclusion a splicing event abnormally enhanced in myotonic dystrophy type 1. *J. Neurosci. Res.* 84, 852–859.
- [17] Li, K., Arikian, M.C. and Andreadis, A. (2003) Modulation of the membrane-binding domain of tau protein: splicing regulation of exon 2. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 116, 94–105.

II) Régulation et dérégulation de l'épissage alternatif de l'exon 2 de Tau par les expansions de triplets CTG

L'exon 2 est incorporé dans 50% des transcrits de Tau dans le cerveau et 100% des transcrits dans le muscle squelettique (Wei et al., 1998, Leroy et al., 2006a). Dans les cerveaux de patients atteints de DM1, une altération d'épissage de cet exon a été systématiquement retrouvée dans tous les cas analysés (Sergeant et al., 2001, Jiang et al., 2004). De plus, comme cela a été reporté par le laboratoire, cette altération est également observée dans le muscle (Leroy et al., 2006a).

Dans la DM1, l'exon 2 de Tau est préférentiellement exclu. Les facteurs Mbnl1 et ETR-3, dérégulés dans la DM1, régulent son épissage alternatif (Dhaenens et al., 2008, Leroy et al., 2006). Ici, et en collaboration avec le laboratoire du Dr Christianne Branlant à Nancy, nous avons recherché les éléments *cis* régulateurs impliqués dans la régulation d'épissage de cet exon et en conditions «normales», c'est-à-dire en l'absence de CTG, et en réponse aux expansions de triplets CTG. Par ailleurs, nous avons cherché à savoir si les éléments *cis* impliqués dans l'effet des CTG correspondent à ceux impliqués dans l'effet du facteur ETR-3.

A) A la recherche d'éléments *cis* régulateurs, cibles de l'effet des expansions de triplets CTG

Notre stratégie de recherche d'éléments *cis* régulateurs d'épissage de l'exon 2 s'est basée sur la réalisation de délétions introniques dans le minigène 2Δ3, qui sert ici de référence. Des minigènes Tau tronqués ont été transfectés dans des lignées cellulaires, soit avec un plasmide contrôle, pcDNA, pour analyser leur épissage dit « normal », soit avec des plasmides contenant 5, 200 ou 960 triplets CTG afin d'étudier l'effet des expansions. De cette manière, une modification de l'épissage alternatif d'un minigène tronqué signifie que la région délétée contient un élément *cis* régulateur; et la modification de l'effet *trans*-dominant signifie, quant à elle, que la région en question contient un élément *cis* impliqué dans l'effet des expansions de CTG.

Nos expériences ont été menées de front dans deux lignées cellulaires: les cellules de glioblastome (T98) et de neuroblastome (SY5Y). Ces deux lignées expriment des facteurs d'épissage différents (Leroy et al., 2006b) et montrent, de ce fait, des profils d'épissage du minigène 2Δ3 comparables mais significativement différents: dans les T98, l'exclusion de l'exon 2 est très minoritaire et ne correspond qu'à 6% des transcrits, tandis que, dans les SY5Y, elle atteint 22% (Figure 23A et B). Le minigène de référence, 2Δ3, à partir duquel des délétions introniques ont été réalisées, contient 878 nucléotides de l'intron naturellement situé en amont de l'exon 2 et 2100 nucléotides de celui nativement présent en aval (Figure 23 A et B). En fonction de la taille de l'intron présent en amont ou en aval de l'exon après délétion, les minigènes tronqués ont été appelés: 250 E2 250, 500 E2 500, 800 E2 500, 500 E2 2100 et 878 E2 1050 (Figure 23A et B).

- **Recherche des éléments *cis* régulateurs d'épissage alternatif de l'exon 2**

Quand on analyse l'effet des délétions sur l'épissage alternatif de l'exon 2 en conditions « normales » (condition pcDNA), on constate que les minigènes ne contenant que 250 nucléotides (minigène 250 E2 250) ou 500 nucléotides (minigène 500 E2 500) de part et d'autre de l'exon 2 montrent une perte quasi-totale de la capacité à produire une isoforme 2- (Figure 23A et B). Cet effet sur l'épissage alternatif est observé dans les deux types cellulaires. Dans les SY5Y, le pourcentage d'isoforme 2- de Tau passe de 22% (2Δ3) à 3,5% (250 E2 250) et 4,3% (500 E2 500) (Figure 23A). Ce résultat révèle l'existence d'éléments *cis* régulateurs qui contribuent à l'exclusion de l'exon 2 dans les régions introniques délétées. Ces éléments sont localisés au-delà des 500 nucléotides environnants et correspondent à un ou plusieurs «silencers». L'épissage du minigène 800 E2 500 donne un résultat similaire (Figure 23A et B), indiquant que les «silencers» sont présents dans les régions introniques entre -878 et -800 nucléotides en amont et/ou +500 et +2100 nucléotides en aval. Afin de savoir si ces éléments sont présents en amont ou en aval de l'exon 2, l'épissage d'un minigène tronqué en amont, mais possédant l'entièreté de la séquence en aval (minigène 500 E2 2100), a été analysé. Dans les cellules SY5Y, ce minigène est capable de produire une isoforme 2- (Figure 23A) démontrant qu'un ou plusieurs éléments «silencers» sont présents dans la région intronique en aval, entre les nucléotides +500 et +2100.

L'implication de cette région dans l'exclusion de l'exon 2 a été confirmée grâce au minigène 878 E2 1050. Dans les cellules T98, ce minigène donne lieu à 2% d'isoforme 2- au lieu des 6% obtenus avec le minigène contrôle 2Δ3 (Figure 23B). Ce résultat indique donc que des «silencers», présents en aval de l'exon 2, sont localisés entre les nucléotides +1050 et +2100.

On peut remarquer que le pourcentage d'exclusion obtenu avec le minigène 500 E2 2100 dans les cellules SY5Y (12%) semble moins important que celui obtenu avec le 2Δ3 (22%). Ceci suggère la présence d'autres «silencers» en amont de l'exon 2. Etant donné que le minigène 800 E2 500 n'exprime pas l'isoforme 2-, on conclut que ces éléments doivent se situer entre les nucléotides -878 et -800 en amont de l'exon 2. Cependant, dans les cellules T98, le minigène 878 E2 1050 ne montre pas d'exclusion de l'exon 2. Ainsi, l'action des «silencers» suggérés en amont est dépendante de facteurs d'épissage spécifiques aux SY5Y.

Pour conclure, nos résultats montrent que l'épissage alternatif de l'exon 2 de Tau est régulé par des éléments «silencers» introniques. En aval de l'exon, nous avons pu révéler l'existence d'un ou plusieurs «silencers» dans une région comprise entre les nucléotides +500 et +2100. De plus, nos résultats montrent que certains de ces «silencers», si ce n'est pas tous, sont localisés entre les nucléotides +1050 et +2100. Nos résultats suggèrent également la présence d'autres «silencers», en amont de l'exon 2, entre les nucléotides -878 et -800.

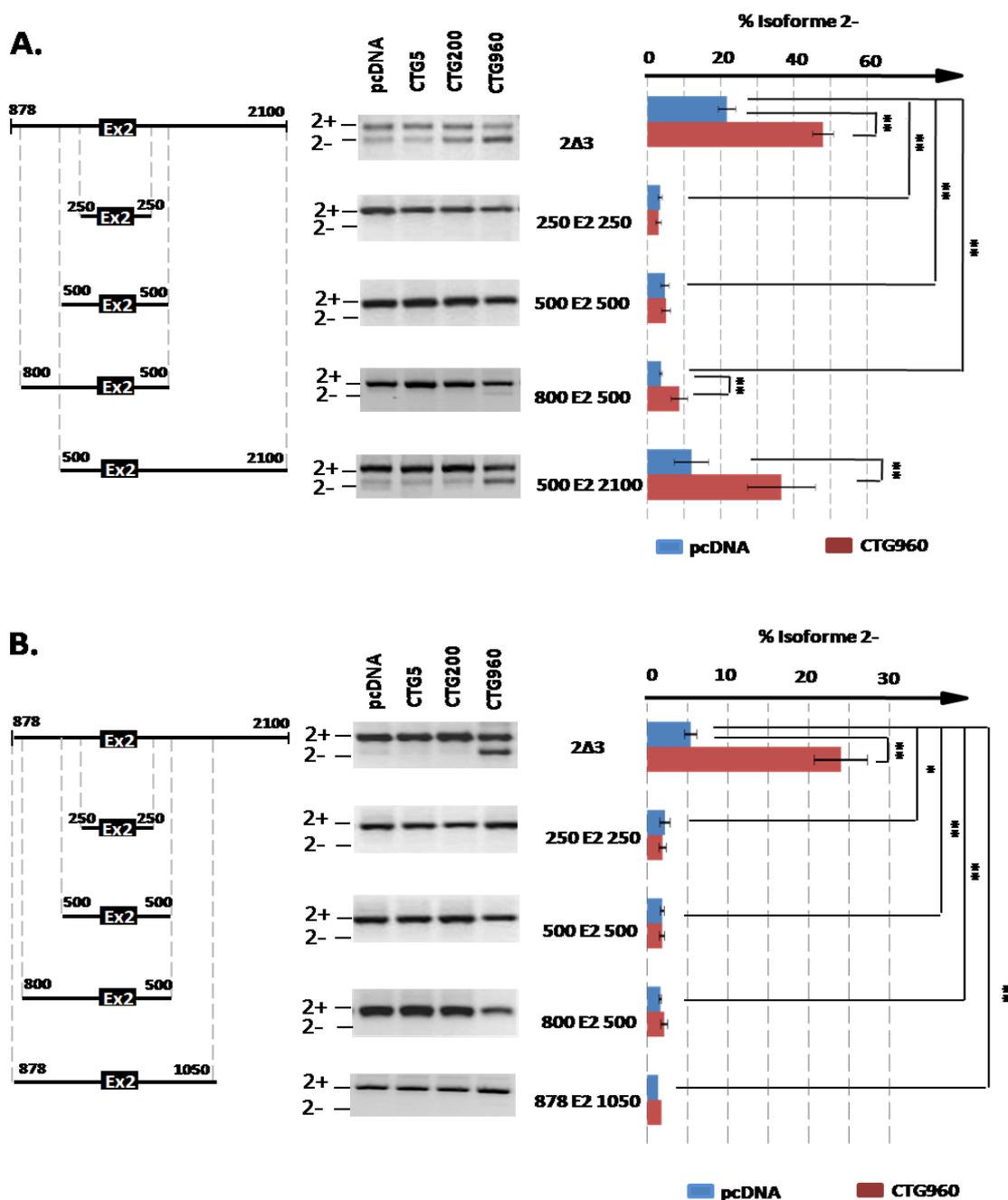


Figure 23: Recherche des éléments *cis* régulateurs d'épissage alternatif de l'exon 2 de Tau impliqués dans l'effet des expansions de CTG. La recherche d'éléments *cis* a été menée dans les cellules SY5Y (A) et T98 (B). La taille des introns des différents minigènes tronqués est indiquée sur les schémas à gauche. Les cellules ont été transfectées avec les minigènes tronqués soit avec un plasmide pcDNA vide, soit avec un plasmide pcDNA contenant 5, 200 ou 960 triplets CTG. L'épissage alternatif a été analysé par RT-PCR grâce aux primers INS 1 et INS3. Les barres d'erreur correspondent au SEM. La significativité des résultats est indiquée par * quand $p < 0.05$ et ** quand $p < 0.001$.

- **Recherche des régions introniques impliquées dans l'effet *trans*-dominant des expansions de triplets CTG sur l'épissage alternatif de l'exon 2**

Les expansions de triplets CTG induisent l'exclusion de l'exon 2 du minigène 2Δ3 dans les cellules SY5Y et T98 (Figure 23A et B). Dans les SY5Y, en présence des CT960, le pourcentage d'isoforme 2- passe de 22% à 48% (Figure 23A). Dans les cellules T98, ce pourcentage passe de 6% à 24% (Figure 23B). Après la délétion d'une partie des séquences introniques présentes en amont et en aval de l'exon dans les minigènes 250 E2 250 et 500 E2 500, l'effet des CTG960 sur l'épissage alternatif de l'exon 2 est perdu (Figure 23A et B). Ainsi, les éléments *cis* régulateurs impliqués dans cet effet se trouvent au-delà des 500 nucléotides encadrant l'exon, en amont ou en aval. La co-transfection des deux lignées cellulaires avec le minigène 800 E2 500 et les CTG960 montre une légère exclusion de l'exon 2 seulement dans les cellules SY5Y (on passe de 3,7 % d'isoforme 2- à 6,4 %) (Figure 23A et B). Ce résultat indique qu'un élément *cis*, bien que très légèrement impliqué dans l'effet des expansions, est présent entre les nucléotides -800 et -500 en amont de l'exon 2. Il indique également que les facteurs d'épissage responsables de l'effet *trans*-dominant, sur cet élément *cis* régulateur, sont spécifiques aux SY5Y. L'implication de la région en aval de l'exon 2 a également été analysée dans les SY5Y grâce au minigène 500 E2 2100. Ce minigène répond aux expansions par une augmentation d'exclusion, similaire à celle obtenue avec le minigène contrôle, 2Δ3 (amplitude d'exclusion de 26,3% pour le 2Δ3 et de 24,6% pour le 500 E2 2100) (Figure 23A). Ainsi, les éléments *cis* responsables de la majorité de l'effet des expansions se trouvent en aval de l'exon, entre les nucléotides +500 et +2100. L'implication de la région intronique en aval de l'exon a également été démontrée grâce au minigène 878 E2 1050. Ce minigène, non délété dans sa région intronique en amont de l'exon 2, a été transfecté dans les cellules T98 (Figure 23B). Dans ces cellules, ce minigène montre une perte totale de réponse à l'effet *trans*-dominant (Figure 23B), signifiant par là que les éléments *cis* impliqués dans cet effet se trouvent en aval de l'exon, entre les nucléotides +1050 et +2100.

Pour conclure, notre étude de l'effet *trans*-dominant sur l'exon 2 de Tau souligne l'importance d'une région intronique située en aval de l'exon dans cet effet. Cette région se

situé entre les nucléotides +500 et +2100. Au sein de cette région, nous avons pu cibler une zone entre les nucléotides +1050 et +2100. Nous montrons également une faible implication d'une région en amont de l'exon 2, entre les nucléotides -500 et -800.

B) Effet du facteur régulateur ETR-3 sur l'épissage alternatif de l'exon 2 de Tau: quelles sont les régions introniques impliquées?

Dans la DM1, la dérégulation du facteur régulateur ETR-3 de la famille CELF correspond à une augmentation de son niveau protéique et de sa localisation nucléaire (Wang et al., 2007b). Il avait été montré dans le laboratoire que la répression d'inclusion de l'exon 2 de Tau, observée dans la DM1, pouvait être induite par la surexpression de ETR-3 (Leroy et al., 2006b). Nous avons donc cherché à déterminer si les régions introniques de Tau impliquées dans l'effet de ETR-3 étaient celles impliquées dans l'effet des expansions de triplets sur l'épissage. Pour cela, nous avons transfecté les cellules T98 avec différents minigènes Tau (2Δ3, 250 E2 250, 500 E2 500 et 500 et 2100), soit avec un plasmide pcDNA vide, soit avec un pcDNA contenant l'ADNc de ETR-3 (Figure 24). Après l'analyse de l'effet de ETR-3 sur ces différents minigènes, on constate que ce dernier induit l'exclusion de l'exon 2 seulement avec les minigènes 2Δ3 et le 500 E2 2100 (Figure 24). Ce résultat suppose que, comme pour l'effet des expansions, les séquences impliquées dans l'effet de ETR-3 sur Tau soient localisées entre les nucléotides +500 et +2100 en aval de l'exon. Cependant, l'effet de ETR-3 sur le 500 E2 2100 est plus faible que sur le 2Δ3. Ceci suggère l'implication d'une autre région intronique, entre -878 et -500 nucléotides en amont de l'exon, dans l'effet de ETR-3 sur l'exon 2 (Figure 24).

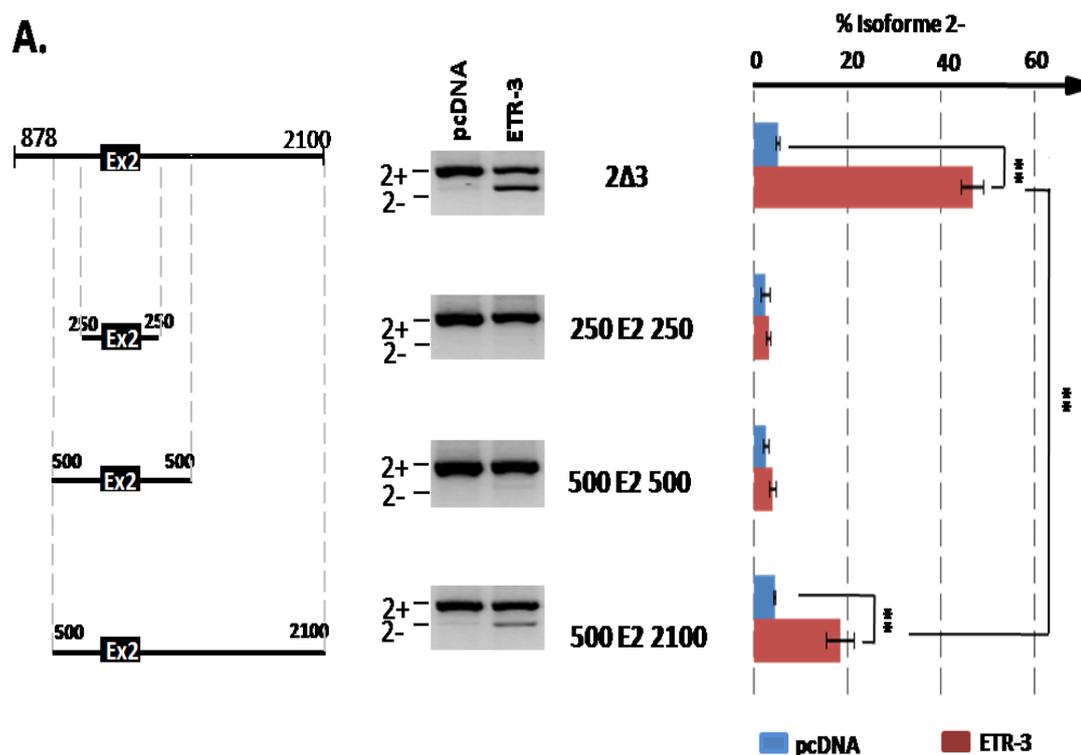


Figure 24: Régions introniques de Tau sensibles au facteur d'épissage ETR-3. Différents minigènes Tau tronqués dans leurs parties introniques encadrant l'exon 2 ont été co-transfectés dans les cellules T98 avec un plasmide pcDNA vide ou contenant l'ADNc du facteur d'épissage ETR-3. Ces données sont le résultat d'au moins trois expériences indépendantes. L'épissage alternatif a été analysé par RT-PCR grâce aux primers INS 1 et INS3. Les barres d'erreur correspondent au SEM. La significativité des résultats est indiquée par * quand $p < 0.05$ et ** quand $p < 0.001$.

III) Régulation et dérégulation de l'épissage alternatif de l'exon 5 de cTNT par les expansions de triplets CTG

Parmi les transcrits dérégulés dans la DM1, on trouve celui de la Troponine T cardiaque (cTNT), altéré dans le cœur. Sous l'effet des expansions de triplets CTG, l'exon 5 de cTNT devient préférentiellement inclus; ce qui correspond à un phénotype d'épissage de type foetal (Philips et al., 1998). Nous nous sommes donc intéressés à ce transcrit et aux mécanismes de régulation et de dérégulation de son épissage alternatif.

Ce travail est issu d'une collaboration qui a été menée avec l'équipe du Dr. Christiane Branlant à Nancy afin de (i) Identifier les éléments *cis* régulateurs de l'exon 5 de cTNT impliqués dans la régulation de son épissage alternatif en conditions « normales » et en réponse aux expansions de triplets CTG (ii) déterminer si les éléments *cis* impliqués dans l'effet *trans*-dominant sont ceux impliqués dans l'effet du facteur Mbnl1, facteur dérégulé dans la DM1 et connu pour réguler l'épissage alternatif de cTNT (Ho et al., 2004).

A) Détermination des régions introniques minimales nécessaires à la régulation de l'épissage alternatif et à l'effet trans-dominant des CTG

Dans un premier temps, nous avons cherché à délimiter les régions introniques minimales autour de l'exon 5 nécessaires à la régulation de son épissage alternatif et à l'effet des CTG. Pour cela, l'exon 5 bordé par différentes tailles de ses séquences introniques natives a été inséré dans le même vecteur qui a servi à l'étude de l'épissage alternatif de Tau, le minigène pSVIRB (Andreadis et al., 1993). Une série de trois minigènes, nommés 150 E5 150, 175 E5 150 et 175 E5 250, d'après la taille des régions introniques encadrant l'exon, a été élaborée. Ces minigènes ont été transfectés dans les cellules T98 soit avec un plasmide contrôle, pcDNA, pour analyser leur épissage dit « normal », soit avec des plasmides contenant 5, 200 ou 960 triplets CTG et cela afin d'étudier l'effet des expansions.

En l'absence de CTG, les trois minigènes montrent des profils d'épissage alternatif similaires permettant l'expression des isoformes 5+ et 5- (Figure 25). Toutefois, et en comparaison avec le 150 E 150, le minigène 175 E5 250 exprime moins d'isoforme 5+ suggérant qu'il possède, en plus, un élément «silencer». Quant à l'effet des expansions, les trois minigènes y sont sensibles, comme l'atteste l'augmentation d'inclusion de l'exon 5 en présence des CTG 960 (Figure 25).

Etant donné que le minigène 150 E5 150 contient les séquences minimales nécessaires à notre étude, celui-ci a été choisi pour la recherche des éléments *cis* régulateurs.

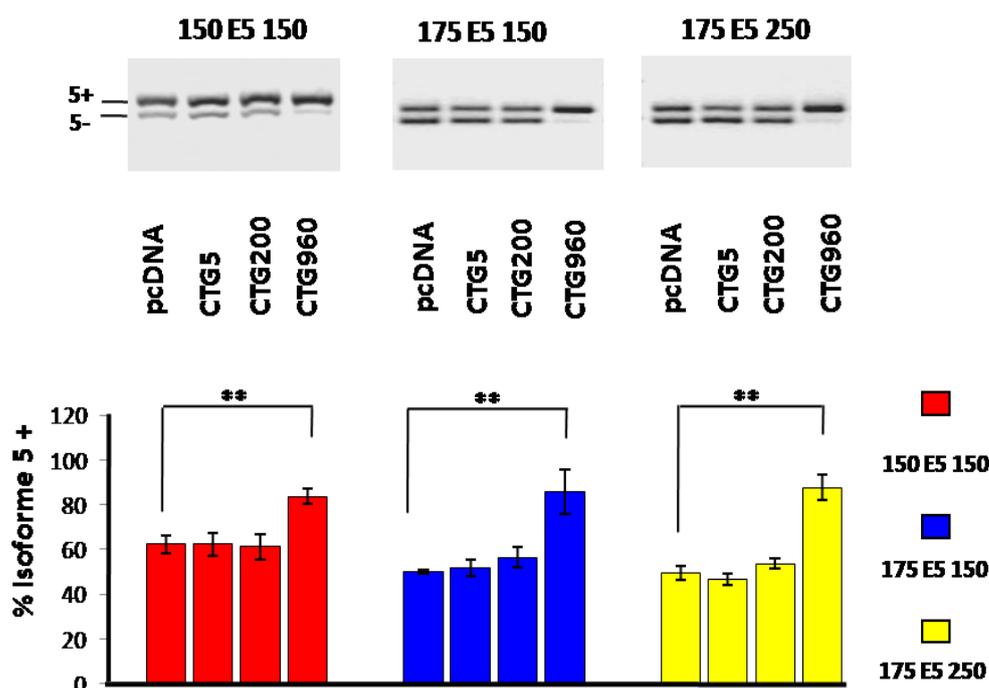


Figure 25: Détermination de la séquence intronique minimale nécessaire à la régulation de l'épissage alternatif de l'exon 5 de cTNT et à l'effet *trans*-dominant. L'exon 5 de cTNT avec des introns environnants de tailles variables a été inséré dans le minigène pSVIRB. Les noms des minigènes indiquent la taille des introns en amont et en aval de l'exon 5. Les minigènes ont été co-transfectés dans les cellules T98 avec un plasmide pcDNA vide ou contenant 5, 200 ou 960 triplets CTG. L'épissage alternatif a été analysé par RT-PCR grâce aux primers INS 1 et INS3. Les barres d'erreur correspondent au SEM. La significativité des résultats est indiquée par * quand $p < 0.05$ et ** quand $p < 0.001$.

B) Recherche des éléments *cis* régulateurs d'épissage, cibles de l'effet des expansions de triplets CTG

Afin de rechercher les éléments *cis* impliqués dans la régulation de l'épissage alternatif de l'exon 5, plusieurs délétions introniques ont été réalisées à partir du minigène 150 E5 150, choisi ici comme référence. Ce minigène donne lieu à 62% d'isoforme 5+ en conditions « normales » et à 81% en présence des 960 triplets CTG.

- **Analyse de l'épissage alternatif de minigènes cTNT doublement tronqués**

Dans un premier temps, nous avons délété les séquences introniques en amont et en aval de l'exon simultanément: minigènes 100 E5 100, 75 E5 75 et 50 E5 50. Ces minigènes ont été transfectés dans les cellules T98 et l'effet des délétions analysé sur l'épissage « normal » (condition pcDNA) et sur la réponse aux expansions de CTG (condition CTG 960). Comme le montre la figure 26, une délétion de 50 nucléotides (minigène 100 E5 100) modifie l'épissage alternatif de l'exon 5 pour entraîner une augmentation significative de son inclusion. Le pourcentage d'inclusion passe de 62% (minigène 150 E5 150) à 88% (minigène 100 E5 100). Ainsi, un ou plusieurs «silencers» introniques existent entre les 150 et 100 nucléotides en amont, ou en aval, de l'exon. La poursuite des délétions en supprimant 25 nucléotides supplémentaires (minigène 75 E5 75) conduit, quant à elle, à une diminution d'inclusion de l'exon 5: on passe de 88% d'inclusion avec le minigène 100 E5 100 à 64% avec 75 E5 75 (Figure 26). Cette baisse d'inclusion indique la présence d'éléments «enhancers» entre les nucléotides 100 et 75. Un autre «enhancer» est mis en évidence par la délétion des 25 autres nucléotides qui suivent (minigène 50 E5 50). Avec ce minigène, l'absence du dernier «enhancer» supprime presque totalement l'isoforme 5+, qui ne représente plus alors que 3% (Figure 26).

Ainsi, l'ensemble de ces résultats révèle l'existence d'éléments «silencers» et «enhancers» dans les introns environnants de l'exon 5 en amont, ou en aval de l'exon. Ils montrent que la région entre 150 et 100 contient un «silencer» et que celle entre 100 et 50 contient un ou probablement deux «enhancers».

Quant à l'effet des expansions, nos résultats montrent que le minigène 100 E5 100 demeure capable de répondre à cet effet, et cela malgré le pourcentage d'ores et déjà élevé d'isoforme 5+ en conditions « normales » (on passe de 88% d'isoforme 5+ en condition pcDNA à 96% en condition CTG960) (Figure 26). En revanche, ni le 75 E5 75 ni le 50 E5 50 ne répondent à l'effet *trans*-dominant (Figure 26), indiquant de ce fait que les éléments *cis* nécessaires à cet effet sont absents de ces deux constructions. On peut remarquer que le 75 E5 75 montre une tendance à répondre aux expansions, mais cette réponse n'est pas statistiquement significative. Ainsi, les éléments ciblés par les expansions

sont potentiellement présents entre les nucléotides 150 et 75 en amont, ou en aval, de l'exon.

Afin de mieux localiser l'ensemble des éléments régulateurs, des délétions ont été réalisées, séparément cette fois-ci, en amont ou en aval de l'exon.

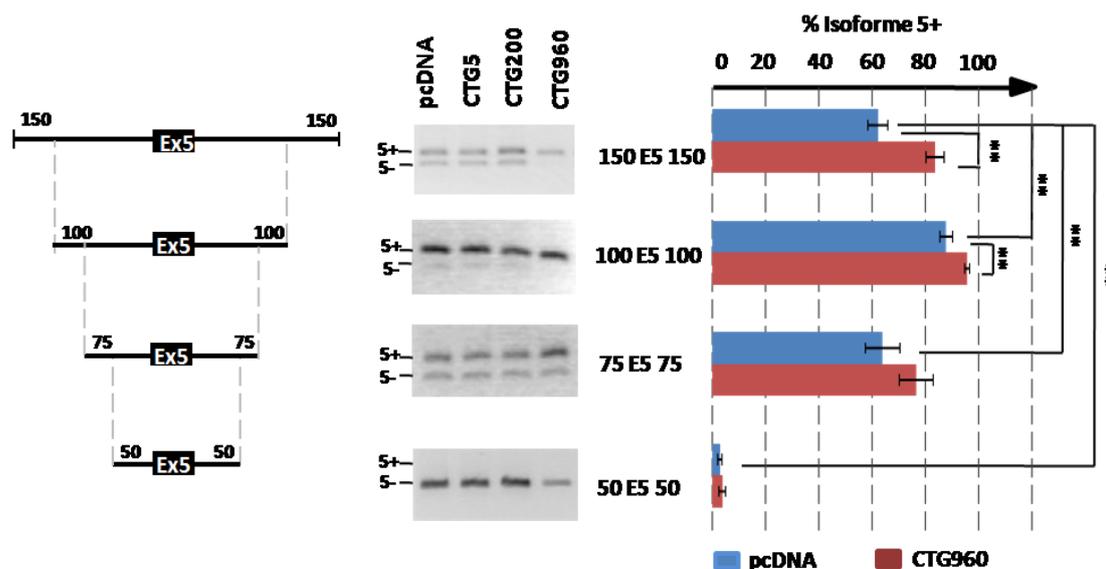


Figure 26: Effet des délétions en amont et en aval de l'exon 5 de cTNT sur l'épissage alternatif et la réponse aux expansions de triplets CTG. Différents minigènes cTNT délétés dans leurs régions introniques en amont et en aval de l'exon 5 ont été transfectés dans les cellules T98. La taille des introns des différents minigènes tronqués est indiquée sur les schémas à gauche. Tous les minigènes ont été co-transfectés avec un plasmide pcDNA vide ou contenant 5, 200 ou 960 triplets CTG. L'épissage a été analysé par RT-PCR grâce aux primers INS1 et INS3. Les barres d'erreur correspondent au SEM. La significativité des résultats est indiquée par * quand $p < 0.05$ et ** quand $p < 0.001$.

• Analyse de l'épissage alternatif de minigènes cTNT tronqués en amont de l'exon 5

En amont de l'exon 5, des délétions progressives à partir du minigène de référence, le 150 E5 150, ont donné lieu aux minigènes 100 E5 150 et 50 E5 150 (Figure 27).

La transfection du 100 E5 150 dans les cellules T98 montre que cette région contient un élément «silencer», dont l'absence entraîne une augmentation d'inclusion de l'exon 5 (77% d'isoforme 5+ avec le 100 E5 150 au lieu de 62% obtenus avec le 150 E5 150) (Figure 27). La

délétion de 50 nucléotides supplémentaires avec le minigène 50 E5 150 conduit, elle, en revanche, à la suppression de l'isoforme 5+ (Figure 27). Ceci révèle l'existence d'un «enhancer», indispensable à l'inclusion de l'exon 5.

Ainsi, la séquence entre -150 et -100 nucléotides en amont de l'exon 5 contient au moins un «silencer», et celle entre -100 et -50 au moins un «enhancer».

En ce qui concerne l'effet *trans*-dominant, le minigène 100 E5 150 répond à l'effet des CTG 960 (on passe de 79% d'isoforme 5+ en condition pcDNA à 89% en condition CTG960) (Figure 27). En revanche, aucun effet des expansions n'est observé sur le minigène 50 E5 150 (Figure 27). Ces résultats mettent ainsi en évidence l'implication de la région intronique en amont de l'exon 5, région comprise entre les nucléotides -100 et -50, dans l'effet *trans*-dominant des expansions de triplets CTG.

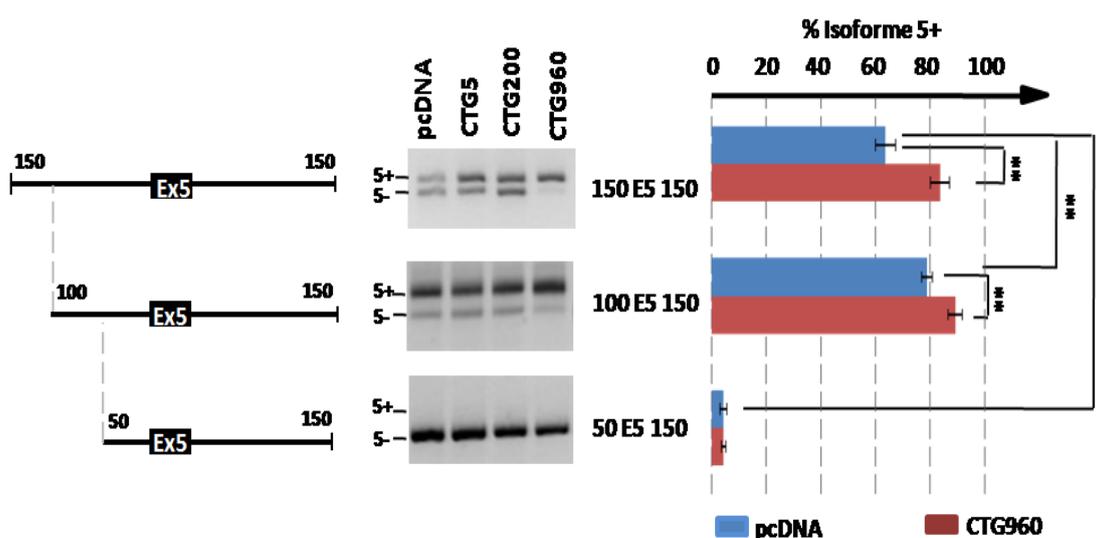


Figure 27: Effet des délétions en amont de l'exon 5 de cTNT sur l'épissage alternatif et la réponse aux expansions de triplets CTG. Différents minigènes cTNT délétés dans leurs régions introniques en aval de l'exon 5 ont été transfectés dans les cellules T98. La taille des introns des différents minigènes tronqués est indiquée sur les schémas à gauche. Tous les minigènes ont été co-transfectés avec un plasmide pcDNA vide ou contenant 5, 200 ou 960 triplets CTG. L'épissage a été analysé par RT-PCR grâce aux primers INS1 et INS3. Les barres d'erreur correspondent au SEM. La significativité des résultats est indiquée par * quand $p < 0.05$ et ** quand $p < 0.001$.

- **Analyse de l'épissage alternatif de minigènes cTNT tronqués en aval de l'exon 5**

En aval de l'exon 5, les mêmes délétions introniques avec les minigènes 150 E5 100 et 150 E5 50 montrent une baisse graduelle d'inclusion de l'exon (Figure 28). On passe de 62% avec le 150 E5 150 à 46% avec 150 E5 100, puis à 24% avec le 150 E5 50. Plusieurs «enhancers» existent donc dans les régions délétées.

Malgré l'absence de ces «enhancers», les deux minigènes tronqués sont capables de répondre à l'effet des expansions de CTG (Figure 28). Avec le minigène 150 E5 100, le pourcentage d'inclusion passe de 46% (condition pcDNA) à 74% (condition CTG960) (Figure 28). De même, l'inclusion de l'exon 5 augmente avec le minigène 150 E5 50, passant de 24% (condition pcDNA) à 57% (condition CTG960).

On peut donc conclure que les régions introniques en aval de l'exon 5, entre les nucléotides +150 et +50, ne sont pas nécessaires à l'effet *trans*-dominant.

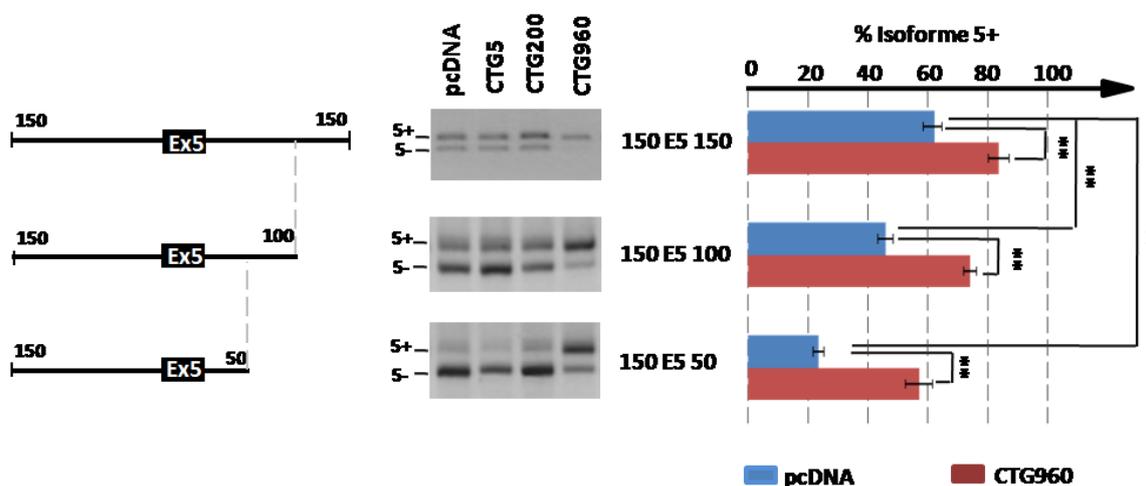


Figure 28: Effet des délétions en aval de l'exon 5 de cTNT sur l'épissage alternatif et la réponse aux expansions de triplets CTG. Différents minigènes cTNT délétés dans leurs régions introniques en aval de l'exon 5 ont été transfectés dans les cellules T98. La taille des introns des différents minigènes tronqués est indiquée sur les schémas à gauche. Tous les minigènes ont été co-transfectés avec un plasmide pcDNA vide ou contenant 5, 200 ou 960 triplets CTG. L'épissage a été analysé par RT-PCR grâce aux primers INS1 et INS3. Les barres d'erreur correspondent au SEM. La significativité des résultats est indiquée par * quand $p < 0.05$ et ** quand $p < 0.001$.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats met en évidence l'implication de plusieurs éléments *cis* introniques dans la régulation de l'épissage alternatif de l'exon 5 de cTNT. En amont de l'exon, nous identifions un «silencer», entre les nucléotides -150 et -100, et un «enhancer», entre les nucléotides -100 et -50. En aval, nous mettons en évidence deux «enhancers», localisés entre les nucléotides +150 et +100 puis entre +100 et +50. Nos résultats montrent également que des séquences impliquées dans l'effet *trans*-dominant des CTG sont présentes en amont de l'exon 5, dans la région intronique située entre les nucléotides -100 et -50.

C) Identification de sites de fixation du facteur Mbnl1 sur cTNT : étude de leur implication dans l'épissage alternatif et dans l'effet trans-dominant des CTG

La perte de fonction du facteur régulateur Mbnl1 est un fait majeur contribuant à l'effet *trans*-dominant sur l'épissage alternatif. Il est connu que la surexpression de ce facteur provoque l'exclusion de l'exon 5 de cTNT et que sa perte de fonction entraîne son inclusion (Ho et al., 2004). Si l'effet *trans*-dominant sur cTNT passe par la perte de fonction de Mbnl1, alors les éléments *cis* impliqués dans l'effet de ce facteur et dans l'effet *trans*-dominant devraient être les mêmes. Dans le but de tester cette hypothèse, nous avons recherché les séquences impliquées dans l'effet de Mbnl1 sur cTNT afin de les comparer à celles préalablement déterminées qui répondent à l'effet *trans*-dominant.

C.1) Recherche des régions introniques impliquées dans l'effet du facteur Mbnl1 sur l'épissage alternatif de l'exon 5 de cTNT

Dans un premier temps, nous avons recherché les régions introniques répondant à MBNL1 par l'utilisation des minigènes tronqués en amont ou en aval de l'exon 5 (100 E5150, 50 E5 150, 150 E5 100 et 150 E5 50). Les différents minigènes ont été co-transfectés

dans les cellules T98 soit avec un plasmide pcDNA vide, soit avec un plasmide pcDNA contenant l'ADNc du facteur Mbnl1 (isoforme 43).

Nos résultats montrent que Mbnl1 favorise l'exclusion de l'exon 5 dans l'ensemble des minigènes, à l'exception du 50 E5 150 (Figure 29). Ces résultats ne mettent pas en évidence l'implication d'une région intronique particulière dans l'effet de Mbnl1. De plus, l'implication des 50 nucléotides qui juxtapotent l'exon 5 en amont ne peut être exclue, puisque le minigène 50 E5 150 montre d'ores et déjà un profil d'exclusion totale. Ainsi, nous avons opté pour une autre méthode, basée sur l'identification des sites de fixation de Mbnl1 directement à partir de la séquence de cTNT.

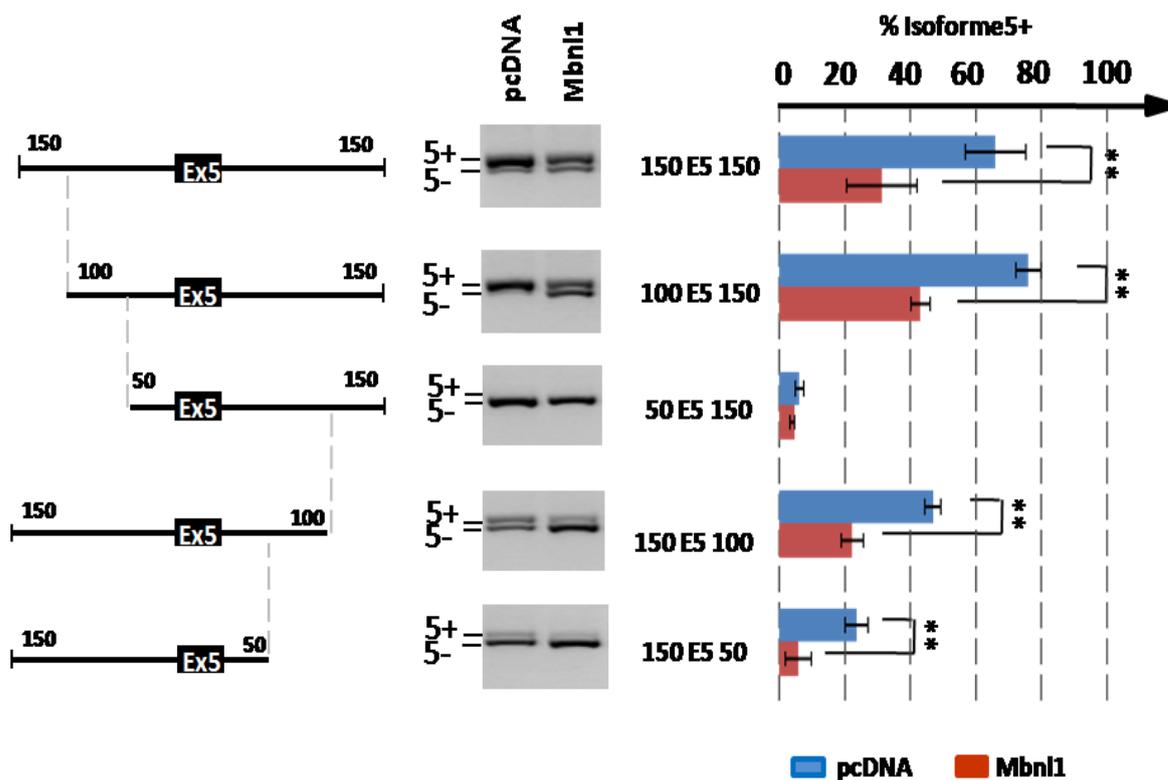


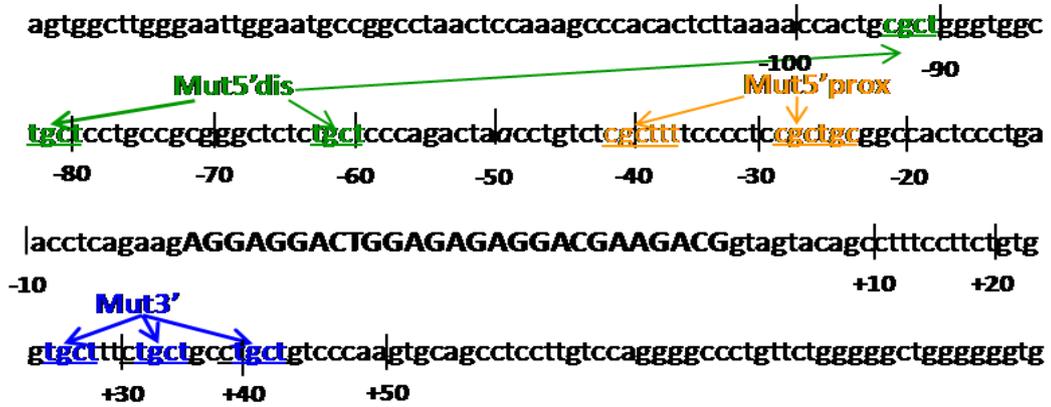
Figure 29: Régions introniques de cTNT sensibles au facteur d'épissage Mbnl1. Différents minigènes cTNT délétés dans leurs introns en amont ou en aval de l'exon 5 ont été co-transfectés dans les cellules T98 avec un plasmide pcDNA vide ou contenant l'ADNc de Mbnl1. L'épissage a été analysé par RT-PCR grâce aux primers INS1 et INS3. Les barres d'erreur correspondent au SEM. La significativité des résultats est indiquée par * quand $p < 0.05$ et ** quand $p < 0.001$.

C.2) Détermination des sites fonctionnels de fixation du facteur d'épissage Mbnl1 sur le transcrit de cTNT par l'utilisation de minigènes mutés

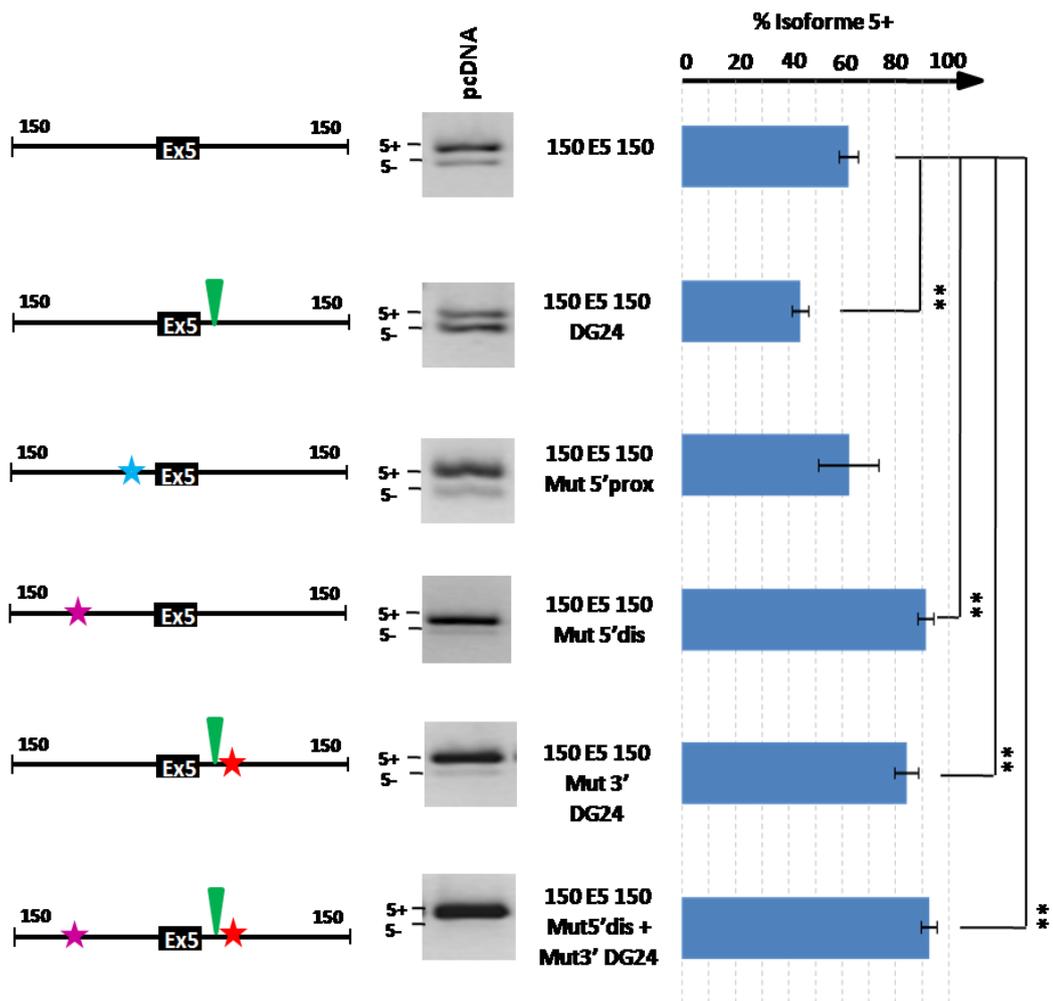
Nous avons réalisé un minigène muté dans des sites connus de fixation pour Mbnl1 que nous avons appelé Mut5'prox (Figure 30A). Ces sites avaient été décrits par l'équipe du Dr Cooper. Par une approche in vitro, l'équipe de Christiane Branlant a pu identifier plusieurs sites de fixation de Mbnl1 sur cTNT, trois en amont de l'exon 5 et trois en aval. Les sites en amont de l'exon 5 se situent en positions -93, -82 et -62, ceux en aval se situent en positions +26, +33 et +40 (Figure 30A). L'étude fonctionnelle de ces sites s'est faite par l'utilisation de minigènes 150 E5 150 portant des mutations au sein de ces sites potentiels. Les mutations ont été réalisées par groupes. C'est ainsi que le minigène muté dans les trois nouveaux sites en amont de l'exon a été appelé Mut 5'dis, tandis que celui muté dans les trois nouveaux sites en aval a été appelé Mut 3'DG24. Le suffixe DG24 correspond à une mutation supplémentaire, réalisée dans le but d'éliminer un site cryptique d'épissage créé sous l'effet d'une des mutations des sites en aval. Un minigène 150 E5 150 portant seule la mutation DG24 a donc été réalisé pour vérifier l'effet de cette dernière sur l'épissage. Enfin, et dans le but d'étudier un potentiel effet additif des mutations en amont et en aval de l'exon, l'ensemble des sites potentiels ont été mutés simultanément dans le minigène appelé Mut5'dis + Mut 3'DG24.

Comme le montrent les expériences de transfection dans les cellules T98, la mutation des nouveaux sites identifiés, en amont et en aval de l'exon, conduit à une augmentation d'inclusion de l'exon mimant ainsi une perte de fonction de Mbnl1 (Figure 30B). Avec le Mut5'dis, le pourcentage d'inclusion de l'exon 5 passe de 62% (150 E5 150) à 91,3% (Figure 30B). Quant au Mut3'DG24, son inclusion atteint 84%, et cela malgré l'effet de la mutation DG24 qui induit une baisse d'inclusion de l'exon (Figure 30B). La combinaison des mutations des nouveaux sites identifiés ne modifie pas davantage le niveau d'inclusion, indiquant que celle-ci a atteint ici son niveau maximal (Figure 30B). En revanche, la mutation des sites déjà décrits, Mut5'prox, ne semble pas modifier l'épissage de l'exon 5 dans notre modèle cellulaire (Figure 30B) et ceci contrairement à la légère baisse d'inclusion reportée dans la littérature (Ho et al., 2004, Warf and Berglund, 2007).

A.



B.



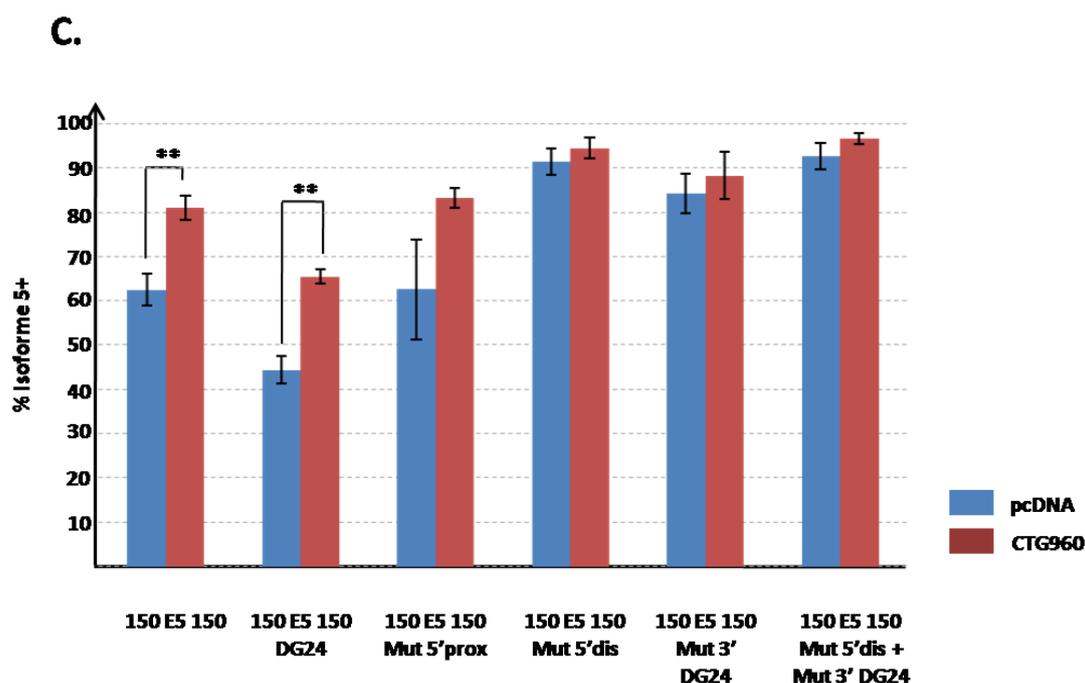


Figure 30: Effet des mutations des sites Mbn1 sur l'épissage alternatif de l'exon 5 de cTNT et la réponse aux expansions de CTG. (A) La localisation des sites mutés de Mbn1 sur la séquence de cTNT. La séquence de l'exon est en majuscules et celle de l'intron en minuscules. Le Mut5'dis correspond aux sites mutés en positions -93, -82 et -62, le Mut 5'prox en positions -41 et -28 et le Mut3' aux sites mutés en positions +26, +33 et +40. **(B)** L'effet des mutations sur l'épissage de l'exon 5 a été analysé après co-transfection des cellules T98 avec les minigènes 150 E5 150 mutés et un plasmide pcDNA vide. Les mutations Mut5'dis, Mut5'prox et Mut3' sont représentées par des étoiles et la mutation DG24 par un triangle. En **(C)**, les minigènes mutés ont également été transfectés avec un plasmide pcDNA contenant 960 triplets CTG afin d'étudier leur réponse aux expansions de CTG. L'épissage alternatif a été analysé par RT-PCR grâce aux primers INS1 et INS3. Les barres d'erreur correspondent au SEM. La significativité des résultats est indiquée par * quand $p < 0.05$ et ** quand $p < 0.001$.

Nous avons également voulu tester l'implication des nouveaux sites dans l'effet *trans*-dominant, mais le pourcentage d'inclusion d'ores et déjà élevé, pourcentage induit par la perte de fonction de Mbn1, ne permet pas d'étudier cet effet (Figure 30C). Par contre, étant donné que les sites déjà décrits ne modifient pas l'épissage alternatif en conditions basales, nous avons pu tester leur implication dans l'effet *trans*-dominant. Nos résultats montrent que la mutation de ces sites, Mut5'prox, n'altère pas la réponse aux expansions de manière statistiquement significative et ceci contrairement à ce qui a été publié dans la littérature (Warf and Berglund, 2007).

Ainsi, nos résultats mettent en évidence de nouveaux sites de liaison pour Mbnl1, en amont et en aval de l'exon 5 de cTNT, qui sont décrits ici pour la première fois.

Résultats complémentaires

Epissage alternatif de Tau et différenciation neuronale

Les SY5Y sont un sous-clone de la lignée de neuroblastome SK-N-SH (Ross et al., 1983). Elles sont issues du système nerveux et expriment des marqueurs dopaminergiques (Kume et al., 2004). Le profil d'exclusion des exons alternatifs 2, 3 et 10 de Tau dans la lignée SY5Y correspond à un phénotype d'épissage de type foetal (Article 2). Etant donné qu'il s'agit ici d'une lignée cellulaire continue, on s'est alors demandé si ce phénotype d'épissage ne résultait pas de l'état non différencié du modèle cellulaire. Afin de tester cette hypothèse, nous avons analysé l'épissage alternatif de Tau dans les SY5Y avant et après leur différenciation. Nous avons testé trois méthodes de différenciation. En contrôle, nous avons analysé l'épissage alternatif de l'APP (Protéine précurseur à l'amyloïde).

Ici, les trois méthodes utilisées pour différencier les SY5Y sont basées sur l'utilisation de trois agents différenciateurs: l'acide rétinoïque (AR), un dérivé métabolique de la vitamine A, le dibutyryl AMP cyclique (dbAMPC), composé analogue du second messenger intracellulaire AMP cyclique (adénosine 3',5' monophosphate cyclique) et, enfin, le Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), qui est un facteur de croissance neurotrophique. La première méthode de différenciation consiste dans le traitement des cellules avec l'AR pendant une période de 10 jours. Dans les deuxième et troisième méthodes, les SY5Y sont différenciées par des traitements successifs avec l'AR pendant 5 jours puis avec le dbAMPC ou le BDNF pendant 7 jours. Sur le plan morphologique, il est connu que ces trois agents induisent un phénotype neuronal des SY5Y caractérisé par une extension de neurites (Ehrhard et al., 1993, Sanchez et al., 2003, Miloso et al., 2004, Encinas et al., 2000). Dans nos expériences de différenciation, les trois méthodes induisent une extension des neurites conformément à ce qui est reporté dans la littérature (Figure 31). Toutes modifient également l'épissage alternatif du transcrite de l'APP bien que cette modification soit plus ou moins importante d'après la méthode employée. Dans tous les cas, il s'agit du passage d'un phénotype d'épissage foetal caractérisé par une inclusion des exons 7 et 8 vers un

phénotype adulte où ces exons deviennent exclus (Figure 31). Malgré cela, aucune des trois méthodes de différenciation ne modifie l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 de Tau (Figure 31). Ceci suppose deux possibilités: ou bien ces cellules expriment un ou plusieurs facteurs répresseurs forts qui restent actifs après la différenciation, ou bien elles n'expriment pas un ou plusieurs facteurs activateurs et cela malgré la différenciation. En tous les cas, les SY5Y, différenciées ou non, semblent incapables, avec ces méthodes, de produire des isoformes contenant les exons 2, 3 et 10 de Tau à partir du transcrit endogène.

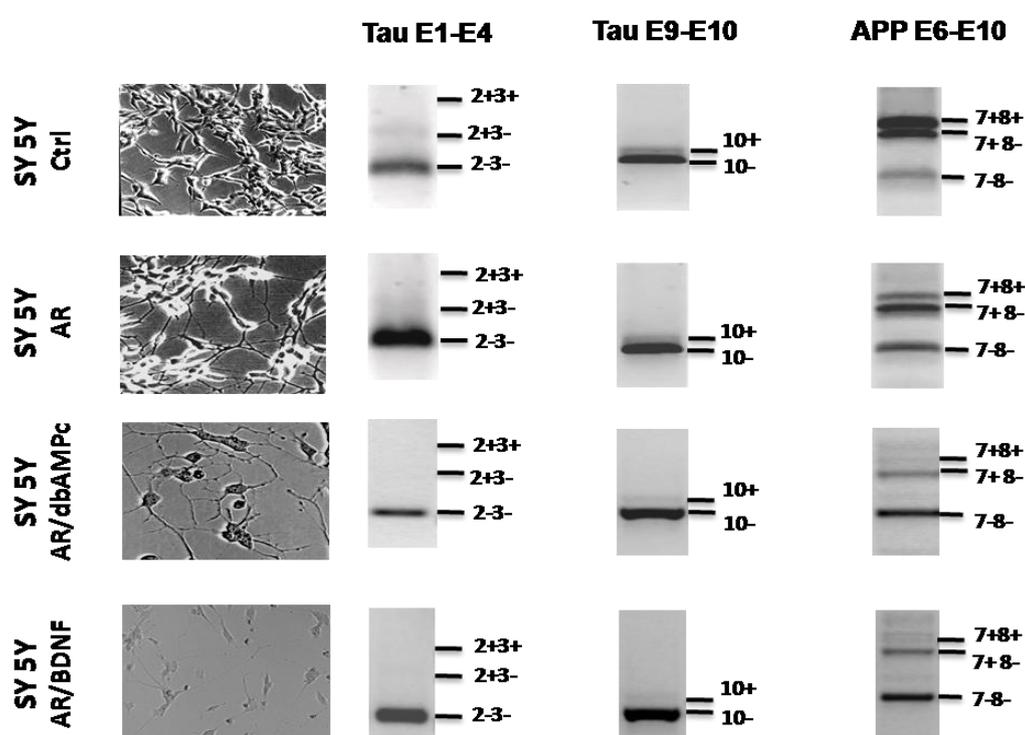


Figure 31: Effet de la différenciation neuronale sur l'épissage alternatif de Tau et APP. La différenciation des SY5Y a eu lieu dans des flasques revêtues d'une couche de poly-L-lysine et de laminine. La différenciation par l'acide rétinoïque (SY5Y AR) a eu lieu pendant 10 jours dans un milieu DMEM F12 dépourvu de sérum, contenant de l'insuline/transferrine, de la progestérone et de l'acide rétinoïque (10 μ M). La différenciation par traitements successifs avec l'acide rétinoïque et le dbAMPc (SY5Y AR/dbAMPc) ou le BDNF (SY5Y AR/BDNF) s'est effectuée dans un milieu Neurobasal sans sérum complété avec du B27. Dans ce cas, les cellules ont été traitées avec l'acide rétinoïque (10 μ M) pendant 5 jours puis avec le dbAMPc (3mM) ou le BDNF (50ng/ml) pendant 7 jours. L'épissage alternatif de Tau et APP a été analysé par RT-PCR avant et après la différenciation neuronale. Les exons cibles des amorces utilisées pour analyser de l'épissage des exons 2, 3 et 10 de Tau et les exon 7 et 8 de APP sont indiqués sur la figure.

DISCUSSION

A) Quel mécanisme moléculaire responsable du profil d'épissage foetal de Tau dans la Dystrophie Myotonique de type 1 ?

Pour plusieurs transcrits exprimés dans différents tissus, les défauts d'épissage alternatif dans la DM1 correspondent à une expression majorée des isoformes foetales. Cette observation soulève des interrogations quant au mécanisme de dérégulation de l'épissage alternatif dans la DM1. Cette altération commune laisse, en effet, supposer qu'il existe des facteurs communs à la dérégulation de ces transcrits et, probablement, à leur régulation en temps normal. Dans la DM1, l'hypothèse d'une réactivation ou d'un maintien d'un programme d'épissage foetal nous amène à nous interroger sur les acteurs de ce programme.

Pour tenter de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu ici, on s'est appuyé sur l'étude de l'épissage alternatif des exons 2 et 3 de Tau dans un système cellulaire qui exprime majoritairement l'isoforme foetale (cellules SY5Y). Ces cellules représentent donc un modèle cellulaire exprimant un ensemble de facteurs régulateurs responsables d'un phénotype d'épissage de « type foetal ». L'étude de l'épissage alternatif de minigènes Tau 2/3 et 2Δ3 dans ces cellules montre que les séquences et facteurs mis en jeu pour obtenir l'isoforme foetale, ici, sont différents de ceux impliqués dans l'effet *trans*-dominant de la DM1. Dans la DM1, les facteurs Muscleblind et CELF sont impliqués dans la régulation développementale de l'épissage alternatif de plusieurs transcrits altérés (Lin et al., 2006, Kalsotra et al., 2008, Ladd et al., 2001, Ladd et al., 2005). Ces facteurs pourraient ainsi constituer le point commun majeur entre les différentes cibles de l'effet *trans*-dominant. Afin de mieux comprendre les mécanismes à l'origine du processus d'épissage pathologique, nous avons tenté de savoir si les éléments *cis* régulateurs cibles de l'effet *trans*-dominant sont également ceux impliqués dans l'effet des facteurs Muscleblind et CELF.

B) Régulation de l'épissage alternatif de l'exon 2 de Tau

B.1) L'exclusion de l'exon 2 passe par l'action de plusieurs «silencers» introniques

La plupart des études sur les éléments *cis* régulateurs d'épissage alternatif de Tau se sont focalisées sur l'exon 10. Très peu d'études existent sur l'exon 2. Ici, nous avons recherché les éléments *cis* régulateurs d'épissage de cet exon. Etant donné que l'action de ces éléments dépend des facteurs *trans* régulateurs, notre recherche a été menée dans deux modèles cellulaires (SY5Y et T98) qui expriment des facteurs régulateurs d'épissage différents (Leroy et al., 2006b). Nos résultats révèlent l'existence d'un ou plusieurs «silencers» introniques en aval de l'exon 2, dans une région entre + 500 et +2100 (Figure 32A). Au sein de cette région, nous avons mis en évidence la présence de certains «silencers» dans une zone restreinte entre les nucléotides +1050 et +2100 (Figure 32A). Nos résultats suggèrent également la présence de «silencers» en amont de l'exon 2, entre les nucléotides -878 et -800 (Figure 32A). Ces éléments *cis* sont décrits ici pour la première fois. Par l'utilisation de cellules Cos, l'équipe d'Andreadis a pu identifier d'autres «silencers» introniques régulant l'épissage alternatif de l'exon 2 (Li et al., 2003). Ces éléments «silencers» sont situés en amont et en aval de l'exon, entre les nucléotides -571 et -281 et + 471 et +840 (Figure 32B) (Li et al., 2003). Dans notre étude, la présence de ces deux éléments *cis* n'a pas pu être révélée dans nos deux lignées cellulaires, très certainement à cause de la différence des contextes cellulaires. Au niveau exonique, un «enhancer» et un «silencer» ont également été décrits par l'équipe d'Andreadis (Wang et al., 2005). Ainsi, l'ensemble de ces données montre que l'épissage alternatif de l'exon 2 de Tau est essentiellement régulé par éléments «silencers», et notamment des «silencers» introniques.

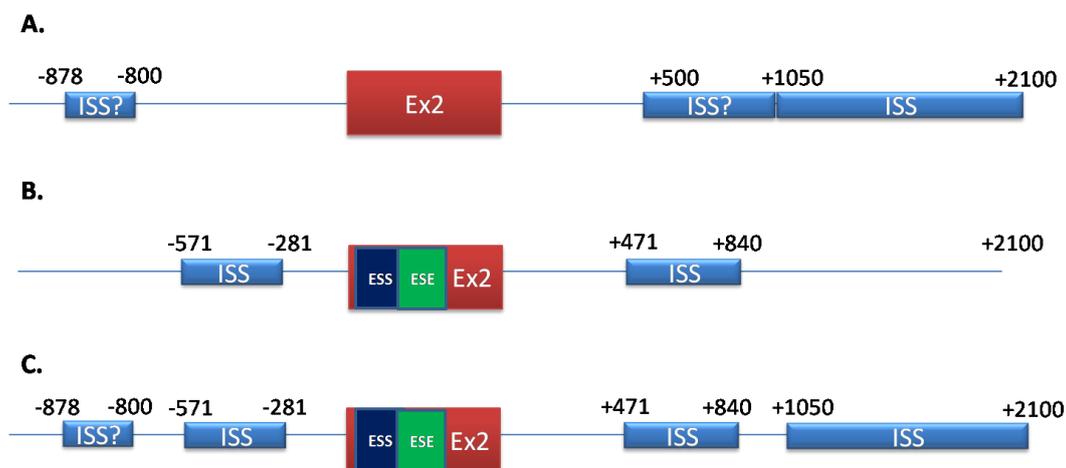


Figure 32 : Récapitulatif des éléments *cis* régulateurs de l'épissage alternatif de l'exon 2 de Tau. En (A) sont représentés les éléments *cis* identifiés par ce travail. Le point d'interrogation signifie une possibilité d'existence d'un élément régulateur. Les éléments *cis* régulateurs déjà décrits sont représentés en (B) et ont tous été identifiés par l'équipe d'Andreadis (Li et al., 2003, Wang et al., 2005). Le schéma en (C) récapitule l'ensemble des informations dont on dispose sur la régulation en *cis* de l'épissage alternatif de l'exon 2. ISS = Intronic Splicing Silencer ; ESS = Exonic Splicing Silencer ; ESE = Exonic Splicing Enhancer. Cette représentation n'est pas à l'échelle.

Que ce soit pour les «silencers» que nous mettons en évidence ou ceux déjà décrits, ces éléments sont localisés relativement loin de l'exon. Parmi les mécanismes de répression décrits dans la littérature, des éléments «silencers» situés à proximité de l'exon agissent en empêchant la fixation de protéines du spliceosome au niveau des sites donneurs, ou accepteurs, d'épissage. Dans le cas de l'exon 2 de Tau, étant donné la position éloignée des «silencers» introniques par rapport à l'exon, ce mécanisme ne semble pas être celui impliqué dans la répression d'inclusion. Un autre mécanisme de répression correspond à celui de la multimérisation. Dans ce cas, la multimérisation d'un facteur répresseur au niveau d'un élément «silencer» peut masquer des «enhancers» adjacents. Dans nos expériences, le profil d'inclusion totale pour plusieurs minigènes tronqués suggère que l'exclusion de l'exon 2 est obtenue par l'activation d'éléments «silencers» plutôt que par l'inactivation d'«enhancers». Ainsi, nos résultats ne favorisent pas l'implication de ce modèle dans la répression d'inclusion de l'exon 2. Un autre modèle connu pour réprimer l'inclusion d'exons alternatifs est celui du «looping out» (voir figure 8 dans

l'introduction). D'après ce dernier, des «silencers» situés de part et d'autre de l'exon lient des facteurs répresseurs qui interagissent et conduisent alors à la formation d'une boucle au niveau de l'ARN. Cette structure empêche la reconnaissance de l'exon par le spliceosome. Ce mécanisme est employé pour l'exclusion de l'exon neuronal, N1, de src dans les cellules non neuronales (Markovtsov et al., 2000, Maltin et al., 2005). Dans le cas de l'exon 2 de Tau, étant donnée la position éloignée des éléments «silencers» introniques par rapport à l'exon, il est possible que ce mécanisme soit celui employé pour l'exclusion de l'exon. Cependant, ce mécanisme fait appel à des éléments «silencers» situés de part et d'autre de l'exon. D'après nos résultats, le minigène tronqué qui permet d'obtenir une exclusion de l'exon 2 (minigène 500 E2 2100) contient des «silencers» actifs en aval de l'exon, mais pas en amont. Ainsi, il est possible que ce minigène fasse également appel à des «silencers» en amont de l'exon 2, «silencers» qui ont besoin de la présence de ceux en aval pour agir. Cette piste sera intéressante à explorer.

B.2) Corrélation entre les séquences cibles de l'effet *trans*-dominant et le facteur d'épissage ETR-3 ?

Dans la DM1, les mécanismes mis en jeu dans l'effet *trans*-dominant sur l'épissage alternatif ont essentiellement été étudiés pour des transcrits dérégulés dans le muscle squelettique et le cœur tel que IR, CIC, et cTNT (Ho et al., 2004, Savkur et al., 2001, Charlet-B et al., 2004, Philips et al., 1998). Mis à part les travaux réalisés dans notre laboratoire, aucun autre sur les mécanismes de dérégulation de l'épissage alternatif de Tau dans la DM1 n'a été mené jusqu'ici. Nos résultats sur Tau montrent que l'essentiel de l'effet *trans*-dominant sur l'épissage de l'exon 2 implique une région intronique située en aval de l'exon. Au sein de cette région comprise entre les nucléotides +500 et +2100, nous avons pu déterminer l'implication d'une zone plus restreinte, entre les nucléotides +1050 et +2100 (Figure 33). Cette région intronique (entre +1050 et +2100) contient un ou plusieurs éléments «silencers» (Figure 33). Il est très possible que l'effet des CTG sur l'exon 2 de Tau passe par l'activation de ces éléments régulateurs. Nous montrons également qu'une partie de l'effet répresseur du facteur de la famille CELF, ETR-3, implique la région intronique en aval de l'exon 2 (région comprise entre les nucléotides

+500 et +2100) (Figure 33). D'autres expériences seront nécessaires pour déterminer plus précisément si les régions introniques mises en jeu dans l'effet des CTG impliquent les éléments «silencers» et le facteur d'épissage ETR-3.

L'autre famille de facteurs impliquée dans la DM1 est la famille Muscleblind. Dans le cas de l'exon 2 de Tau, c'est la perte de fonction de MBNL1 qui induit l'exclusion de l'exon 2 (Dhaenens et al., 2008). Ceci semble signifier que, en temps normal, Mbnl1 exerce sur Tau un effet activateur. Dans notre recherche des régions introniques impliquées dans l'effet *trans*-dominant, nos résultats mettent en évidence une région intronique qui contient des éléments «silencers». Il sera intéressant de rechercher si cette même région est sensible à la perte de fonction de Mbnl1 et de déterminer les éléments *cis* au sein desquels Mbnl1 exerce son effet activateur.

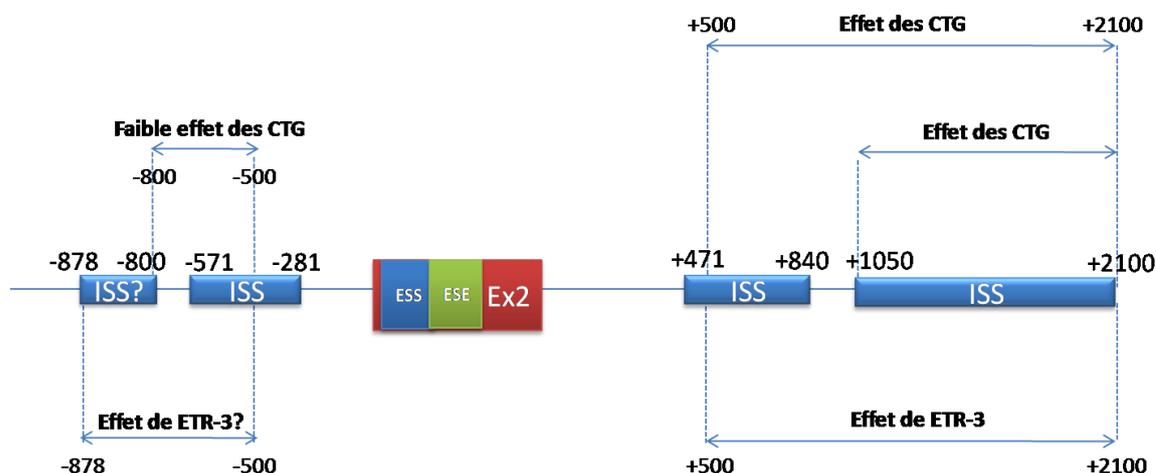


Figure 33: Régions introniques impliquées dans l'effet des expansions de CTG et du facteur d'épissage ETR-3 sur l'épissage alternatif de l'exon 2 de Tau. ISS = Intronic Splicing Silencer ; ESS = Exonic Splicing Silencer ; ESE = Exonic Splicing Enhancer.

C) Régulation de l'épissage alternatif de l'exon 5 de cTNT

C.1) L'épissage alternatif de l'exon 5 de cTNT fait intervenir plusieurs «enhancers» et un «silencer» introniques

Nos travaux sur la régulation de l'épissage alternatif de l'exon 5 de cTNT montrent que cet exon est régulé par trois «enhancers» et un «silencer» introniques. En amont de

l'exon 5, nous identifions un «silencer» localisé entre les nucléotides -150 et -100 et un «enhancer» qui se situe entre les nucléotides -100 et -50 (Figure 34A). En aval, nous révélons deux «enhancers», compris entre les nucléotides +50 et +100 pour l'un et +100 et +150 pour l'autre (Figure 34A). La plupart des études sur cTNT ont été effectuées sur la séquence du poulet et ont pu démontrer l'existence de quatre «enhancers» introniques autour de l'exon 5. L'un d'entre eux se trouve en amont de l'exon 5 et les trois autres en aval (Ryan et al., 1996, Cooper, 1998). Parmi les éléments présents en aval de l'exon, et de manière similaire à ce que l'on trouve chez l'homme, deux sont localisés entre les nucléotides +53 et +89 puis +94 et +130 (Cooper, 1998). Le changement dans le profil d'épissage de l'exon 5 de l'inclusion vers l'exclusion au cours du développement est un processus très conservé qu'on retrouve chez l'homme, la souris, le rat et le poulet (Cooper and Ordahl, 1985, Jin and Lin, 1989, Townsend et al., 1995). La similitude dans la localisation de deux «enhancers» entre l'homme et le poulet peut suggérer l'existence de mécanismes de régulation communs entre ces deux espèces.

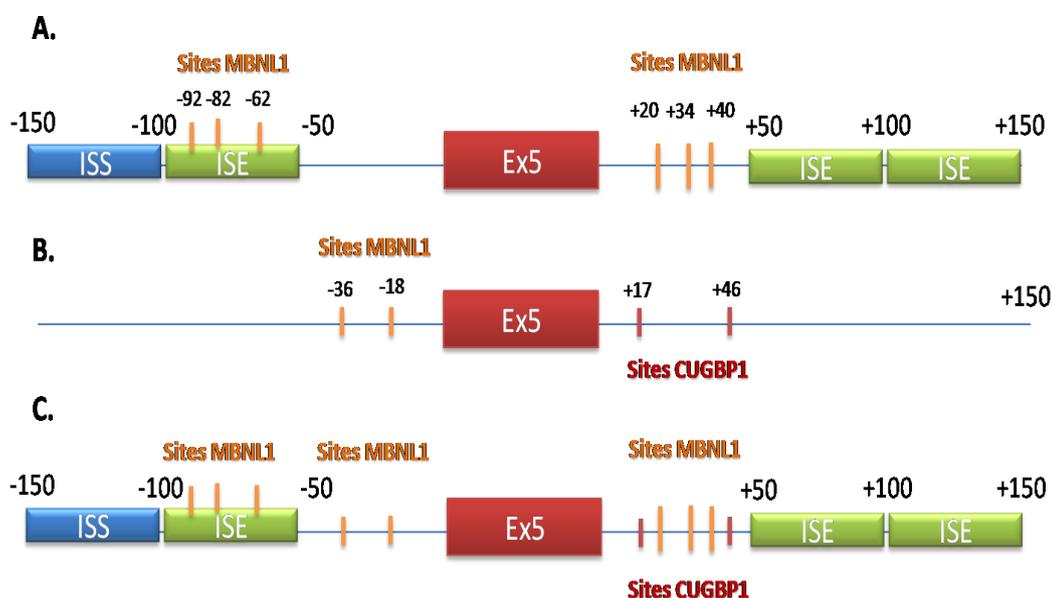


Figure 34: Récapitulatif de la régulation en cis de l'épissage alternatif de l'exon 5 de cTNT. (A) Les éléments cis régulateurs et les sites de fixation du facteur d'épissage Mbnl1 identifiés par ce travail sont représentés. En **(B)** sont représentées les données de la littérature sur le transcrit humain de cTNT. Il s'agit de sites de fixation de facteurs d'épissage Mbnl1 et CUGBP1 (Ho et al., 2004, Philips et al., 1998, Warf and Berglund, 2007). L'ensemble de nos connaissances sur la régulation en cis de l'exon 5 de cTNT chez l'homme est regroupée en figure **(C)**. ISS = Intronic Splicing Silencer ; ISE= Intronic Splicing Enhancer.

C.2) Rôle de Mbnl1 dans la régulation de l'épissage alternatif de l'exon 5 de cTNT

Il est connu que la surexpression de Mbnl1 conduit à l'exclusion de l'exon 5 de cTNT et que sa perte de fonction mène, à l'inverse, à son inclusion (Ho et al., 2004). Mbnl1 est donc considéré dans le cas de cTNT comme facteur répresseur. Par des expériences de mutagenèse dirigée, nous avons identifié plusieurs sites de fixation de Mbnl1 en amont et en aval de l'exon 5 (Figure 34A). Les sites en amont sont localisés entre -100 et -50, tandis que ceux en aval sont contenus dans les 50 nucléotides qui juxtaposent directement l'exon 5 (Figure 34A). La mutation de ces sites conduit à une inclusion accrue de l'exon 5 démontrant qu'ils jouent un rôle dans la régulation de l'épissage alternatif de cTNT en temps « normal ». Par ailleurs, l'augmentation d'inclusion de l'exon 5 sous l'effet de ces mutations est en parfait accord avec le rôle répresseur de Mbnl1. L'équipe de Cooper avait déjà identifié deux sites de fixation de Mbnl1 en amont de l'exon 5, en positions -36 et -18 (Figure 34B) (Ho et al., 2004). De manière inattendue, les auteurs ont constaté que la mutation de ces sites conduisait à une augmentation d'exclusion de l'exon (Ho et al., 2004). Ce même résultat a été confirmé par l'équipe de Berglund (Warf and Berglund, 2007). L'équipe de Berglund a également montré que, au niveau de ses sites, Mbnl1 liait et stabilisait une structure secondaire au niveau de l'ARN (Warf and Berglund, 2007). A partir de là, les auteurs ont avancé une hypothèse d'après laquelle Mbnl1 agirait sur l'épissage en masquant des éléments *cis* régulateurs. En l'absence de Mbnl1, ces éléments *cis* deviennent accessibles aux facteurs *trans* permettant leur action. Nos résultats sont en faveur d'une telle hypothèse. D'abord, les sites Mbnl1 que nous identifions en amont de l'exon 5 se trouvent au sein d'un élément «enhancer». Cela signifie que Mbnl1 pourrait exercer son effet répresseur en inhibant l'action de l'«enhancer». Ensuite, les sites que nous identifions en aval de l'exon 5 sont localisés dans une région qui contient des sites du facteur CELF, CUGBP1 (Figure 34B) (Philips et al., 1998). CUGBP1 agit sur cTNT en tant qu'activateur (Philips et al., 1998). Ceci suggère qu'une compétition entre Mbnl1 et CUGBP1 pourrait avoir lieu au niveau de cette région. Ainsi, nos résultats sur la localisation des sites Mbnl1 sur cTNT suggèrent que Mbnl1

exerce son effet répresseur en masquant des éléments «enhancers» et en empêchant l'action de facteurs activateurs.

C.3) L'effet trans-dominant sur l'épissage alternatif de l'exon 5 de cTNT implique un élément «enhancer» qui contient un site Mbn1

Notre recherche des éléments *cis* impliqués dans l'effet des expansions de triplets CTG sur cTNT montre que cet effet cible l'«enhancer» intronique situé en amont de l'exon (Figure 35). Cet effet correspond à une augmentation d'inclusion de l'exon, suggérant qu'il s'agit ici d'une activation de l'élément «enhancer». Cet effet pourrait également cibler l'élément «silencer» situé en amont de l'exon en conduisant à son inactivation. Dans nos expériences de minigènes tronqués, la délétion du «silencer» conduit à une grande augmentation d'inclusion de l'exon en conditions « normales ». De ce fait, elle conduit également à une baisse de l'amplitude de la réponse aux CTG. Dès lors, nos résultats ne nous permettent pas de savoir si la faible amplitude de la réponse aux CTG est due uniquement à la contribution du «silencer» dans l'épissage « normal » ou si elle traduit également l'implication de cet élément dans l'effet *trans*-dominant. D'autres expériences restent nécessaires pour déterminer si ce «silencer» est impliqué dans l'effet *trans*-dominant ou non.

Les travaux d'autres équipes ont révélé que les sites des facteurs CUGBP1 et Mbn1, situés dans les 50 nucléotides qui juxtaposent directement l'exon, contribuent également à l'effet *trans*-dominant (Philips et al., 1998, Ho et al., 2004, Warf and Berglund, 2007) (Figure 35). Ni nos expériences, ni nos résultats ne permettent de révéler l'implication de ces régions. D'abord, l'ensemble de nos constructions de minigènes tronqués contiennent ces régions et ne permettent donc pas d'étudier leur effet. Ensuite, le profil d'épissage de certains de nos minigènes (exclusion totale avec le minigène 50 E5 150) ne permet pas d'observer leur implication dans l'effet *trans*-dominant. Nos résultats se sont focalisés sur des régions introniques ciblées par l'effet *trans*-dominant. C'est ainsi que nous avons pu révéler l'importance d'un «enhancer» intronique qui n'avait jamais été décrit jusqu'ici. Cet «enhancer» contient des sites de fixation pour le facteur Mbn1, mais doit très probablement fixer d'autres facteurs d'épissage. La plupart des travaux sur la DM1 se

sont focalisés sur les facteurs Muscleblind et CELF. Il serait intéressant de rechercher quels autres facteurs participent à l'effet des expansions de triplets CTG sur l'épissage alternatif.

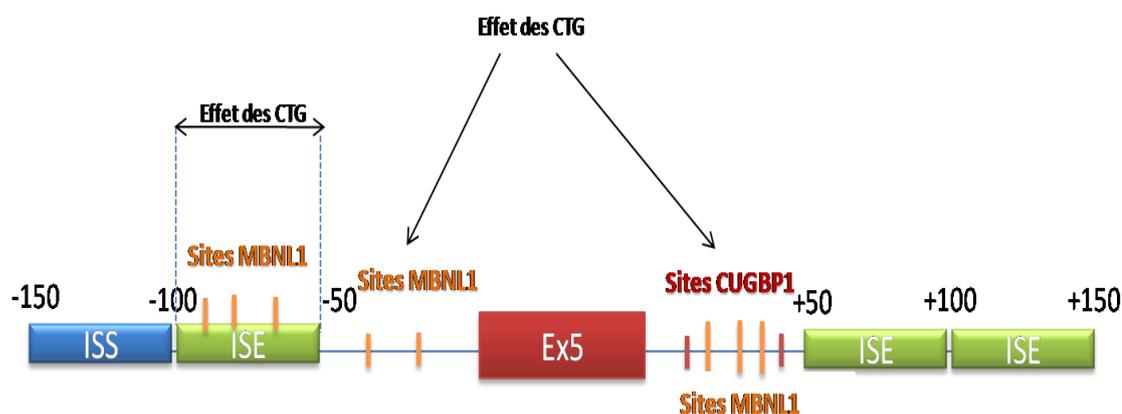


Figure 35: Éléments *cis* régulateurs et sites de facteurs d'épissage impliqués dans l'effet des expansions de CTG sur l'épissage alternatif de l'exon 5 de cTNT. Ce schéma récapitule les données apportées par ce travail ainsi que celles de la littérature. En amont de l'exon 5, les expansions de triplets ciblent un «enhancer» contenant des sites Mbn1 (ce travail) ainsi que d'autres sites Mbn1 (Ho et al., 2004, Warf and Berglund, 2007). Les sites CUGBP1 présents en aval de l'exon 5 sont également impliqués dans l'effet *trans*-dominant (Philips et al., 1998).

Conclusion

Notre étude s'est focalisée sur la régulation et la dérégulation de l'épissage alternatif de deux transcrits altérés dans la DM1: Tau et cTNT. L'épissage alternatif de ces deux transcrits, exprimés dans des tissus différents, est régulé au cours du développement. Dans la DM1, l'altération de leur l'épissage alternatif correspond à une expression majorée des isoformes fœtales. Pour l'exon 2 de Tau, le profil fœtal correspond à une exclusion de l'exon, tandis que, pour l'exon 5 de cTNT, il s'agit d'une inclusion. Ces profils d'épissage opposés ainsi que l'expression de ces transcrits dans des tissus différents supposent des mécanismes de régulation différents de leur épissage alternatif. Cependant, dans la DM1, le profil d'épissage fœtal pour plusieurs transcrits altérés soulève la possibilité d'existence d'un mécanisme commun de dérégulation, et probablement de régulation, entre ces différents transcrits. Nos travaux sur Tau et cTNT montrent que les mécanismes mis en jeu dans la régulation de l'épissage alternatif de ces deux transcrits sont différents. Pour Tau, le profil d'épissage fœtal fait appel à des «silencers», tandis que, pour cTNT, il implique des «enhancers». Toutefois, nos résultats tendent à montrer que les expansions de CTG ne ciblent pas l'ensemble des éléments *cis* régulateurs de ces deux transcrits. Ceux touchés par l'effet *trans*-dominant semblent être ceux impliquant les facteurs d'épissage des familles Muscleblind et CELF. Ces deux familles de facteurs régulateurs seraient donc le point commun majeur entre les différents transcrits dérégulés dans la DM1. De ce fait, la question que nous sommes amenés à nous poser concerne le mécanisme d'action de ces mêmes facteurs sur l'épissage.

Pour Mbnl1, il a été proposé dans littérature qu'il agirait sur l'épissage en masquant les sites d'épissage d'autres facteurs *trans* régulateurs. Ici, et dans le cas de cTNT, nous montrons, d'une part, que l'action répresseur de Mbnl1 peut passer par sa fixation au sein d'un élément «enhancer» et, d'autre part, que Mbnl1 peut agir sur des régions qui fixent son anatagoniste CUGBP1. Nos résultats sont donc en faveur d'un mécanisme d'action de Mbnl1 basé sur sa capacité à masquer des sites d'épissage. Cette hypothèse sera à tester sur le transcrit de Tau. Dans le cas de Tau, il sera question de savoir si Mbnl1, qui agit ici

comme activateur, exerce son effet à travers des éléments «silencers». Si ceci était le cas, on aurait alors à faire à un mécanisme d'action commun de Mbnl1 sur ces deux transcrits.

Perspectives

La question soulevée par ce travail concerne les mécanismes de régulation et de dérégulation de l'épissage alternatif de Tau et cTNT dans la DM1. Bien que notre étude a permis de mieux apprécier les mécanismes mis en jeu ici, elle ne les élucide pas complètement.

Dans le cas de Tau, les régions introniques contenant les éléments «silencers» sont à délimiter davantage. Nos expériences suggèrent la présence d'un «silencer» en amont de l'exon 2 sans en démontrer la présence. Ainsi de nouvelles constructions de minigènes tronquées seront à élaborer afin de l'identifier (minigène 878 E2 500). En aval de l'exon, à partir d'une large zone comprise entre les nucléotides +500 et +2100, nous avons délimité une région entre +1050 et +2100 contenant des «silencers», région impliquée dans l'effet *trans*-dominant. Il faudra localiser plus précisément les «silencers» présents dans cette région grâce à un minigène 500 E2 1500 et déterminer leur part d'implication dans l'effet *trans*-dominant. Par ailleurs, la présence d'autres éléments *cis* régulateurs dans la zone +500 et +2100 sera à tester également.

Dans nos études de l'effet *trans*-dominant sur Tau, nous avons cherché la corrélation entre régions introniques impliquées dans l'effet *trans*-dominant et celles impliquées dans l'effet du facteur régulateur ETR-3. Les régions introniques sensibles à la perte de fonction de Mbnl1 n'ont pas encore été recherchées. Des expériences de cotransfection cellulaire avec un siRNA de Mbnl1 et des minigènes Tau tronqués seront à réaliser afin de déterminer les éléments *cis* responsables de l'effet de ce facteur sur Tau.

Quant à cTNT, nos résultats révèlent un «enhancer» intronique qui régule l'épissage alternatif de l'exon 5 et qui est ciblé par l'effet des CTG. Nous avons également identifié un «silencer» en amont de l'exon, mais les profils d'épissage de nos minigènes tronqués ne nous ont pas permis d'étudier son implication dans l'effet *trans*-dominant. Afin de déterminer l'effet des CTG sur cet élément «silencer», nous pouvons le placer, seul, dans un minigène contenant les séquences d'un transcrite qui n'est pas ciblé par les expansions. Ceci devrait permettre de savoir si la présence de ce «silencer» confère une sensibilité aux expansions de CTG ou non.

BIBLIOGRAPHIE

- Adereth, Y., Dammai, V., Kose, N., Li, R., Hsu, T., 2005. RNA-dependent integrin alpha3 protein localization regulated by the Muscleblind-like protein MLP1. *Nat Cell Biol* 7, 1240-1247.
- Akamatsu, W., Okano, H.J., Osumi, N., Inoue, T., Nakamura, S., Sakakibara, S., Miura, M., Matsuo, N., Darnell, R.B., Okano, H., 1999. Mammalian ELAV-like neuronal RNA-binding proteins HuB and HuC promote neuronal development in both the central and the peripheral nervous systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9885-9890.
- Alwazzan, M., Newman, E., Hamshere, M.G., Brook, J.D., 1999. Myotonic dystrophy is associated with a reduced level of RNA from the DMWD allele adjacent to the expanded repeat. *Hum Mol Genet* 8, 1491-1497.
- Amack, J.D., Mahadevan, M.S., 2001. The myotonic dystrophy expanded CUG repeat tract is necessary but not sufficient to disrupt C2C12 myoblast differentiation. *Hum Mol Genet* 10, 1879-1887.
- Amack, J.D., Paguio, A.P., Mahadevan, M.S., 1999. Cis and trans effects of the myotonic dystrophy (DM) mutation in a cell culture model. *Hum Mol Genet* 8, 1975-1984.
- Amadoro, G., Serafino, A.L., Barbato, C., Ciotti, M.T., Sacco, A., Calissano, P., Canu, N., 2004. Role of N-terminal tau domain integrity on the survival of cerebellar granule neurons. *Cell Death Differ* 11, 217-230.
- Anant, S., Henderson, J.O., Mukhopadhyay, D., Navaratnam, N., Kennedy, S., Min, J., Davidson, N.O., 2001. Novel role for RNA-binding protein CUGBP2 in mammalian RNA editing. CUGBP2 modulates C to U editing of apolipoprotein B mRNA by interacting with apobec-1 and ACF, the apobec-1 complementation factor. *J Biol Chem* 276, 47338-47351.
- Anderson, P.A., Greig, A., Mark, T.M., Malouf, N.N., Oakeley, A.E., Ungerleider, R.M., Allen, P.D., Kay, B.K., 1995. Molecular basis of human cardiac troponin T isoforms expressed in the developing, adult, and failing heart. *Circ Res* 76, 681-686.
- Andreadis, A., Brown, W.M., Kosik, K.S., 1992. Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 31, 10626-10633.
- Andreadis, A., Nisson, P.E., Kosik, K.S., Watkins, P.C., 1993. The exon trapping assay partly discriminates against alternatively spliced exons. *Nucleic Acids Res* 21, 2217-2221
- Andreadis, A., Broderick, J.A., Kosik, K.S., 1995. Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons. *Nucleic Acids Res* 23, 3585-3593.
- Andreadis, A., Wagner, B.K., Broderick, J.A., Kosik, K.S., 1996. A tau promoter region without neuronal specificity. *J Neurochem* 66, 2257-2263.
- Andreadis, A., 2005. Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1739, 91-103.
- Arikan, M.C., Memmott, J., Broderick, J.A., Lafyatis, R., Screaton, G., Stamm, S., Andreadis, A., 2002. Modulation of the membrane-binding projection domain of tau protein: splicing regulation of exon 3. *Brain Res Mol Brain Res* 101, 109-121.

- Arrasate, M., Perez, M., Valpuesta, J.M., Avila, J., 1997. Role of glycosaminoglycans in determining the helicity of paired helical filaments. *Am J Pathol* 151, 1115-1122.
- Arrasate, M., Perez, M., Avila, J., 2000. Tau dephosphorylation at tau-1 site correlates with its association to cell membrane. *Neurochem Res* 25, 43-50.
- Artero, R., Prokop, A., Paricio, N., Begemann, G., Pueyo, I., Mlodzik, M., Perez-Alonso, M., Baylies, M.K., 1998. The muscleblind gene participates in the organization of Z-bands and epidermal attachments of *Drosophila* muscles and is regulated by Dmef2. *Dev Biol* 195, 131-143.
- Ashiya, M., Grabowski, P.J., 1997. A neuron-specific splicing switch mediated by an array of pre-mRNA repressor sites: evidence of a regulatory role for the polypyrimidine tract binding protein and a brain-specific PTB counterpart. *Rna* 3, 996-1015.
- Ashizawa, T., Dubel, J.R., Dunne, P.W., Dunne, C.J., Fu, Y.H., Pizzuti, A., Caskey, C.T., Boerwinkle, E., Perryman, M.B., Epstein, H.F., et al., 1992. Anticipation in myotonic dystrophy. II. Complex relationships between clinical findings and structure of the GCT repeat. *Neurology* 42, 1877-1883.
- Aslanidis, C., Jansen, G., Amemiya, C., Shutler, G., Mahadevan, M., Tsilfidis, C., Chen, C., Alleman, J., Wormskamp, N.G., Vooijs, M., et al., 1992. Cloning of the essential myotonic dystrophy region and mapping of the putative defect. *Nature* 355, 548-551.
- Auboeuf, D., Honig, A., Berget, S.M., O'Malley, B.W., 2002. Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators. *Science* 298, 416-419.
- Bagga, P.S., Arhin, G.K., Wilusz, J., 1998. DSEF-1 is a member of the hnRNP H family of RNA-binding proteins and stimulates pre-mRNA cleavage and polyadenylation in vitro. *Nucleic Acids Res* 26, 5343-5350.
- Baker, M., Litvan, I., Houlden, H., Adamson, J., Dickson, D., Perez-Tur, J., Hardy, J., Lynch, T., Bigio, E., Hutton, M., 1999. Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet* 8, 711-715.
- Barnard, D.C., Li, J., Peng, R., Patton, J.G., 2002. Regulation of alternative splicing by SRp86 through coactivation and repression of specific SR proteins. *Rna* 8, 526-533.
- Beck, K.E., De Girolamo, L.A., Griffin, M., Billett, E.E., 2006. The role of tissue transglutaminase in 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)-induced toxicity in differentiated human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurosci Lett* 405, 46-51.
- Bedard, K.M., Daijogo, S., Semler, B.L., 2007. A nucleo-cytoplasmic SR protein functions in viral IRES-mediated translation initiation. *Embo J* 26, 459-467.
- Begemann, G., Paricio, N., Artero, R., Kiss, I., Perez-Alonso, M., Mlodzik, M., 1997. muscleblind, a gene required for photoreceptor differentiation in *Drosophila*, encodes novel nuclear Cys3His-type zinc-finger-containing proteins. *Development* 124, 4321-4331.
- Benders, A.A., Groenen, P.J., Oerlemans, F.T., Veerkamp, J.H., Wieringa, B., 1997. Myotonic dystrophy protein kinase is involved in the modulation of the Ca²⁺ homeostasis in skeletal muscle cells. *J Clin Invest* 100, 1440-1447.
- Berget, S.M., 1995. Exon recognition in vertebrate splicing. *J Biol Chem* 270, 2411-2414.
- Berul, C.I., Maguire, C.T., Aronovitz, M.J., Greenwood, J., Miller, C., Gehrmann, J., Housman, D., Mendelsohn, M.E., Reddy, S., 1999. DMPK dosage alterations result in atrioventricular conduction abnormalities in a mouse myotonic dystrophy model. *J Clin Invest* 103, R1-7.
- Biamonti, G., Caceres, J.F., 2009. Cellular stress and RNA splicing. *Trends Biochem Sci* 34, 146-153.

- Black, D.L., 1991. Does steric interference between splice sites block the splicing of a short c-src neuron-specific exon in non-neuronal cells? *Genes Dev* 5, 389-402.
- Black, D.L., 2003. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 72, 291-336.
- Botta, A., Vallo, L., Rinaldi, F., Bonifazi, E., Amati, F., Biancolella, M., Gambardella, S., Mancinelli, E., Angelini, C., Meola, G., Novelli, G., 2007. Gene expression analysis in myotonic dystrophy: indications for a common molecular pathogenic pathway in DM1 and DM2. *Gene Expr* 13, 339-351.
- Botta, A., Rinaldi, F., Catalli, C., Vergani, L., Bonifazi, E., Romeo, V., Loro, E., Viola, A., Angelini, C., Novelli, G., 2008. The CTG repeat expansion size correlates with the splicing defects observed in muscles from myotonic dystrophy type 1 patients. *J Med Genet* 45, 639-646.
- Boudrez, A., Beullens, M., Groenen, P., Van Eynde, A., Vulsteke, V., Jagiello, I., Murray, M., Krainer, A.R., Stalmans, W., Bollen, M., 2000. NIPP1-mediated interaction of protein phosphatase-1 with CDC5L, a regulator of pre-mRNA splicing and mitotic entry. *J Biol Chem* 275, 25411-25417.
- Boudrez, A., Beullens, M., Waelkens, E., Stalmans, W., Bollen, M., 2002. Phosphorylation-dependent interaction between the splicing factors SAP155 and NIPP1. *J Biol Chem* 277, 31834-31841.
- Brandt, R., Leger, J., Lee, G., 1995. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* 131, 1327-1340.
- Brion, J.P., Couck, A.M., Flament-Durand, J., 1984. Ultrastructural study of enriched fractions of "tangles" from human patients with senile dementia of the Alzheimer type. *Acta Neuropathol* 64, 148-152.
- Brion, J.P., Flament-Durand, J., Dustin, P., 1986. Alzheimer's disease and tau proteins. *Lancet* 2, 1098.
- Brook, J.D., McCurrach, M.E., Harley, H.G., Buckler, A.J., Church, D., Aburatani, H., Hunter, K., Stanton, V.P., Thirion, J.P., Hudson, T., et al., 1992. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 69, 385.
- Brouwer, J.R., Willemsen, R., Oostra, B.A., 2009. Microsatellite repeat instability and neurological disease. *Bioessays* 31, 71-83.
- Brudno, M., Gelfand, M.S., Spengler, S., Zorn, M., Dubchak, I., Conboy, J.G., 2001. Computational analysis of candidate intron regulatory elements for tissue-specific alternative pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res* 29, 2338-2348.
- Brunner, H.G., Smeets, H., Lambermon, H.M., Coerwinkel-Driessen, M., van Oost, B.A., Wieringa, B., Ropers, H.H., 1989. A multipoint linkage map around the locus for myotonic dystrophy on chromosome 19. *Genomics* 5, 589-595.
- Brunner, H.G., Bruggenwirth, H.T., Nillesen, W., Jansen, G., Hamel, B.C., Hoppe, R.L., de Die, C.E., Howeler, C.J., van Oost, B.A., Wieringa, B., et al., 1993. Influence of sex of the transmitting parent as well as of parental allele size on the CTG expansion in myotonic dystrophy (DM). *Am J Hum Genet* 53, 1016-1023.
- Buckanovich, R.J., Posner, J.B., Darnell, R.B., 1993. Nova, the paraneoplastic Ri antigen, is homologous to an RNA-binding protein and is specifically expressed in the developing motor system. *Neuron* 11, 657-672.
- Buckanovich, R.J., Darnell, R.B., 1997. The neuronal RNA binding protein Nova-1 recognizes specific RNA targets in vitro and in vivo. *Mol Cell Biol* 17, 3194-3201.

- Buee, L., Bussiere, T., Buee-Scherrer, V., Delacourte, A., Hof, P.R., 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 33, 95-130.
- Buee, L., Delacourte, A., 2006. [Tauopathy and Alzheimer disease: a full degenerating process]. *Psychol Neuropsychiatr Vieil* 4, 261-273.
- Buj-Bello, A., Furling, D., Tronchere, H., Laporte, J., Lerouge, T., Butler-Browne, G.S., Mandel, J.L., 2002. Muscle-specific alternative splicing of myotubularin-related 1 gene is impaired in DM1 muscle cells. *Hum Mol Genet* 11, 2297-2307.
- Bungener, C., Jouvent, R., Delaporte, C., 1998. Psychopathological and emotional deficits in myotonic dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65, 353-356.
- Burge, C.B., Padgett, R.A., Sharp, P.A., 1998. Evolutionary fates and origins of U12-type introns. *Mol Cell* 2, 773-785.
- Burns, C.G., Ohi, R., Mehta, S., O'Toole, E.T., Winey, M., Clark, T.A., Sugnet, C.W., Ares, M., Jr., Gould, K.L., 2002. Removal of a single alpha-tubulin gene intron suppresses cell cycle arrest phenotypes of splicing factor mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 22, 801-815.
- Bush, E.W., Taft, C.S., Meixell, G.E., Perryman, M.B., 1996. Overexpression of myotonic dystrophy kinase in BC3H1 cells induces the skeletal muscle phenotype. *J Biol Chem* 271, 548-552.
- Bushby, K., Muntoni, F., Bourke, J.P., 2003. 107th ENMC international workshop: the management of cardiac involvement in muscular dystrophy and myotonic dystrophy. 7th-9th June 2002, Naarden, the Netherlands. *Neuromuscul Disord* 13, 166-172.
- Buxton, J., Shelbourne, P., Davies, J., Jones, C., Van Tongeren, T., Aslanidis, C., de Jong, P., Jansen, G., Anvret, M., Riley, B., et al., 1992. Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy. *Nature* 355, 547-548.
- Caceres, J.F., Stamm, S., Helfman, D.M., Krainer, A.R., 1994. Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors. *Science* 265, 1706-1709.
- Caffrey, T.M., Joachim, C., Paracchini, S., Esiri, M.M., Wade-Martins, R., 2006. Haplotype-specific expression of exon 10 at the human MAPT locus. *Hum Mol Genet* 15, 3529-3537.
- Caputi, M., Mayeda, A., Krainer, A.R., Zahler, A.M., 1999. hnRNP A/B proteins are required for inhibition of HIV-1 pre-mRNA splicing. *Embo J* 18, 4060-4067.
- Cardani, R., Mancinelli, E., Rotondo, G., Sansone, V., Meola, G., 2006. Muscleblind-like protein 1 nuclear sequestration is a molecular pathology marker of DM1 and DM2. *Eur J Histochem* 50, 177-182.
- Cardani, R., Baldassa, S., Botta, A., Rinaldi, F., Novelli, G., Mancinelli, E., Meola, G., 2009. Ribonuclear inclusions and MBNL1 nuclear sequestration do not affect myoblast differentiation but alter gene splicing in myotonic dystrophy type 2. *Neuromuscul Disord* 19, 335-343.
- Carmel, I., Tal, S., Vig, I., Ast, G., 2004. Comparative analysis detects dependencies among the 5' splice-site positions. *Rna* 10, 828-840.
- Cartegni, L., Chew, S.L., Krainer, A.R., 2002. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3, 285-298.
- Celotto, A.M., Graveley, B.R., 2001. Alternative splicing of the *Drosophila* Dscam pre-mRNA is both temporally and spatially regulated. *Genetics* 159, 599-608.
- Chabot, B., Bisotto, S., Vincent, M., 1995. The nuclear matrix phosphoprotein p255 associates with splicing complexes as part of the [U4/U6.U5] tri-snRNP particle. *Nucleic Acids Res* 23, 3206-3213.

- Chalfant, C.E., Rathman, K., Pinkerman, R.L., Wood, R.E., Obeid, L.M., Ogretmen, B., Hannun, Y.A., 2002. De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1. *J Biol Chem* 277, 12587-12595.
- Chandler, S.D., Mayeda, A., Yeakley, J.M., Krainer, A.R., Fu, X.D., 1997. RNA splicing specificity determined by the coordinated action of RNA recognition motifs in SR proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3596-3601.
- Charlet-B, B.N., Logan, P., Singh, G., Cooper, T.A., 2002a. Dynamic antagonism between ETR-3 and PTB regulates cell type-specific alternative splicing. *Mol Cell* 9, 649-658.
- Charlet-B, B.N., Savkur, R.S., Singh, G., Philips, A.V., Grice, E.A., Cooper, T.A., 2002b. Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol Cell* 10, 45-53.
- Charpentier, B., Rosbash, M., 1996. Intramolecular structure in yeast introns aids the early steps of in vitro spliceosome assembly. *Rna* 2, 509-522.
- Chen, J., Kanai, Y., Cowan, N.J., Hirokawa, N., 1992. Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature* 360, 674-677.
- Chen, C.D., Kobayashi, R., Helfman, D.M., 1999. Binding of hnRNP H to an exonic splicing silencer is involved in the regulation of alternative splicing of the rat beta-tropomyosin gene. *Genes Dev* 13, 593-606.
- Cho, E.J., Takagi, T., Moore, C.R., Buratowski, S., 1997. mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev* 11, 3319-3326.
- Choi, Y.D., Grabowski, P.J., Sharp, P.A., Dreyfuss, G., 1986. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins: role in RNA splicing. *Science* 231, 1534-1539.
- Choi, D.K., Ito, T., Mitsui, Y., Sakaki, Y., 1998. Fluorescent differential display analysis of gene expression in apoptotic neuroblastoma cells. *Gene* 223, 21-31.
- Choi, D.K., Ito, T., Tsukahara, F., Hirai, M., Sakaki, Y., 1999. Developmentally-regulated expression of mNapor encoding an apoptosis-induced ELAV-type RNA binding protein. *Gene* 237, 135-142.
- Chou, M.Y., Underwood, J.G., Nikolic, J., Luu, M.H., Black, D.L., 2000. Multisite RNA binding and release of polypyrimidine tract binding protein during the regulation of c-src neural-specific splicing. *Mol Cell* 5, 949-957.
- Collier, B., Goobar-Larsson, L., Sokolowski, M., Schwartz, S., 1998. Translational inhibition in vitro of human papillomavirus type 16 L2 mRNA mediated through interaction with heterogenous ribonucleoprotein K and poly(rC)-binding proteins 1 and 2. *J Biol Chem* 273, 22648-22656.
- Colot, H.V., Stutz, F., Rosbash, M., 1996. The yeast splicing factor Mud13p is a commitment complex component and corresponds to CBP20, the small subunit of the nuclear cap-binding complex. *Genes Dev* 10, 1699-1708.
- Colwill, K., Pawson, T., Andrews, B., Prasad, J., Manley, J.L., Bell, J.C., Duncan, P.I., 1996. The Clk/Sty protein kinase phosphorylates SR splicing factors and regulates their intranuclear distribution. *Embo J* 15, 265-275.
- Conn, G.L., Draper, D.E., 1998. RNA structure. *Curr Opin Struct Biol* 8, 278-285.
- Connell, J.W., Rodriguez-Martin, T., Gibb, G.M., Kahn, N.M., Grierson, A.J., Hanger, D.P., Revesz, T., Lantos, P.L., Anderton, B.H., Gallo, J.M., 2005. Quantitative analysis of tau isoform transcripts in sporadic tauopathies. *Brain Res Mol Brain Res* 137, 104-109.

- Conrad, C., Zhu, J., Conrad, C., Schoenfeld, D., Fang, Z., Ingelsson, M., Stamm, S., Church, G., Hyman, B.T., 2007. Single molecule profiling of tau gene expression in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 103, 1228-1236.
- Cooke, C., Alwine, J.C., 1996. The cap and the 3' splice site similarly affect polyadenylation efficiency. *Mol Cell Biol* 16, 2579-2584.
- Cooper, T.A., Ordahl, C.P., 1984. A single troponin T gene regulated by different programs in cardiac and skeletal muscle development. *Science* 226, 979-982.
- Cooper, T.A., Ordahl, C.P., 1985. A single cardiac troponin T gene generates embryonic and adult isoforms via developmentally regulated alternate splicing. *J Biol Chem* 260, 11140-11148.
- Cooper, T.A., 1998. Muscle-specific splicing of a heterologous exon mediated by a single muscle-specific splicing enhancer from the cardiac troponin T gene. *Mol Cell Biol* 18, 4519-4525.
- Cooper, T.A., Wan, L., Dreyfuss, G., 2009. RNA and disease. *Cell* 136, 777-793.
- Couchie, D., Mavilia, C., Georgieff, I.S., Liem, R.K., Shelanski, M.L., Nunez, J., 1992. Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4378-4381.
- Coulter, L.R., Landree, M.A., Cooper, T.A., 1997. Identification of a new class of exonic splicing enhancers by in vivo selection. *Mol Cell Biol* 17, 2143-2150.
- Coutinho-Mansfield, G.C., Xue, Y., Zhang, Y., Fu, X.D., 2007. PTB/nPTB switch: a post-transcriptional mechanism for programming neuronal differentiation. *Genes Dev* 21, 1573-1577.
- Cowper, A.E., Caceres, J.F., Mayeda, A., Screaton, G.R., 2001. Serine-arginine (SR) protein-like factors that antagonize authentic SR proteins and regulate alternative splicing. *J Biol Chem* 276, 48908-48914.
- Cramer, P., Pesce, C.G., Baralle, F.E., Kornblihtt, A.R., 1997. Functional association between promoter structure and transcript alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11456-11460.
- Dallaire, F., Dupuis, S., Fiset, S., Chabot, B., 2000. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and UP1 protect mammalian telomeric repeats and modulate telomere replication in vitro. *J Biol Chem* 275, 14509-14516.
- Damgaard, C.K., Tange, T.O., Kjems, J., 2002. hnRNP A1 controls HIV-1 mRNA splicing through cooperative binding to intron and exon splicing silencers in the context of a conserved secondary structure. *Rna* 8, 1401-1415.
- Dansithong, W., Paul, S., Comai, L., Reddy, S., 2005. MBNL1 is the primary determinant of focus formation and aberrant insulin receptor splicing in DM1. *J Biol Chem* 280, 5773-5780.
- Davis, B.M., McCurrach, M.E., Taneja, K.L., Singer, R.H., Housman, D.E., 1997. Expansion of a CUG trinucleotide repeat in the 3' untranslated region of myotonic dystrophy protein kinase transcripts results in nuclear retention of transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7388-7393.
- Dawson, H.N., Ferreira, A., Eyster, M.V., Ghoshal, N., Binder, L.I., Vitek, M.P., 2001. Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J Cell Sci* 114, 1179-1187.
- Day, J.W., Ranum, L.P., 2005. RNA pathogenesis of the myotonic dystrophies. *Neuromuscul Disord* 15, 5-16.
- de Haro, M., Al-Ramahi, I., De Gouyon, B., Ukani, L., Rosa, A., Faustino, N.A., Ashizawa, T., Cooper, T.A., Botas, J., 2006. MBNL1 and CUGBP1 modify expanded CUG-induced toxicity in a *Drosophila* model of myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 15, 2138-2145.

- De Temmerman, N., Sermon, K., Seneca, S., De Rycke, M., Hilven, P., Lissens, W., Van Steirteghem, A., Liebaers, I., 2004. Intergenerational instability of the expanded CTG repeat in the DMPK gene: studies in human gametes and preimplantation embryos. *Am J Hum Genet* 75, 325-329.
- Del Gatto-Konczak, F., Bourgeois, C.F., Le Guiner, C., Kister, L., Gesnel, M.C., Stevenin, J., Breathnach, R., 2000. The RNA-binding protein TIA-1 is a novel mammalian splicing regulator acting through intron sequences adjacent to a 5' splice site. *Mol Cell Biol* 20, 6287-6299.
- Delacourte, A., Defossez, A., 1986. Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J Neurol Sci* 76, 173-186.
- Deshler, J.O., Rossi, J.J., 1991. Unexpected point mutations activate cryptic 3' splice sites by perturbing a natural secondary structure within a yeast intron. *Genes Dev* 5, 1252-1263.
- Dewey, C.N., Rogozin, I.B., Koonin, E.V., 2006. Compensatory relationship between splice sites and exonic splicing signals depending on the length of vertebrate introns. *BMC Genomics* 7, 311.
- Dhaenens, C.M., Schraen-Maschke, S., Tran, H., Vingtdoux, V., Ghanem, D., Leroy, O., Delplanque, J., Vanbrussel, E., Delacourte, A., Vermersch, P., Maurage, C.A., Gruffat, H., Sergeant, A., Mahadevan, M.S., Ishiura, S., Buee, L., Cooper, T.A., Caillet-Boudin, M.L., Charlet-Berguerand, N., Sablonniere, B., Sergeant, N., 2008. Overexpression of MBNL1 fetal isoforms and modified splicing of Tau in the DM1 brain: two individual consequences of CUG trinucleotide repeats. *Exp Neurol* 210, 467-478.
- Di Costanzo, A., de Cristofaro, M., Di Iorio, G., Daniele, A., Bonavita, S., Tedeschi, G., 2009. Paternally inherited case of congenital DM1: brain MRI and review of literature. *Brain Dev* 31, 79-82.
- Di Maria, E., Tabaton, M., Vigo, T., Abbruzzese, G., Bellone, E., Donati, C., Frasson, E., Marchese, R., Montagna, P., Munoz, D.G., Pramstaller, P.P., Zanusso, G., Ajmar, F., Mandich, P., 2000. Corticobasal degeneration shares a common genetic background with progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol* 47, 374-377.
- Dominski, Z., Kole, R., 1991. Selection of splice sites in pre-mRNAs with short internal exons. *Mol Cell Biol* 11, 6075-6083.
- Donev, R., Newall, A., Thome, J., Sheer, D., 2007. A role for SC35 and hnRNPA1 in the determination of amyloid precursor protein isoforms. *Mol Psychiatry* 12, 681-690.
- Dredge, B.K., Darnell, R.B., 2003. Nova regulates GABA(A) receptor gamma2 alternative splicing via a distal downstream UCAU-rich intronic splicing enhancer. *Mol Cell Biol* 23, 4687-4700.
- Dredge, B.K., Stefani, G., Engelhard, C.C., Darnell, R.B., 2005. Nova autoregulation reveals dual functions in neuronal splicing. *Embo J* 24, 1608-1620.
- Dreyfuss, G., 1986. Structure and function of nuclear and cytoplasmic ribonucleoprotein particles. *Annu Rev Cell Biol* 2, 459-498.
- Dreyfuss, G., Swanson, M.S., Pinol-Roma, S., 1988. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation. *Trends Biochem Sci* 13, 86-91.
- Dreyfuss, G., Matunis, M.J., Pinol-Roma, S., Burd, C.G., 1993. hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem* 62, 289-321.
- Drubin, D.G., Kirschner, M.W., 1986. Tau protein function in living cells. *J Cell Biol* 103, 2739-2746.
- D'Souza, I., Poorkaj, P., Hong, M., Nochlin, D., Lee, V.M., Bird, T.D., Schellenberg, G.D., 1999. Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome

- 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5598-5603.
- D'Souza, I., Schellenberg, G.D., 2000. Determinants of 4-repeat tau expression. Coordination between enhancing and inhibitory splicing sequences for exon 10 inclusion. *J Biol Chem* 275, 17700-17709.
- D'Souza, I., Schellenberg, G.D., 2005. Regulation of tau isoform expression and dementia. *Biochim Biophys Acta* 1739, 104-115.
- Du, Q., Melnikova, I.N., Gardner, P.D., 1998. Differential effects of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K on Sp1- and Sp3-mediated transcriptional activation of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor promoter. *J Biol Chem* 273, 19877-19883.
- Ebralidze, A., Wang, Y., Petkova, V., Ebralidse, K., Junghans, R.P., 2004. RNA leaching of transcription factors disrupts transcription in myotonic dystrophy. *Science* 303, 383-387.
- Ehrhard, P.B., Ganter, U., Schmutz, B., Bauer, J., Otten, U., 1993. Expression of low-affinity NGF receptor and trkB mRNA in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *FEBS Lett* 330, 287-292.
- Encinas, M., Iglesias, M., Liu, Y., Wang, H., Muhaisen, A., Cena, V., Gallego, C., Comella, J.X., 2000. Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem* 75, 991-1003.
- Epstein, H.F., Fischman, D.A., 1991. Molecular analysis of protein assembly in muscle development. *Science* 251, 1039-1044.
- Eriksson, M., Ansved, T., Edstrom, L., Wells, D.J., Watt, D.J., Anvret, M., Carey, N., 2000. Independent regulation of the myotonic dystrophy 1 locus genes postnatally and during adult skeletal muscle regeneration. *J Biol Chem* 275, 19964-19969.
- Estes, P.A., Cooke, N.E., Liebhaber, S.A., 1992. A native RNA secondary structure controls alternative splice-site selection and generates two human growth hormone isoforms. *J Biol Chem* 267, 14902-14908.
- Fairbrother, W.G., Yeh, R.F., Sharp, P.A., Burge, C.B., 2002. Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science* 297, 1007-1013.
- Fardaei, M., Larkin, K., Brook, J.D., Hamshere, M.G., 2001. In vivo co-localisation of MBNL protein with DMPK expanded-repeat transcripts. *Nucleic Acids Res* 29, 2766-2771.
- Fardaei, M., Rogers, M.T., Thorpe, H.M., Larkin, K., Hamshere, M.G., Harper, P.S., Brook, J.D., 2002. Three proteins, MBNL, MBLL and MBXL, co-localize in vivo with nuclear foci of expanded-repeat transcripts in DM1 and DM2 cells. *Hum Mol Genet* 11, 805-814.
- Faura, M., Renau-Piqueras, J., Bachs, O., Bosser, R., 1995. Differential distribution of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in rat tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 217, 554-560.
- Faustino, N.A., Cooper, T.A., 2005. Identification of putative new splicing targets for ETR-3 using sequences identified by systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Mol Cell Biol* 25, 879-887.
- Fededa, J.P., Kornblihtt, A.R., 2008. A splicing regulator promotes transcriptional elongation. *Nat Struct Mol Biol* 15, 779-781.
- Fernandes, J.M., Kinghorn, J.R., Johnston, I.A., 2007. Characterization of two paralogous muscleblind-like genes from the tiger pufferfish (*Takifugu rubripes*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 146, 180-186.

- Fields, C., 1990. Information content of *Caenorhabditis elegans* splice site sequences varies with intron length. *Nucleic Acids Res* 18, 1509-1512.
- Forch, P., Merendino, L., Martinez, C., Valcarcel, J., 2001. Modulation of msl-2 5' splice site recognition by Sex-lethal. *Rna* 7, 1185-1191.
- Friendewey, D., Keller, W., 1985. Stepwise assembly of a pre-mRNA splicing complex requires U-snRNPs and specific intron sequences. *Cell* 42, 355-367.
- Fresco, L.D., Buratowski, S., 1996. Conditional mutants of the yeast mRNA capping enzyme show that the cap enhances, but is not required for, mRNA splicing. *Rna* 2, 584-596.
- Frisch, R., Singleton, K.R., Moses, P.A., Gonzalez, I.L., Carango, P., Marks, H.G., Funanage, V.L., 2001. Effect of triplet repeat expansion on chromatin structure and expression of DMPK and neighboring genes, SIX5 and DMWD, in myotonic dystrophy. *Mol Genet Metab* 74, 281-291.
- Fu, Y.H., Pizzuti, A., Fenwick, R.G., Jr., King, J., Rajnarayan, S., Dunne, P.W., Dubel, J., Nasser, G.A., Ashizawa, T., de Jong, P., et al., 1992. An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 255, 1256-1258.
- Fu, Y.H., Friedman, D.L., Richards, S., Pearlman, J.A., Gibbs, R.A., Pizzuti, A., Ashizawa, T., Perryman, M.B., Scarlato, G., Fenwick, R.G., Jr., et al., 1993. Decreased expression of myotonin-protein kinase messenger RNA and protein in adult form of myotonic dystrophy. *Science* 260, 235-238.
- Furling, D., Lemieux, D., Taneja, K., Puymirat, J., 2001. Decreased levels of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and delayed differentiation in human myotonic dystrophy myoblasts. *Neuromuscul Disord* 11, 728-735.
- Gache, Y., Guilleminot, J., Bridoux, A.M., Nunez, J., 1993. Heterogeneity of the high molecular weight tau proteins in N115 neuroblastoma cells. *J Neurochem* 61, 873-880.
- Gao, Q.S., Memmott, J., Lafyatis, R., Stamm, S., Sreaton, G., Andreadis, A., 2000. Complex regulation of tau exon 10, whose missplicing causes frontotemporal dementia. *J Neurochem* 74, 490-500.
- Georgieff, I.S., Liem, R.K., Couchie, D., Mavilia, C., Nunez, J., Shelanski, M.L., 1993. Expression of high molecular weight tau in the central and peripheral nervous systems. *J Cell Sci* 105 (Pt 3), 729-737.
- Gilmartin, G.M., McDevitt, M.A., Nevins, J.R., 1988. Multiple factors are required for specific RNA cleavage at a poly(A) addition site. *Genes Dev* 2, 578-587.
- Ginsberg, S.D., Che, S., Counts, S.E., Mufson, E.J., 2006. Single cell gene expression profiling in Alzheimer's disease. *NeuroRx* 3, 302-318.
- Glatz, D.C., Rujescu, D., Tang, Y., Berendt, F.J., Hartmann, A.M., Faltraco, F., Rosenberg, C., Hulette, C., Jellinger, K., Hampel, H., Riederer, P., Moller, H.J., Andreadis, A., Henkel, K., Stamm, S., 2006. The alternative splicing of tau exon 10 and its regulatory proteins CLK2 and TRA2-BETA1 changes in sporadic Alzheimer's disease. *J Neurochem* 96, 635-644.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., Crowther, R.A., 1989a. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3, 519-526.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Potier, M.C., Ulrich, J., Crowther, R.A., 1989b. Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *Embo J* 8, 393-399.
- Goedert, M., Jakes, R., 1990. Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *Embo J* 9, 4225-4230.

- Goedert, M., Spillantini, M.G., Crowther, R.A., 1992. Cloning of a big tau microtubule-associated protein characteristic of the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1983-1987.
- Goguel, V., Wang, Y., Rosbash, M., 1993. Short artificial hairpins sequester splicing signals and inhibit yeast pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol* 13, 6841-6848.
- Gomes, A.V., Venkatraman, G., Davis, J.P., Tikunova, S.B., Engel, P., Solaro, R.J., Potter, J.D., 2004. Cardiac troponin T isoforms affect the Ca(2+) sensitivity of force development in the presence of slow skeletal troponin I: insights into the role of troponin T isoforms in the fetal heart. *J Biol Chem* 279, 49579-49587.
- Gomes-Pereira, M., Foiry, L., Nicole, A., Huguet, A., Junien, C., Munnich, A., Gourdon, G., 2007. CTG trinucleotide repeat "big jumps": large expansions, small mice. *PLoS Genet* 3, e52.
- Goo, Y.H., Cooper, T.A., 2009. CUGBP2 directly interacts with U2 17S snRNP components and promotes U2 snRNA binding to cardiac troponin T pre-mRNA. *Nucleic Acids Res.*
- Good, P.J., 1995. A conserved family of elav-like genes in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4557-4561.
- Good, P.J., Chen, Q., Warner, S.J., Herring, D.C., 2000. A family of human RNA-binding proteins related to the *Drosophila* Bruno translational regulator. *J Biol Chem* 275, 28583-28592.
- Goode, B.L., Denis, P.E., Panda, D., Radeke, M.J., Miller, H.P., Wilson, L., Feinstein, S.C., 1997. Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. *Mol Biol Cell* 8, 353-365.
- Gozani, O., Feld, R., Reed, R., 1996. Evidence that sequence-independent binding of highly conserved U2 snRNP proteins upstream of the branch site is required for assembly of spliceosomal complex A. *Genes Dev* 10, 233-243.
- Graveley, B.R., Maniatis, T., 1998. Arginine/serine-rich domains of SR proteins can function as activators of pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 1, 765-771.
- Graveley, B.R., 2000. Sorting out the complexity of SR protein functions. *Rna* 6, 1197-1211.
- Grover, A., DeTure, M., Yen, S.H., Hutton, M., 2002. Effects on splicing and protein function of three mutations in codon N296 of tau in vitro. *Neurosci Lett* 323, 33-36.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y.C., Zaidi, M.S., Wisniewski, H.M., 1986. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261, 6084-6089.
- Hanamura, A., Caceres, J.F., Mayeda, A., Franza, B.R., Jr., Krainer, A.R., 1998. Regulated tissue-specific expression of antagonistic pre-mRNA splicing factors. *Rna* 4, 430-444.
- Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., Sato-Yoshitake, R., Takei, Y., Noda, T., Hirokawa, N., 1994. Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* 369, 488-491.
- Harley, H.G., Walsh, K.V., Rundle, S., Brook, J.D., Sarfarazi, M., Koch, M.C., Floyd, J.L., Harper, P.S., Shaw, D.J., 1991. Localisation of the myotonic dystrophy locus to 19q13.2-19q13.3 and its relationship to twelve polymorphic loci on 19q. *Hum Genet* 87, 73-80.
- Harley, H.G., Rundle, S.A., Reardon, W., Myring, J., Crow, S., Brook, J.D., Harper, P.S., Shaw, D.J., 1992. Unstable DNA sequence in myotonic dystrophy. *Lancet* 339, 1125-1128.
- Harley, H.G., Rundle, S.A., MacMillan, J.C., Myring, J., Brook, J.D., Crow, S., Reardon, W., Fenton, I., Shaw, D.J., Harper, P.S., 1993. Size of the unstable CTG repeat sequence in relation to phenotype and parental transmission in myotonic dystrophy. *Am J Hum Genet* 52, 1164-1174.

- Harper, P.S., Dyken, P.R., 1972a. Early-onset dystrophia myotonica. Evidence supporting a maternal environmental factor. *Lancet* 2, 53-55.
- Harper, P.S., Rivas, M.L., Bias, W.B., Hutchinson, J.R., Dyken, P.R., McKusick, V.A., 1972b. Genetic linkage confirmed between the locus for myotonic dystrophy and the ABH-secretion and Lutheran blood group loci. *Am J Hum Genet* 24, 310-316.
- Hawkins, J.D., 1988. A survey on intron and exon lengths. *Nucleic Acids Res* 16, 9893-9908.
- Himmler, A., 1989. Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Mol Cell Biol* 9, 1389-1396.
- Hirose, Y., Tacke, R., Manley, J.L., 1999. Phosphorylated RNA polymerase II stimulates pre-mRNA splicing. *Genes Dev* 13, 1234-1239.
- Ho, T.H., Charlet-B, B.N., Poulos, M.G., Singh, G., Swanson, M.S., Cooper, T.A., 2004. Muscleblind proteins regulate alternative splicing. *Embo J* 23, 3103-3112.
- Ho, T.H., Savkur, R.S., Poulos, M.G., Mancini, M.A., Swanson, M.S., Cooper, T.A., 2005. Colocalization of muscleblind with RNA foci is separable from mis-regulation of alternative splicing in myotonic dystrophy. *J Cell Sci* 118, 2923-2933.
- Honig, A., Auboeuf, D., Parker, M.M., O'Malley, B.W., Berget, S.M., 2002. Regulation of alternative splicing by the ATP-dependent DEAD-box RNA helicase p72. *Mol Cell Biol* 22, 5698-5707.
- Houlden, H., Baker, M., Morris, H.R., MacDonald, N., Pickering-Brown, S., Adamson, J., Lees, A.J., Rossor, M.N., Quinn, N.P., Kertesz, A., Khan, M.N., Hardy, J., Lantos, P.L., St George-Hyslop, P., Munoz, D.G., Mann, D., Lang, A.E., Bergeron, C., Bigio, E.H., Litvan, I., Bhatia, K.P., Dickson, D., Wood, N.W., Hutton, M., 2001. Corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy share a common tau haplotype. *Neurology* 56, 1702-1706.
- Houseley, J.M., Wang, Z., Brock, G.J., Soloway, J., Artero, R., Perez-Alonso, M., O'Dell, K.M., Monckton, D.G., 2005. Myotonic dystrophy associated expanded CUG repeat muscleblind positive ribonuclear foci are not toxic to *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 14, 873-883.
- Huang, H., Wahlin, K.J., McNally, M., Irving, N.D., Adler, R., 2008. Developmental regulation of muscleblind-like (MBNL) gene expression in the chicken embryo retina. *Dev Dyn* 237, 286-296.
- Huang, Y., Steitz, J.A., 2001. Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA. *Mol Cell* 7, 899-905.
- Huang, Y., Gattoni, R., Stevenin, J., Steitz, J.A., 2003. SR splicing factors serve as adapter proteins for TAP-dependent mRNA export. *Mol Cell* 11, 837-843.
- Huh, G.S., Hynes, R.O., 1994. Regulation of alternative pre-mRNA splicing by a novel repeated hexanucleotide element. *Genes Dev* 8, 1561-1574.
- Hunter, A., Tsilfidis, C., Mettler, G., Jacob, P., Mahadevan, M., Surh, L., Korneluk, R., 1992. The correlation of age of onset with CTG trinucleotide repeat amplification in myotonic dystrophy. *J Med Genet* 29, 774-779.
- Hutton, M., Lendon, C.L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., Hackett, J., Adamson, J., Lincoln, S., Dickson, D., Davies, P., Petersen, R.C., Stevens, M., de Graaff, E., Wauters, E., van Baren, J., Hillebrand, M., Joosse, M., Kwon, J.M., Nowotny, P., Che, L.K., Norton, J., Morris, J.C., Reed, L.A., Trojanowski, J., Basun, H., Lannfelt, L., Neystat, M., Fahn, S., Dark, F., Tannenberg, T., Dodd, P.R., Hayward, N., Kwok, J.B., Schofield, P.R., Andreadis, A., Snowden, J., Craufurd, D., Neary, D., Owen, F., Oostra, B.A., Hardy, J., Goate, A., van Swieten, J., Mann, D., Lynch, T., Heutink, P., 1998. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393, 702-705.

- Hwang, S.C., Jhon, D.Y., Bae, Y.S., Kim, J.H., Rhee, S.G., 1996. Activation of phospholipase C-gamma by the concerted action of tau proteins and arachidonic acid. *J Biol Chem* 271, 18342-18349.
- Iakova, P., Wang, G.L., Timchen, L., Michalak, M., Pereira-Smith, O.M., Smith, J.R., Timchenko, N.A., 2004. Competition of CUGBP1 and calreticulin for the regulation of p21 translation determines cell fate. *Embo J* 23, 406-417.
- Iyer, R.R., Wells, R.D., 1999. Expansion and deletion of triplet repeat sequences in *Escherichia coli* occur on the leading strand of DNA replication. *J Biol Chem* 274, 3865-3877.
- Izquierdo, J.M., 2008. Hu antigen R (HuR) functions as an alternative pre-mRNA splicing regulator of Fas apoptosis-promoting receptor on exon definition. *J Biol Chem* 283, 19077-19084.
- Jansen, G., Mahadevan, M., Amemiya, C., Wormskamp, N., Segers, B., Hendriks, W., O'Hoy, K., Baird, S., Sabourin, L., Lennon, G., et al., 1992. Characterization of the myotonic dystrophy region predicts multiple protein isoform-encoding mRNAs. *Nat Genet* 1, 261-266.
- Jansen, G., Willems, P., Coerwinkel, M., Nillesen, W., Smeets, H., Vits, L., Howeler, C., Brunner, H., Wieringa, B., 1994. Gonosomal mosaicism in myotonic dystrophy patients: involvement of mitotic events in (CTG)_n repeat variation and selection against extreme expansion in sperm. *Am J Hum Genet* 54, 575-585.
- Jansen, G., Groenen, P.J., Bachner, D., Jap, P.H., Coerwinkel, M., Oerlemans, F., van den Broek, W., Gohlsch, B., Pette, D., Plomp, J.J., Molenaar, P.C., Nederhoff, M.G., van Echteld, C.J., Dekker, M., Berns, A., Hameister, H., Wieringa, B., 1996. Abnormal myotonic dystrophy protein kinase levels produce only mild myopathy in mice. *Nat Genet* 13, 316-324.
- Jenkins, S.M., Johnson, G.V., 1998. Tau complexes with phospholipase C-gamma in situ. *Neuroreport* 9, 67-71.
- Jensen, K.B., Dredge, B.K., Stefani, G., Zhong, R., Buckanovich, R.J., Okano, H.J., Yang, Y.Y., Darnell, R.B., 2000. Nova-1 regulates neuron-specific alternative splicing and is essential for neuronal viability. *Neuron* 25, 359-371.
- Jiang, H., Mankodi, A., Swanson, M.S., Moxley, R.T., Thornton, C.A., 2004. Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Hum Mol Genet* 13, 3079-3088.
- Jin, J.P., Lin, J.J., 1989. Isolation and characterization of cDNA clones encoding embryonic and adult isoforms of rat cardiac troponin T. *J Biol Chem* 264, 14471-14477.
- Kaliman, P., Catalucci, D., Lam, J.T., Kondo, R., Gutierrez, J.C., Reddy, S., Palacin, M., Zorzano, A., Chien, K.R., Ruiz-Lozano, P., 2005. Myotonic dystrophy protein kinase phosphorylates phospholamban and regulates calcium uptake in cardiomyocyte sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 280, 8016-8021.
- Kalsotra, A., Xiao, X., Ward, A.J., Castle, J.C., Johnson, J.M., Burge, C.B., Cooper, T.A., 2008. A postnatal switch of CELF and MBNL proteins reprograms alternative splicing in the developing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20333-20338.
- Kamisago, M., Sharma, S.D., DePalma, S.R., Solomon, S., Sharma, P., McDonough, B., Smoot, L., Mullen, M.P., Woolf, P.K., Wigle, E.D., Seidman, J.G., Seidman, C.E., 2000. Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* 343, 1688-1696.
- Kamma, H., Portman, D.S., Dreyfuss, G., 1995. Cell type-specific expression of hnRNP proteins. *Exp Cell Res* 221, 187-196.

- Kanadia, R.N., Johnstone, K.A., Mankodi, A., Lungu, C., Thornton, C.A., Esson, D., Timmers, A.M., Hauswirth, W.W., Swanson, M.S., 2003a. A muscleblind knockout model for myotonic dystrophy. *Science* 302, 1978-1980.
- Kanadia, R.N., Urbinati, C.R., Crusselle, V.J., Luo, D., Lee, Y.J., Harrison, J.K., Oh, S.P., Swanson, M.S., 2003b. Developmental expression of mouse muscleblind genes Mbnl1, Mbnl2 and Mbnl3. *Gene Expr Patterns* 3, 459-462.
- Kanadia, R.N., Shin, J., Yuan, Y., Beattie, S.G., Wheeler, T.M., Thornton, C.A., Swanson, M.S., 2006. Reversal of RNA missplicing and myotonia after muscleblind overexpression in a mouse poly(CUG) model for myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11748-11753.
- Kang, S., Ohshima, K., Shimizu, M., Amirhaeri, S., Wells, R.D., 1995. Pausing of DNA synthesis in vitro at specific loci in CTG and CGG triplet repeats from human hereditary disease genes. *J Biol Chem* 270, 27014-27021.
- Kent, O.A., Reayi, A., Foong, L., Chilibeck, K.A., MacMillan, A.M., 2003. Structuring of the 3' splice site by U2AF65. *J Biol Chem* 278, 50572-50577.
- Kessler, M.M., Henry, M.F., Shen, E., Zhao, J., Gross, S., Silver, P.A., Moore, C.L., 1997. Hrp1, a sequence-specific RNA-binding protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm, is required for mRNA 3'-end formation in yeast. *Genes Dev* 11, 2545-2556.
- Kiehl, T.R., Shibata, H., Vo, T., Huynh, D.P., Pulst, S.M., 2001. Identification and expression of a mouse ortholog of A2BP1. *Mamm Genome* 12, 595-601.
- Kim, E., Du, L., Bregman, D.B., Warren, S.L., 1997. Splicing factors associate with hyperphosphorylated RNA polymerase II in the absence of pre-mRNA. *J Cell Biol* 136, 19-28.
- Kino, Y., Mori, D., Oma, Y., Takeshita, Y., Sasagawa, N., Ishiura, S., 2004. Muscleblind protein, MBNL1/EXP, binds specifically to CHHG repeats. *Hum Mol Genet* 13, 495-507.
- Klaff, P., Riesner, D., Steger, G., 1996. RNA structure and the regulation of gene expression. *Plant Mol Biol* 32, 89-106.
- Klesert, T.R., Otten, A.D., Bird, T.D., Tapscott, S.J., 1997. Trinucleotide repeat expansion at the myotonic dystrophy locus reduces expression of DMAHP. *Nat Genet* 16, 402-406.
- Klesert, T.R., Cho, D.H., Clark, J.I., Maylie, J., Adelman, J., Snider, L., Yuen, E.C., Soriano, P., Tapscott, S.J., 2000. Mice deficient in Six5 develop cataracts: implications for myotonic dystrophy. *Nat Genet* 25, 105-109.
- Konarska, M.M., Vilardell, J., Query, C.C., 2006. Repositioning of the reaction intermediate within the catalytic center of the spliceosome. *Mol Cell* 21, 543-553.
- Kornblihtt, A.R., de la Mata, M., Fededa, J.P., Munoz, M.J., Nogues, G., 2004. Multiple links between transcription and splicing. *Rna* 10, 1489-1498.
- Kosik, K.S., Orecchio, L.D., Bakalis, S., Neve, R.L., 1989. Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* 2, 1389-1397.
- Krahe, R., Ashizawa, T., Abbruzzese, C., Roeder, E., Carango, P., Giacanelli, M., Funanage, V.L., Siciliano, M.J., 1995. Effect of myotonic dystrophy trinucleotide repeat expansion on DMPK transcription and processing. *Genomics* 28, 1-14.
- Krol, J., Fiszer, A., Mykowska, A., Sobczak, K., de Mezer, M., Krzyzosiak, W.J., 2007. Ribonuclease Dicer cleaves triplet repeat hairpins into shorter repeats that silence specific targets. *Mol Cell* 25, 575-586.

- Kume, T., Kawato, Y., Osakada, F., Izumi, Y., Katsuki, H., Nakagawa, T., Kaneko, S., Niidome, T., Takada-Takatori, Y., Akaike, A., 2008. Dibutyryl cyclic AMP induces differentiation of human neuroblastoma SH-SY5Y cells into a noradrenergic phenotype. *Neurosci Lett* 443, 199-203.
- Kuo, H.C., Hsieh, Y.C., Wang, H.M., Chuang, W.L., Huang, C.C., 2008. Correlation among subcortical white matter lesions, intelligence and CTG repeat expansion in classic myotonic dystrophy type 1. *Acta Neurol Scand* 117, 101-107.
- Kuyumcu-Martinez, N.M., Wang, G.S., Cooper, T.A., 2007. Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Mol Cell* 28, 68-78.
- LaBranche, H., Dupuis, S., Ben-David, Y., Bani, M.R., Wellinger, R.J., Chabot, B., 1998. Telomere elongation by hnRNP A1 and a derivative that interacts with telomeric repeats and telomerase. *Nat Genet* 19, 199-202.
- Ladd, A.N., Charlet-B, N., Cooper, T.A., 2001. The CELF family of RNA binding proteins is implicated in cell-specific and developmentally regulated alternative splicing. *Mol Cell Biol* 21, 1285-1296.
- Ladd, A.N., Cooper, T.A., 2002. Finding signals that regulate alternative splicing in the post-genomic era. *Genome Biol* 3, reviews0008.
- Ladd, A.N., Nguyen, N.H., Malhotra, K., Cooper, T.A., 2004. CELF6, a member of the CELF family of RNA-binding proteins, regulates muscle-specific splicing enhancer-dependent alternative splicing. *J Biol Chem* 279, 17756-17764.
- Ladd, A.N., Taffet, G., Hartley, C., Kearney, D.L., Cooper, T.A., 2005. Cardiac tissue-specific repression of CELF activity disrupts alternative splicing and causes cardiomyopathy. *Mol Cell Biol* 25, 6267-6278.
- Lavedan, C., Hofmann-Radvanyi, H., Shelbourne, P., Rabes, J.P., Duros, C., Savoy, D., Dehaupas, I., Luce, S., Johnson, K., Junien, C., 1993. Myotonic dystrophy: size- and sex-dependent dynamics of CTG meiotic instability, and somatic mosaicism. *Am J Hum Genet* 52, 875-883.
- Lear, A.L., Eperon, L.P., Wheatley, I.M., Eperon, I.C., 1990. Hierarchy for 5' splice site preference determined in vivo. *J Mol Biol* 211, 103-115.
- Lee, G., Newman, S.T., Gard, D.L., Band, H., Panchamoorthy, G., 1998. Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J Cell Sci* 111 (Pt 21), 3167-3177.
- Lefebvre, T., Ferreira, S., Dupont-Wallois, L., Bussiere, T., Dupire, M.J., Delacourte, A., Michalski, J.C., Caillet-Boudin, M.L., 2003. Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins--a role in nuclear localization. *Biochim Biophys Acta* 1619, 167-176.
- Leroy, O., Wang, J., Maurage, C.A., Parent, M., Cooper, T., Buee, L., Serageant, N., Andreadis, A., Caillet-Boudin, M.L., 2006a. Brain-specific change in alternative splicing of Tau exon 6 in myotonic dystrophy type 1. *Biochim Biophys Acta* 1762, 460-467.
- Leroy, O., Dhaenens, C.M., Schraen-Maschke, S., Belarbi, K., Delacourte, A., Andreadis, A., Sablonniere, B., Buee, L., Sergeant, N., Caillet-Boudin, M.L., 2006b. ETR-3 represses Tau exons 2/3 inclusion, a splicing event abnormally enhanced in myotonic dystrophy type I. *J Neurosci Res* 84, 852-859.
- Levers, T.E., Tait, S., Birling, M.C., Brophy, P.J., Price, D.J., 2002. Etr-r3/mNapor, encoding an ELAV-type RNA binding protein, is expressed in differentiating cells in the developing rodent forebrain. *Mech Dev* 112, 191-193.
- Lewis, H.A., Musunuru, K., Jensen, K.B., Edo, C., Chen, H., Darnell, R.B., Burley, S.K., 2000. Sequence-specific RNA binding by a Nova KH domain: implications for paraneoplastic disease and the fragile X syndrome. *Cell* 100, 323-332.

- Li, Q., Lee, J.A., Black, D.L., 2007. Neuronal regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Nat Rev Neurosci* 8, 819-831.
- Lia, A.S., Seznec, H., Hofmann-Radvanyi, H., Radvanyi, F., Duros, C., Saquet, C., Blanche, M., Junien, C., Gourdon, G., 1998. Somatic instability of the CTG repeat in mice transgenic for the myotonic dystrophy region is age dependent but not correlated to the relative intertissu transcription levels and proliferative capacities. *Hum Mol Genet* 7, 1285-1291.
- Lim, L.P., Sharp, P.A., 1998. Alternative splicing of the fibronectin EIIIB exon depends on specific TGCATG repeats. *Mol Cell Biol* 18, 3900-3906.
- Lin, C.H., Patton, J.G., 1995. Regulation of alternative 3' splice site selection by constitutive splicing factors. *Rna* 1, 234-245.
- Lin, X., Miller, J.W., Mankodi, A., Kanadia, R.N., Yuan, Y., Moxley, R.T., Swanson, M.S., Thornton, C.A., 2006. Failure of MBNL1-dependent post-natal splicing transitions in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 15, 2087-2097.
- Lin, S., Coutinho-Mansfield, G., Wang, D., Pandit, S., Fu, X.D., 2008. The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation. *Nat Struct Mol Biol* 15, 819-826.
- Liquori, C.L., Ricker, K., Moseley, M.L., Jacobsen, J.F., Kress, W., Naylor, S.L., Day, J.W., Ranum, L.P., 2001. Myotonic dystrophy type 2 caused by a CCTG expansion in intron 1 of ZNF9. *Science* 293, 864-867.
- Lisbin, M.J., Qiu, J., White, K., 2001. The neuron-specific RNA-binding protein ELAV regulates neuroglial alternative splicing in neurons and binds directly to its pre-mRNA. *Genes Dev* 15, 2546-2561.
- Liu, H.X., Zhang, M., Krainer, A.R., 1998. Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes Dev* 12, 1998-2012.
- Liu, H.X., Chew, S.L., Cartegni, L., Zhang, M.Q., Krainer, A.R., 2000. Exonic splicing enhancer motif recognized by human SC35 under splicing conditions. *Mol Cell Biol* 20, 1063-1071.
- Long, J.C., Caceres, J.F., 2009. The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem J* 417, 15-27.
- Lu, X., Timchenko, N.A., Timchenko, L.T., 1999. Cardiac elav-type RNA-binding protein (ETR-3) binds to RNA CUG repeats expanded in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 8, 53-60.
- Lueck, J.D., Lungu, C., Mankodi, A., Osborne, R.J., Welle, S.L., Dirksen, R.T., Thornton, C.A., 2007. Chloride channelopathy in myotonic dystrophy resulting from loss of posttranscriptional regulation for CLCN1. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C1291-1297.
- Luo, M.H., Tse, S.W., Memmott, J., Andreadis, A., 2004a. Novel isoforms of tau that lack the microtubule-binding domain. *J Neurochem* 90, 340-351.
- Luo, M.H., Leski, M.L., Andreadis, A., 2004b. Tau isoforms which contain the domain encoded by exon 6 and their role in neurite elongation. *J Cell Biochem* 91, 880-895.
- Machuca-Tzili, L., Brook, D., Hilton-Jones, D., 2005. Clinical and molecular aspects of the myotonic dystrophies: a review. *Muscle Nerve* 32, 1-18.
- Magnani, E., Fan, J., Gasparini, L., Golding, M., Williams, M., Schiavo, G., Goedert, M., Amos, L.A., Spillantini, M.G., 2007. Interaction of tau protein with the dynactin complex. *Embo J* 26, 4546-4554.

- Mahadevan, M., Tsilfidis, C., Sabourin, L., Shutler, G., Amemiya, C., Jansen, G., Neville, C., Narang, M., Barcelo, J., O'Hoy, K., et al., 1992. Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* 255, 1253-1255.
- Mahadevan, M.S., Amemiya, C., Jansen, G., Sabourin, L., Baird, S., Neville, C.E., Wormskamp, N., Segers, B., Batzer, M., Lamerdin, J., et al., 1993. Structure and genomic sequence of the myotonic dystrophy (DM kinase) gene. *Hum Mol Genet* 2, 299-304.
- Makeyev, E.V., Zhang, J., Carrasco, M.A., Maniatis, T., 2007. The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 27, 435-448.
- Mankodi, A., Logigian, E., Callahan, L., McClain, C., White, R., Henderson, D., Krym, M., Thornton, C.A., 2000. Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* 289, 1769-1773.
- Mankodi, A., Urbinati, C.R., Yuan, Q.P., Moxley, R.T., Sansone, V., Krym, M., Henderson, D., Schalling, M., Swanson, M.S., Thornton, C.A., 2001. Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Hum Mol Genet* 10, 2165-2170.
- Mankodi, A., Takahashi, M.P., Jiang, H., Beck, C.L., Bowers, W.J., Moxley, R.T., Cannon, S.C., Thornton, C.A., 2002. Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of ClC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol Cell* 10, 35-44.
- Mankodi, A., Teng-Umnuay, P., Krym, M., Henderson, D., Swanson, M., Thornton, C.A., 2003. Ribonuclear inclusions in skeletal muscle in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Ann Neurol* 54, 760-768.
- Mankodi, A., Lin, X., Blaxall, B.C., Swanson, M.S., Thornton, C.A., 2005. Nuclear RNA foci in the heart in myotonic dystrophy. *Circ Res* 97, 1152-1155.
- Margolis, J.M., Schoser, B.G., Moseley, M.L., Day, J.W., Ranum, L.P., 2006. DM2 intronic expansions: evidence for CCUG accumulation without flanking sequence or effects on ZNF9 mRNA processing or protein expression. *Hum Mol Genet* 15, 1808-1815.
- Markovtsov, V., Nikolic, J.M., Goldman, J.A., Turck, C.W., Chou, M.Y., Black, D.L., 2000. Cooperative assembly of an hnRNP complex induced by a tissue-specific homolog of polypyrimidine tract binding protein. *Mol Cell Biol* 20, 7463-7479.
- Maron, B.J., 2002. Hypertrophic cardiomyopathy: a systematic review. *Jama* 287, 1308-1320.
- Marquis, J., Paillard, L., Audic, Y., Cosson, B., Danos, O., Le Bec, C., Osborne, H.B., 2006. CUG-BP1/CELF1 requires UGU-rich sequences for high-affinity binding. *Biochem J* 400, 291-301.
- Martorell, L., Monckton, D.G., Gamez, J., Johnson, K.J., Gich, I., Lopez de Munain, A., Baiget, M., 1998. Progression of somatic CTG repeat length heterogeneity in the blood cells of myotonic dystrophy patients. *Hum Mol Genet* 7, 307-312.
- Martorell, L., Monckton, D.G., Gamez, J., Baiget, M., 2000. Complex patterns of male germline instability and somatic mosaicism in myotonic dystrophy type 1. *Eur J Hum Genet* 8, 423-430.
- Massiello, A., Salas, A., Pinkerman, R.L., Roddy, P., Roesser, J.R., Chalfant, C.E., 2004. Identification of two RNA cis-elements that function to regulate the 5' splice site selection of Bcl-x pre-mRNA in response to ceramide. *J Biol Chem* 279, 15799-15804.
- Matlin, A.J., Clark, F., Smith, C.W., 2005. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 386-398.

- Matter, N., Herrlich, P., Konig, H., 2002. Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. *Nature* 420, 691-695.
- Maurage, C.A., Udd, B., Ruchoux, M.M., Vermersch, .P, Kalimo, H., Krahe, R., Delacourte, A., Sergeant, N., 2005, Similar brain tau pathology in DM2/PROMM and DM1/Steinert disease, *Neurology* 65(10), 1636-8.
- Mavilia, C., Couchie, D., Nunez, J., 1994. Diversity of high-molecular-weight tau proteins in different regions of the nervous system. *J Neurochem* 63, 2300-2306.
- Mayeda, A., Krainer, A.R., 1992. Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell* 68, 365-375.
- Mayeda, A., Helfman, D.M., Krainer, A.R., 1993. Modulation of exon skipping and inclusion by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and pre-mRNA splicing factor SF2/ASF. *Mol Cell Biol* 13, 2993-3001.
- Mayeda, A., Munroe, S.H., Xu, R.M., Krainer, A.R., 1998. Distinct functions of the closely related tandem RNA-recognition motifs of hnRNP A1. *Rna* 4, 1111-1123.
- Mayeda, A., Sreaton, G.R., Chandler, S.D., Fu, X.D., Krainer, A.R., 1999. Substrate specificities of SR proteins in constitutive splicing are determined by their RNA recognition motifs and composite pre-mRNA exonic elements. *Mol Cell Biol* 19, 1853-1863.
- McAfee, J.G., Shahied-Milam, L., Soltaninassab, S.R., LeSturgeon, W.M., 1996. A major determinant of hnRNP C protein binding to RNA is a novel bZIP-like RNA binding domain. *Rna* 2, 1139-1152.
- McCracken, S., Fong, N., Rosonina, E., Yankulov, K., Brothers, G., Siderovski, D., Hessel, A., Foster, S., Shuman, S., Bentley, D.L., 1997a. 5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes Dev* 11, 3306-3318.
- McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S.D., Wickens, M., Bentley, D.L., 1997b. The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* 385, 357-361.
- McCullough, A.J., Berget, S.M., 1997. G triplets located throughout a class of small vertebrate introns enforce intron borders and regulate splice site selection. *Mol Cell Biol* 17, 4562-4571.
- Michlewski, G., Sanford, J.R., Caceres, J.F., 2008. The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1. *Mol Cell* 30, 179-189.
- Miller, J.W., Urbinati, C.R., Teng-Umnuay, P., Stenberg, M.G., Byrne, B.J., Thornton, C.A., Swanson, M.S., 2000. Recruitment of human muscleblind proteins to (CUG)(n) expansions associated with myotonic dystrophy. *Embo J* 19, 4439-4448.
- Miloso, M., Villa, D., Crimi, M., Galbiati, S., Donzelli, E., Nicolini, G., Tredici, G., 2004. Retinoic acid-induced neuritogenesis of human neuroblastoma SH-SY5Y cells is ERK independent and PKC dependent. *J Neurosci Res* 75, 241-252.
- Miyaso, H., Okumura, M., Kondo, S., Higashide, S., Miyajima, H., Imaizumi, K., 2003. An intronic splicing enhancer element in survival motor neuron (SMN) pre-mRNA. *J Biol Chem* 278, 15825-15831.
- Modafferi, E.F., Black, D.L., 1997. A complex intronic splicing enhancer from the c-src pre-mRNA activates inclusion of a heterologous exon. *Mol Cell Biol* 17, 6537-6545.
- Modoni, A., Silvestri, G., Pomponi, M.G., Mangiola, F., Tonali, P.A., Marra, C., 2004. Characterization of the pattern of cognitive impairment in myotonic dystrophy type 1. *Arch Neurol* 61, 1943-1947.
- Modoni, A., Silvestri, G., Vita, M.G., Quaranta, D., Tonali, P.A., Marra, C., 2008. Cognitive impairment in myotonic dystrophy type 1 (DM1): a longitudinal follow-up study. *J Neurol* 255, 1737-1742.

- Mori, D., Sasagawa, N., Kino, Y., Ishiura, S., 2008. Quantitative analysis of CUG-BP1 binding to RNA repeats. *J Biochem* 143, 377-383.
- Morris, D.P., Greenleaf, A.L., 2000. The splicing factor, Prp40, binds the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem* 275, 39935-39943.
- Mortillaro, M.J., Blencowe, B.J., Wei, X., Nakayasu, H., Du, L., Warren, S.L., Sharp, P.A., Berezney, R., 1996. A hyperphosphorylated form of the large subunit of RNA polymerase II is associated with splicing complexes and the nuclear matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8253-8257.
- Mukhopadhyay, D., Jung, J., Murmu, N., Houchen, C.W., Dieckgraefe, B.K., Anant, S., 2003. CUGBP2 plays a critical role in apoptosis of breast cancer cells in response to genotoxic injury. *Ann N Y Acad Sci* 1010, 504-509.
- Musunuru, K., 2003. Cell-specific RNA-binding proteins in human disease. *Trends Cardiovasc Med* 13, 188-195.
- Myers, A.J., Pittman, A.M., Zhao, A.S., Rohrer, K., Kaleem, M., Marlowe, L., Lees, A., Leung, D., McKeith, I.G., Perry, R.H., Morris, C.M., Trojanowski, J.Q., Clark, C., Karlawish, J., Arnold, S., Forman, M.S., Van Deerlin, V., de Silva, R., Hardy, J., 2007. The MAPT H1c risk haplotype is associated with increased expression of tau and especially of 4 repeat containing transcripts. *Neurobiol Dis* 25, 561-570.
- Nagel, R.J., Lancaster, A.M., Zahler, A.M., 1998. Specific binding of an exonic splicing enhancer by the pre-mRNA splicing factor SRp55. *Rna* 4, 11-23.
- Nasim, F.U., Hutchison, S., Cordeau, M., Chabot, B., 2002. High-affinity hnRNP A1 binding sites and duplex-forming inverted repeats have similar effects on 5' splice site selection in support of a common looping out and repression mechanism. *Rna* 8, 1078-1089.
- Nassar, R., Malouf, N.N., Kelly, M.B., Oakeley, A.E., Anderson, P.A., 1991. Force-pCa relation and troponin T isoforms of rabbit myocardium. *Circ Res* 69, 1470-1475.
- Neugebauer, K.M., Roth, M.B., 1997. Transcription units as RNA processing units. *Genes Dev* 11, 3279-3285.
- Neugebauer, K.M., 2002. On the importance of being co-transcriptional. *J Cell Sci* 115, 3865-3871.
- Neve, R.L., Harris, P., Kosik, K.S., Kurnit, D.M., Donlon, T.A., 1986. Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res* 387, 271-280.
- Novelli, G., Gennarelli, M., Zelano, G., Pizzuti, A., Fattorini, C., Caskey, C.T., Dallapiccola, B., 1993. Failure in detecting mRNA transcripts from the mutated allele in myotonic dystrophy muscle. *Biochem Mol Biol Int* 29, 291-297.
- Nunez, J., Fischer, I., 1997. Microtubule-associated proteins (MAPs) in the peripheral nervous system during development and regeneration. *J Mol Neurosci* 8, 207-222.
- Ogata, A., Terae, S., Fujita, M., Tashiro, K., 1998. Anterior temporal white matter lesions in myotonic dystrophy with intellectual impairment: an MRI and neuropathological study. *Neuroradiology* 40, 411-415.
- Ogut, O., Granzier, H., Jin, J.P., 1999. Acidic and basic troponin T isoforms in mature fast-twitch skeletal muscle and effect on contractility. *Am J Physiol* 276, C1162-1170.
- Ono, S., Takahashi, K., Jinnai, K., Kanda, F., Fukuoka, Y., Kurisaki, H., Mitake, S., Inagaki, T., Yamano, T., Nagao, K., 1998. Loss of serotonin-containing neurons in the raphe of patients with myotonic

- dystrophy: a quantitative immunohistochemical study and relation to hypersomnia. *Neurology* 50, 535-538.
- Orengo, J.P., Chambon, P., Metzger, D., Mosier, D.R., Snipes, G.J., Cooper, T.A., 2008. Expanded CTG repeats within the DMPK 3' UTR causes severe skeletal muscle wasting in an inducible mouse model for myotonic dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2646-2651.
- Osborne, R.J., Thornton, C.A., 2006. RNA-dominant diseases. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 2, R162-169.
- Osborne, R.J., Lin, X., Welle, S., Sobczak, K., O'Rourke, J.R., Swanson, M.S., Thornton, C.A., 2009. Transcriptional and post-transcriptional impact of toxic RNA in myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 18, 1471-1481.
- Ostareck, D.H., Ostareck-Lederer, A., Wilm, M., Thiele, B.J., Mann, M., Hentze, M.W., 1997. mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end. *Cell* 89, 597-606.
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D.H., Hentze, M.W., 1998. Cytoplasmic regulatory functions of the KH-domain proteins hnRNPs K and E1/E2. *Trends Biochem Sci* 23, 409-411.
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D.H., 2004. Control of mRNA translation and stability in haematopoietic cells: the function of hnRNPs K and E1/E2. *Biol Cell* 96, 407-411.
- Otten, A.D., Tapscott, S.J., 1995. Triplet repeat expansion in myotonic dystrophy alters the adjacent chromatin structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5465-5469.
- Pagani, F., Stuani, C., Zuccato, E., Kornblihtt, A.R., Baralle, F.E., 2003. Promoter architecture modulates CFTR exon 9 skipping. *J Biol Chem* 278, 1511-1517.
- Paillard, L., Osborne, H.B., 2003. East of EDEN was a poly(A) tail. *Biol Cell* 95, 211-219.
- Panaite, P.A., Gantelet, E., Kraftsik, R., Gourdon, G., Kuntzer, T., Barakat-Walter, I., 2008. Myotonic dystrophy transgenic mice exhibit pathologic abnormalities in diaphragm neuromuscular junctions and phrenic nerves. *J Neuropathol Exp Neurol* 67, 763-772.
- Panigrahi, G.B., Lau, R., Montgomery, S.E., Leonard, M.R., Pearson, C.E., 2005. Slipped (CTG)ⁿ(CAG)^m repeats can be correctly repaired, escape repair or undergo error-prone repair. *Nat Struct Mol Biol* 12, 654-662.
- Pascual, M., Vicente, M., Monferrer, L., Artero, R., 2006. The Muscleblind family of proteins: an emerging class of regulators of developmentally programmed alternative splicing. *Differentiation* 74, 65-80.
- Pastor, P., Ezquerra, M., Tolosa, E., Munoz, E., Marti, M.J., Valldeoriola, F., Molinuevo, J.L., Calopa, M., Oliva, R., 2002. Further extension of the H1 haplotype associated with progressive supranuclear palsy. *Mov Disord* 17, 550-556.
- Patel, N.A., Kaneko, S., Apostolatos, H.S., Bae, S.S., Watson, J.E., Davidowitz, K., Chappell, D.S., Birnbaum, M.J., Cheng, J.Q., Cooper, D.R., 2005. Molecular and genetic studies imply Akt-mediated signaling promotes protein kinase Cbeta11 alternative splicing via phosphorylation of serine/arginine-rich splicing factor SRp40. *J Biol Chem* 280, 14302-14309.
- Patterson, D.J., Yasuhara, K., Ruzzo, W.L., 2002. Pre-mRNA secondary structure prediction aids splice site prediction. *Pac Symp Biocomput*, 223-234.
- Paul, S., Dansithong, W., Kim, D., Rossi, J., Webster, N.J., Comai, L., Reddy, S., 2006. Interaction of muscleblind, CUG-BP1 and hnRNP H proteins in DM1-associated aberrant IR splicing. *Embo J* 25, 4271-4283.

- Pearson, C.E., Tam, M., Wang, Y.H., Montgomery, S.E., Dar, A.C., Cleary, J.D., Nichol, K., 2002. Slipped-strand DNAs formed by long (CAG)ⁿ(CTG) repeats: slipped-out repeats and slip-out junctions. *Nucleic Acids Res* 30, 4534-4547.
- Perez, I., McAfee, J.G., Patton, J.G., 1997. Multiple RRM domains contribute to RNA binding specificity and affinity for polypyrimidine tract binding protein. *Biochemistry* 36, 11881-11890.
- Pfarr, N., Prawitt, D., Kirschfink, M., Schroff, C., Knuf, M., Habermehl, P., Mannhardt, W., Zepp, F., Fairbrother, W.G., Loos, M., Burge, C.B., Pohlentz, J., 2005. Linking C5 deficiency to an exonic splicing enhancer mutation. *J Immunol* 174, 4172-4177.
- Philips, A.V., Timchenko, L.T., Cooper, T.A., 1998. Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* 280, 737-741.
- Pittman, A.M., Myers, A.J., Duckworth, J., Bryden, L., Hanson, M., Abou-Sleiman, P., Wood, N.W., Hardy, J., Lees, A., de Silva, R., 2004. The structure of the tau haplotype in controls and in progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet* 13, 1267-1274.
- Poorkaj, P., Bird, T.D., Wijsman, E., Nemens, E., Garruto, R.M., Anderson, L., Andreadis, A., Wiederholt, W.C., Raskind, M., Schellenberg, G.D., 1998. Tau is a candidate gene for chromosome 17 frontotemporal dementia. *Ann Neurol* 43, 815-825.
- Proudfoot, N.J., Furger, A., Dye, M.J., 2002. Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 108, 501-512.
- Puig, O., Gottschalk, A., Fabrizio, P., Seraphin, B., 1999. Interaction of the U1 snRNP with nonconserved intronic sequences affects 5' splice site selection. *Genes Dev* 13, 569-580.
- Ramchatesingh, J., Zahler, A.M., Neugebauer, K.M., Roth, M.B., Cooper, T.A., 1995. A subset of SR proteins activates splicing of the cardiac troponin T alternative exon by direct interactions with an exonic enhancer. *Mol Cell Biol* 15, 4898-4907.
- Ranum, L.P., Cooper, T.A., 2006. RNA-Mediated Neuromuscular Disorders. *Annu Rev Neurosci*.
- Rappsilber, J., Ryder, U., Lamond, A.I., Mann, M., 2002. Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res* 12, 1231-1245.
- Reddy, S., Smith, D.B., Rich, M.M., Lefterovich, J.M., Reilly, P., Davis, B.M., Tran, K., Rayburn, H., Bronson, R., Cros, D., Balice-Gordon, R.J., Housman, D., 1996. Mice lacking the myotonic dystrophy protein kinase develop a late onset progressive myopathy. *Nat Genet* 13, 325-335.
- Reed, R., 1996. Initial splice-site recognition and pairing during pre-mRNA splicing. *Curr Opin Genet Dev* 6, 215-220.
- Reed, R., 2000. Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. *Curr Opin Cell Biol* 12, 340-345.
- Reiser, P.J., Greaser, M.L., Moss, R.L., 1992. Developmental changes in troponin T isoform expression and tension production in chicken single skeletal muscle fibres. *J Physiol* 449, 573-588.
- Rizzu, P., Van Swieten, J.C., Joosse, M., Hasegawa, M., Stevens, M., Tibben, A., Niermeijer, M.F., Hillebrand, M., Ravid, R., Oostra, B.A., Goedert, M., van Duijn, C.M., Heutink, P., 1999. High prevalence of mutations in the microtubule-associated protein tau in a population study of frontotemporal dementia in the Netherlands. *Am J Hum Genet* 64, 414-421.
- Robberson, B.L., Cote, G.J., Berget, S.M., 1990. Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons. *Mol Cell Biol* 10, 84-94.
- Roberts, R., Timchenko, N.A., Miller, J.W., Reddy, S., Caskey, C.T., Swanson, M.S., Timchenko, L.T., 1997. Altered phosphorylation and intracellular distribution of a (CUG)ⁿ triplet repeat RNA-

- binding protein in patients with myotonic dystrophy and in myotonin protein kinase knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13221-13226.
- Robson-Dixon, N.D., Garcia-Blanco, M.A., 2004. MAZ elements alter transcription elongation and silencing of the fibroblast growth factor receptor 2 exon IIIb. *J Biol Chem* 279, 29075-29084.
- Ros, R., Thobois, S., Streichenberger, N., Kopp, N., Sanchez, M.P., Perez, M., Hoenicka, J., Avila, J., Honnorat, J., de Yébenes, J.G., 2005. A new mutation of the tau gene, G303V, in early-onset familial progressive supranuclear palsy. *Arch Neurol* 62, 1444-1450.
- Rubinsztein, J.S., Rubinsztein, D.C., McKenna, P.J., Goodburn, S., Holland, A.J., 1997. Mild myotonic dystrophy is associated with memory impairment in the context of normal general intelligence. *J Med Genet* 34, 229-233.
- Ryan, K.J., Cooper, T.A., 1996. Muscle-specific splicing enhancers regulate inclusion of the cardiac troponin T alternative exon in embryonic skeletal muscle. *Mol Cell Biol* 16, 4014-4023.
- Sacco-Bubulya, P., Spector, D.L., 2002. Disassembly of interchromatin granule clusters alters the coordination of transcription and pre-mRNA splicing. *J Cell Biol* 156, 425-436.
- Sadot, E., Hecklen-Klein, A., Barg, J., Lazarovici, P., Ginzburg, I., 1996. Identification of a tau promoter region mediating tissue-specific-regulated expression in PC12 cells. *J Mol Biol* 256, 805-812.
- Sanchez, S., Jimenez, C., Carrera, A.C., Diaz-Nido, J., Avila, J., Wandosell, F., 2004. A cAMP-activated pathway, including PKA and PI3K, regulates neuronal differentiation. *Neurochem Int* 44, 231-242.
- Sanford, J.R., Bruzik, J.P., 2001. Regulation of SR protein localization during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10184-10189.
- Sanford, J.R., Gray, N.K., Beckmann, K., Caceres, J.F., 2004. A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation. *Genes Dev* 18, 755-768.
- Sarkar, P.S., Chang, H.C., Boudi, F.B., Reddy, S., 1998. CTG repeats show bimodal amplification in *E. coli*. *Cell* 95, 531-540.
- Sarkar, P.S., Han, J., Reddy, S., 2004. In situ hybridization analysis of DMPK mRNA in adult mouse tissues. *Neuromuscul Disord* 14, 497-506.
- Savkur, R.S., Philips, A.V., Cooper, T.A., 2001. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet* 29, 40-47.
- Savkur, R.S., Philips, A.V., Cooper, T.A., Dalton, J.C., Moseley, M.L., Ranum, L.P., Day, J.W., 2004. Insulin receptor splicing alteration in myotonic dystrophy type 2. *Am J Hum Genet* 74, 1309-1313.
- Savouret, C., Garcia-Cordier, C., Megret, J., te Riele, H., Junien, C., Gourdon, G., 2004. MSH2-dependent germinal CTG repeat expansions are produced continuously in spermatogonia from DM1 transgenic mice. *Mol Cell Biol* 24, 629-637.
- Schaal, T.D., Maniatis, T., 1999. Selection and characterization of pre-mRNA splicing enhancers: identification of novel SR protein-specific enhancer sequences. *Mol Cell Biol* 19, 1705-1719.
- Schwerk, C., Schulze-Osthoff, K., 2005. Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol* 25, 1-13.
- Sergeant, N., Sablonniere, B., Schraen-Maschke, S., Ghestem, A., Muraige, C.A., Wattez, A., Vermersch, P., Delacourte, A., 2001. Dysregulation of human brain microtubule-associated tau mRNA maturation in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 10, 2143-2155.

- Sergeant N, Delacourte A, Buée L., 2005. Tau protein as a differential biomarker of taupathies. *Biochim Biophys Acta.* 1739(2-3), 179-97.
- Seznec, H., Lia-Baldini, A.S., Duros, C., Fouquet, C., Lacroix, C., Hofmann-Radvanyi, H., Junien, C., Gourdon, G., 2000. Transgenic mice carrying large human genomic sequences with expanded CTG repeat mimic closely the DM CTG repeat intergenerational and somatic instability. *Hum Mol Genet* 9, 1185-1194.
- Shahied-Milam, L., Soltaninassab, S.R., Iyer, G.V., LeSturgeon, W.M., 1998. The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C protein tetramer binds U1, U2, and U6 snRNAs through its high affinity RNA binding domain (the bZIP-like motif). *J Biol Chem* 273, 21359-21367.
- Shaw, D.J., Meredith, A.L., Sarfarazi, M., Huson, S.M., Brook, J.D., Myklebost, O., Harper, P.S., 1985. The apolipoprotein CII gene: subchromosomal localisation and linkage to the myotonic dystrophy locus. *Hum Genet* 70, 271-273.
- Shaw, D.J., McCurrach, M., Rundle, S.A., Harley, H.G., Crow, S.R., Sohn, R., Thirion, J.P., Hamshere, M.G., Buckler, A.J., Harper, P.S., et al., 1993. Genomic organization and transcriptional units at the myotonic dystrophy locus. *Genomics* 18, 673-679.
- Shen, L.X., Babilion, J.P., Stanton, V.P., Jr., 1999. Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7871-7876.
- Shi, H., Hoffman, B.E., Lis, J.T., 1997. A specific RNA hairpin loop structure binds the RNA recognition motifs of the *Drosophila* SR protein B52. *Mol Cell Biol* 17, 2649-2657.
- Shin, C., Manley, J.L., 2002. The SR protein SRp38 represses splicing in M phase cells. *Cell* 111, 407-417.
- Shin, C., Manley, J.L., 2004. Cell signalling and the control of pre-mRNA splicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 727-738.
- Sierakowska, H., Szer, W., Furdon, P.J., Kole, R., 1986. Antibodies to hnRNP core proteins inhibit in vitro splicing of human beta-globin pre-mRNA. *Nucleic Acids Res* 14, 5241-5254.
- Singh, R., Valcarcel, J., Green, M.R., 1995. Distinct binding specificities and functions of higher eukaryotic polypyrimidine tract-binding proteins. *Science* 268, 1173-1176.
- Singh, G., Charlet-B, B.N., Han, J., Cooper, T.A., 2004. ETR-3 and CELF4 protein domains required for RNA binding and splicing activity in vivo. *Nucleic Acids Res* 32, 1232-1241.
- Sironi, M., Menozzi, G., Riva, L., Cagliani, R., Comi, G.P., Bresolin, N., Giorda, R., Pozzoli, U., 2004. Silencer elements as possible inhibitors of pseudoexon splicing. *Nucleic Acids Res* 32, 1783-1791.
- Solaro, R.J., Van Eyk, J., 1996. Altered interactions among thin filament proteins modulate cardiac function. *J Mol Cell Cardiol* 28, 217-230.
- Soller, M., White, K., 2003. ELAV inhibits 3'-end processing to promote neural splicing of ewg pre-mRNA. *Genes Dev* 17, 2526-2538.
- Solnick, D., 1985. Alternative splicing caused by RNA secondary structure. *Cell* 43, 667-676.
- Soltaninassab, S.R., McAfee, J.G., Shahied-Milam, L., LeSturgeon, W.M., 1998. Oligonucleotide binding specificities of the hnRNP C protein tetramer. *Nucleic Acids Res* 26, 3410-3417.
- Sorek, R., Lev-Maor, G., Reznik, M., Dagan, T., Belinky, F., Graur, D., Ast, G., 2004. Minimal conditions for exonization of intronic sequences: 5' splice site formation in alu exons. *Mol Cell* 14, 221-231.
- Southby, J., Gooding, C., Smith, C.W., 1999. Polypyrimidine tract binding protein functions as a repressor to regulate alternative splicing of alpha-actinin mutually exclusive exons. *Mol Cell Biol* 19, 2699-2711.

- Spillantini, M.G., Crowther, R.A., Kamphorst, W., Heutink, P., van Swieten, J.C., 1998. Tau pathology in two Dutch families with mutations in the microtubule-binding region of tau. *Am J Pathol* 153, 1359-1363.
- Squillace, R.M., Chenault, D.M., Wang, E.H., 2002. Inhibition of muscle differentiation by the novel muscleblind-related protein CHCR. *Dev Biol* 250, 218-230.
- Staknis, D., Reed, R., 1994. SR proteins promote the first specific recognition of Pre-mRNA and are present together with the U1 small nuclear ribonucleoprotein particle in a general splicing enhancer complex. *Mol Cell Biol* 14, 7670-7682.
- Stamm, S., Zhang, M.Q., Marr, T.G., Helfman, D.M., 1994. A sequence compilation and comparison of exons that are alternatively spliced in neurons. *Nucleic Acids Res* 22, 1515-1526.
- Stanford, P.M., Halliday, G.M., Brooks, W.S., Kwok, J.B., Storey, C.E., Creasey, H., Morris, J.G., Fulham, M.J., Schofield, P.R., 2000. Progressive supranuclear palsy pathology caused by a novel silent mutation in exon 10 of the tau gene: expansion of the disease phenotype caused by tau gene mutations. *Brain* 123 (Pt 5), 880-893.
- Stark, J.M., Bazett-Jones, D.P., Herfort, M., Roth, M.B., 1998. SR proteins are sufficient for exon bridging across an intron. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2163-2168.
- Sterner, D.A., Berget, S.M., 1993. In vivo recognition of a vertebrate mini-exon as an exon-intron-exon unit. *Mol Cell Biol* 13, 2677-2687.
- Stickeler, E., Fraser, S.D., Honig, A., Chen, A.L., Berget, S.M., Cooper, T.A., 2001. The RNA binding protein YB-1 binds A/C-rich exon enhancers and stimulates splicing of the CD44 alternative exon v4. *Embo J* 20, 3821-3830.
- Stoss, O., Olbrich, M., Hartmann, A.M., Konig, H., Memmott, J., Andreadis, A., Stamm, S., 2001. The STAR/GSG family protein rSLM-2 regulates the selection of alternative splice sites. *J Biol Chem* 276, 8665-8673.
- Sureau, A., Gattoni, R., Dooghe, Y., Stevenin, J., Soret, J., 2001. SC35 autoregulates its expression by promoting splicing events that destabilize its mRNAs. *Embo J* 20, 1785-1796.
- Swartz, J.E., Bor, Y.C., Misawa, Y., Rekosh, D., Hammarskjold, M.L., 2007. The shuttling SR protein 9G8 plays a role in translation of unspliced mRNA containing a constitutive transport element. *J Biol Chem* 282, 19844-19853.
- Tacke, R., Manley, J.L., 1995. The human splicing factors ASF/SF2 and SC35 possess distinct, functionally significant RNA binding specificities. *Embo J* 14, 3540-3551.
- Takahashi, N., Sasagawa, N., Suzuki, K., Ishiura, S., 2000. The CUG-binding protein binds specifically to UG dinucleotide repeats in a yeast three-hybrid system. *Biochem Biophys Res Commun* 277, 518-523.
- Taneja, K.L., McCurrach, M., Schalling, M., Housman, D., Singer, R.H., 1995. Foci of trinucleotide repeat transcripts in nuclei of myotonic dystrophy cells and tissues. *J Cell Biol* 128, 995-1002.
- Teplova, M., Patel, D.J., 2008. Structural insights into RNA recognition by the alternative-splicing regulator muscleblind-like MBNL1. *Nat Struct Mol Biol* 15, 1343-1351.
- Thierfelder, L., Watkins, H., MacRae, C., Lamas, R., McKenna, W., Vosberg, H.P., Seidman, J.G., Seidman, C.E., 1994. Alpha-tropomyosin and cardiac troponin T mutations cause familial hypertrophic cardiomyopathy: a disease of the sarcomere. *Cell* 77, 701-712.

- Thornton, C.A., Wymer, J.P., Simmons, Z., McClain, C., Moxley, R.T., 3rd, 1997. Expansion of the myotonic dystrophy CTG repeat reduces expression of the flanking DMAHP gene. *Nat Genet* 16, 407-409.
- Timchenko, L.T., Miller, J.W., Timchenko, N.A., DeVore, D.R., Datar, K.V., Lin, L., Roberts, R., Caskey, C.T., Swanson, M.S., 1996a. Identification of a (CUG)_n triplet repeat RNA-binding protein and its expression in myotonic dystrophy. *Nucleic Acids Res* 24, 4407-4414.
- Timchenko, L.T., Timchenko, N.A., Caskey, C.T., Roberts, R., 1996b. Novel proteins with binding specificity for DNA CTG repeats and RNA CUG repeats: implications for myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet* 5, 115-121.
- Timchenko, N.A., Welm, A.L., Lu, X., Timchenko, L.T., 1999. CUG repeat binding protein (CUGBP1) interacts with the 5' region of C/EBPβ mRNA and regulates translation of C/EBPβ isoforms. *Nucleic Acids Res* 27, 4517-4525.
- Timchenko, N.A., Cai, Z.J., Welm, A.L., Reddy, S., Ashizawa, T., Timchenko, L.T., 2001. RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. *J Biol Chem* 276, 7820-7826.
- Timchenko, N.A., Patel, R., Iakova, P., Cai, Z.J., Quan, L., Timchenko, L.T., 2004. Overexpression of CUG triplet repeat-binding protein, CUGBP1, in mice inhibits myogenesis. *J Biol Chem* 279, 13129-13139.
- Tome, S., Holt, I., Edelman, W., Morris, G.E., Munnich, A., Pearson, C.E., Gourdon, G., 2009. MSH2 ATPase domain mutation affects CTG*CAG repeat instability in transgenic mice. *PLoS Genet* 5, e1000482.
- Townsend, P.J., Barton, P.J., Yacoub, M.H., Farza, H., 1995. Molecular cloning of human cardiac troponin T isoforms: expression in developing and failing heart. *J Mol Cell Cardiol* 27, 2223-2236.
- Tsilfidis, C., MacKenzie, A.E., Mettler, G., Barcelo, J., Korneluk, R.G., 1992. Correlation between CTG trinucleotide repeat length and frequency of severe congenital myotonic dystrophy. *Nat Genet* 1, 192-195.
- Ule, J., Stefani, G., Mele, A., Ruggiu, M., Wang, X., Taneri, B., Gaasterland, T., Blencowe, B.J., Darnell, R.B., 2006. An RNA map predicting Nova-dependent splicing regulation. *Nature* 444, 580-586.
- Vagner, S., Vagner, C., Mattaj, I.W., 2000. The carboxyl terminus of vertebrate poly(A) polymerase interacts with U2AF 65 to couple 3'-end processing and splicing. *Genes Dev* 14, 403-413.
- Valcarcel, J., Gaur, R.K., Singh, R., Green, M.R., 1996. Interaction of U2AF65 RS region with pre-mRNA branch point and promotion of base pairing with U2 snRNA [corrected]. *Science* 273, 1706-1709.
- van den Broek, W.J., Wansink, D.G., Wieringa, B., 2007. Somatic CTG*CAG repeat instability in a mouse model for myotonic dystrophy type 1 is associated with changes in cell nuclearity and DNA ploidy. *BMC Mol Biol* 8, 61.
- Varani, L., Hasegawa, M., Spillantini, M.G., Smith, M.J., Murrell, J.R., Ghetti, B., Klug, A., Goedert, M., Varani, G., 1999. Structure of tau exon 10 splicing regulatory element RNA and destabilization by mutations of frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8229-8234.
- Vermerch, P., Sergeant, N., Ruchoux, M.M., Hofmann-Radvanyi, H., Watzet, A., Petit, H., Dwailly, P., Delacourte, A., 1996. Specific tau variants in the brains of patients with myotonic dystrophy. *Neurology*, 47, 711-717.
- Vincent, M., Lauriault, P., Dubois, M.F., Lavoie, S., Bensaude, O., Chabot, B., 1996. The nuclear matrix protein p255 is a highly phosphorylated form of RNA polymerase II largest subunit which associates with spliceosomes. *Nucleic Acids Res* 24, 4649-4652.

- Vinereanu, D., Bajaj, B.P., Fenton-May, J., Rogers, M.T., Madler, C.F., Fraser, A.G., 2004. Subclinical cardiac involvement in myotonic dystrophy manifesting as decreased myocardial Doppler velocities. *Neuromuscul Disord* 14, 188-194.
- Vlasova, I.A., Bohjanen, P.R., 2008. Posttranscriptional regulation of gene networks by GU-rich elements and CELF proteins. *RNA Biol* 5, 201-207.
- Vlasova, I.A., Tahoe, N.M., Fan, D., Larsson, O., Rattenbacher, B., Sternjohn, J.R., Vasdewani, J., Karypis, G., Reilly, C.S., Bitterman, P.B., Bohjanen, P.R., 2008. Conserved GU-rich elements mediate mRNA decay by binding to CUG-binding protein 1. *Mol Cell* 29, 263-270.
- Wagner, E.J., Garcia-Blanco, M.A., 2001. Polypyrimidine tract binding protein antagonizes exon definition. *Mol Cell Biol* 21, 3281-3288.
- Wagner, E.J., Garcia-Blanco, M.A., 2002. RNAi-mediated PTB depletion leads to enhanced exon definition. *Mol Cell* 10, 943-949.
- Wahl, M.C., Will, C.L., Luhrmann, R., 2009. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136, 701-718.
- Wakamatsu, Y., Weston, J.A., 1997. Sequential expression and role of Hu RNA-binding proteins during neurogenesis. *Development* 124, 3449-3460.
- Wang, J., Pegoraro, E., Menegazzo, E., Gennarelli, M., Hoop, R.C., Angelini, C., Hoffman, E.P., 1995a. Myotonic dystrophy: evidence for a possible dominant-negative RNA mutation. *Hum Mol Genet* 4, 599-606.
- Wang, Y.H., Griffith, J., 1995b. Expanded CTG triplet blocks from the myotonic dystrophy gene create the strongest known natural nucleosome positioning elements. *Genomics* 25, 570-573.
- Wang, H.Y., Lin, W., Dyck, J.A., Yeakley, J.M., Songyang, Z., Cantley, L.C., Fu, X.D., 1998. SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells. *J Cell Biol* 140, 737-750.
- Wang, J., Gao, Q.S., Wang, Y., Lafyatis, R., Stamm, S., Andreadis, A., 2004. Tau exon 10, whose missplicing causes frontotemporal dementia, is regulated by an intricate interplay of cis elements and trans factors. *J Neurochem* 88, 1078-1090.
- Wang, Y., Wang, J., Gao, L., Lafyatis, R., Stamm, S., Andreadis, A., 2005. Tau exons 2 and 10, which are misregulated in neurodegenerative diseases, are partly regulated by silencers which bind a SRp30c.SRp55 complex that either recruits or antagonizes htra2beta1. *J Biol Chem* 280, 14230-14239.
- Wang, J., Tse, S.W., Andreadis, A., 2007a. Tau exon 6 is regulated by an intricate interplay of trans factors and cis elements, including multiple branch points. *J Neurochem* 100, 437-445.
- Wang, G.S., Kearney, D.L., De Biasi, M., Taffet, G., Cooper, T.A., 2007b. Elevation of RNA-binding protein CUGBP1 is an early event in an inducible heart-specific mouse model of myotonic dystrophy. *J Clin Invest* 117, 2802-2811.
- Wang, L.C., Hung, W.T., Pan, H., Chen, K.Y., Wu, Y.C., Liu, Y.F., Hsiao, K.M., 2008. Growth-dependent effect of muscleblind knockdown on *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* 366, 705-709.
- Warf, M.B., Berglund, J.A., 2007. MBNL binds similar RNA structures in the CUG repeats of myotonic dystrophy and its pre-mRNA substrate cardiac troponin T. *Rna* 13, 2238-2251.
- Warf, M.B., Diegel, J.V., von Hippel, P.H., Berglund, J.A., 2009. The protein factors MBNL1 and U2AF65 bind alternative RNA structures to regulate splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 9203-9208.

- Wei, M.L., Andreadis, A., 1998. Splicing of a regulated exon reveals additional complexity in the axonal microtubule-associated protein tau. *J Neurochem* 70, 1346-1356.
- Wei, M.L., Memmott, J., Screaton, G., Andreadis, A., 2000. The splicing determinants of a regulated exon in the axonal MAP tau reside within the exon and in its upstream intron. *Brain Res Mol Brain Res* 80, 207-218.
- Weir, M., Rice, M., 2004. Ordered partitioning reveals extended splice-site consensus information. *Genome Res* 14, 67-78.
- Westerlaken, J.H., Van der Zee, C.E., Peters, W., Wieringa, B., 2003. The DMWD protein from the myotonic dystrophy (DM1) gene region is developmentally regulated and is present most prominently in synapse-dense brain areas. *Brain Res* 971, 116-127.
- Wheeler, T.M., Krym, M.C., Thornton, C.A., 2007. Ribonuclear foci at the neuromuscular junction in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscul Disord* 17, 242-247.
- White, S.P., Cohen, C., Phillips, G.N., Jr., 1987. Structure of co-crystals of tropomyosin and troponin. *Nature* 325, 826-828.
- Whitehead, A.S., Solomon, E., Chambers, S., Bodmer, W.F., Povey, S., Fey, G., 1982. Assignment of the structural gene for the third component of human complement to chromosome 19. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 5021-5025.
- Williamson, R., Scales, T., Clark, B.R., Gibb, G., Reynolds, C.H., Kellie, S., Bird, I.N., Varndell, I.M., Sheppard, P.W., Everall, I., Anderton, B.H., 2002. Rapid tyrosine phosphorylation of neuronal proteins including tau and focal adhesion kinase in response to amyloid-beta peptide exposure: involvement of Src family protein kinases. *J Neurosci* 22, 10-20.
- Wischik, C.M., Novak, M., Edwards, P.C., Klug, A., Tichelaar, W., Crowther, R.A., 1988. Structural characterization of the core of the paired helical filament of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 4884-4888.
- Wong, L.J., Ashizawa, T., Monckton, D.G., Caskey, C.T., Richards, C.S., 1995. Somatic heterogeneity of the CTG repeat in myotonic dystrophy is age and size dependent. *Am J Hum Genet* 56, 114-122.
- Wu, J.Y., Maniatis, T., 1993. Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell* 75, 1061-1070.
- Xiao, S.H., Manley, J.L., 1998. Phosphorylation-dephosphorylation differentially affects activities of splicing factor ASF/SF2. *Embo J* 17, 6359-6367.
- Yadava, R.S., Frenzel-McCardell, C.D., Yu, Q., Srinivasan, V., Tucker, A.L., Puymirat, J., Thornton, C.A., Prall, O.W., Harvey, R.P., Mahadevan, M.S., 2008. RNA toxicity in myotonic muscular dystrophy induces NKX2-5 expression. *Nat Genet* 40, 61-68.
- Yang, X., Bani, M.R., Lu, S.J., Rowan, S., Ben-David, Y., Chabot, B., 1994. The A1 and A1B proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins modulate 5' splice site selection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6924-6928.
- Yasojima, K., McGeer, E.G., McGeer, P.L., 1999. Tangled areas of Alzheimer brain have upregulated levels of exon 10 containing tau mRNA. *Brain Res* 831, 301-305.
- Yeakley, J.M., Tronchere, H., Olesen, J., Dyck, J.A., Wang, H.Y., Fu, X.D., 1999. Phosphorylation regulates in vivo interaction and molecular targeting of serine/arginine-rich pre-mRNA splicing factors. *J Cell Biol* 145, 447-455.
- Yoshida, H., Crowther, R.A., Goedert, M., 2002. Functional effects of tau gene mutations deltaN296 and N296H. *J Neurochem* 80, 548-551.

- Yuan, Y., Compton, S.A., Sobczak, K., Stenberg, M.G., Thornton, C.A., Griffith, J.D., Swanson, M.S., 2007. Muscleblind-like 1 interacts with RNA hairpins in splicing target and pathogenic RNAs. *Nucleic Acids Res* 35, 5474-5486.
- Zahler, A.M., Lane, W.S., Stolk, J.A., Roth, M.B., 1992. SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes Dev* 6, 837-847.
- Zeesman, S., Carson, N., Whelan, D.T., 2002. Paternal transmission of the congenital form of myotonic dystrophy type 1: a new case and review of the literature. *Am J Med Genet* 107, 222-226.
- Zhang, W.J., Wu, J.Y., 1996. Functional properties of p54, a novel SR protein active in constitutive and alternative splicing. *Mol Cell Biol* 16, 5400-5408.
- Zhang, D., Rosbash, M., 1999. Identification of eight proteins that cross-link to pre-mRNA in the yeast commitment complex. *Genes Dev* 13, 581-592.
- Zhang, W., Liu, H., Han, K., Grabowski, P.J., 2002. Region-specific alternative splicing in the nervous system: implications for regulation by the RNA-binding protein NAPOR. *Rna* 8, 671-685.
- Zhang, Z., Krainer, A.R., 2004. Involvement of SR proteins in mRNA surveillance. *Mol Cell* 16, 597-607.
- Zhang, C., Zhang, Z., Castle, J., Sun, S., Johnson, J., Krainer, A.R., Zhang, M.Q., 2008. Defining the regulatory network of the tissue-specific splicing factors Fox-1 and Fox-2. *Genes Dev* 22, 2550-2563.
- Zheng, Z.M., 2004. Regulation of alternative RNA splicing by exon definition and exon sequences in viral and mammalian gene expression. *J Biomed Sci* 11, 278-294.
- Zhou, Z., Licklider, L.J., Gygi, S.P., Reed, R., 2002. Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* 419, 182-185.
- Zhu, J., Mayeda, A., Krainer, A.R., 2001. Exon identity established through differential antagonism between exonic splicing silencer-bound hnRNP A1 and enhancer-bound SR proteins. *Mol Cell* 8, 1351-1361.
- Zhu, H., Hasman, R.A., Barron, V.A., Luo, G., Lou, H., 2006. A nuclear function of Hu proteins as neuron-specific alternative RNA processing regulators. *Mol Biol Cell* 17, 5105-5114.
- Zu, K., Sikes, M.L., Beyer, A.L., 1998. Separable roles in vivo for the two RNA binding domains of *Drosophila* A1-hnRNP homolog. *Rna* 4, 1585-1598.
- Zukin, R.S., Bennett, M.V., 1995. Alternatively spliced isoforms of the NMDAR1 receptor subunit. *Trends Neurosci* 18, 306-313.
- Zuo, P., Manley, J.L., 1994. The human splicing factor ASF/SF2 can specifically recognize pre-mRNA 5' splice sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3363-3367.

