



HAL
open science

Rôle des ARN hélicases Ddx5 et Ddx17 dans la progression tumorale

Étienne Dardenne

► **To cite this version:**

Étienne Dardenne. Rôle des ARN hélicases Ddx5 et Ddx17 dans la progression tumorale. Biologie moléculaire. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10048 . tel-01198928

HAL Id: tel-01198928

<https://theses.hal.science/tel-01198928>

Submitted on 14 Sep 2015

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.

N° Ordre : **48 - 2014**

Année : 2014

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE BMIC

DIPLOME DE DOCTORAT

(Arrêté du 7 Août 2006)

Soutenue publiquement le 31 mars 2014

Par

Etienne Dardenne

TITRE :

Rôle des ARN hélicases Ddx5 et Ddx17 dans la progression tumorale

JURY :

Dr Julian Venables

Dr Laurent Corcos

Dr Reini Luco

Pr Germain Gillet

Dr Didier Auboeuf

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. PARROT

Département GEP

Directeur : M. N. SIAUVE

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : Mme S. FLECK

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme la Professeure I. DANIEL

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. COLLIGNON

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. C. VITON

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Administrateur provisoire : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres qui composent mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse : le Dr. Julian Venables et le Dr Laurent Corcos qui, en leur qualité de rapporteurs, ont donné de leur temps pour lire et porter un regard critique sur mon manuscrit. Je remercie également le Dr Reini Luco pour l'examen de mon travail ainsi que le Pr. Germain Gillet qui a accepté de présider ce jury de thèse.

Ma gratitude va également à Ruth Rimokh et Stéphane Vagner, qui tout au long de ces années, à travers le comité de suivi de thèse, ont suivi mon travail.

Mes remerciements les plus chaleureux s'adressent également à mon directeur de thèse, Didier Auboeuf, qui a dirigé cette thèse dans la continuité de mes travaux de master. Sa disponibilité, la confiance et ses encouragements durant ces six années (master et thèse) ont été essentiels dans l'aboutissement de mes recherches et l'acquisition d'une certaine maturité.

Ma reconnaissance s'adresse aussi à Cyril pour l'aide qu'il m'a toujours accordée dans mes recherches, pour ses remarques et ses conseils et sa relecture attentive du manuscrit.

Le CRCL a été un lieu très enrichissant pour réaliser cette thèse et je pense à toutes les interactions et les discussions que j'ai eues avec tous les membres des équipes du département. Une pensée affectueuse à tous les membres de l'équipe, ceux qui nous ont rejoints récemment (Hussein, Pierre, Emilie, Léo, Fatima, Clara, FO, Amandine, Marie-Pierre, Mathieu, Helen, Camille, Manon) et les « anciens » Simon, Eléonora, Sophie, Martin, Lise, Micaela, Jean-Philippe, avec qui j'ai partagé l'époque parisienne puis l'aventure lyonnaise. Cette thèse doit beaucoup aux échanges, fructueux et parfois vifs, que nous avons eus au cours de toutes ces années. J'adresse des remerciements spéciaux à Simon et Micaela qui ont été mes compagnons de thèse et qui ont toujours eu une oreille attentive !

Ces remerciements n'auraient pas de sens si je ne mentionnais ceux qui ont contribué à faire de ces quatre années un moment inoubliable. Je pense particulièrement à Thibaut, Gab, Chloé, Laurent F., Mathieu, Anne-Laure, Laurent J., Marion, Paul, Clément, et tous les autres...

Mes remerciements s'adressent enfin à ma famille et à Julie qui ont toujours manifesté leur enthousiasme pour mon travail et m'ont apporté un soutien indéfectible.

Ce travail n'aurait pu être mené sans l'aide de la Ligue Nationale contre le Cancer qui m'a apporté l'aide matérielle pour m'engager dans la thèse.

Résumé

La progression tumorale, qui conduit à la formation de métastases, est le résultat de profondes modifications des différents niveaux de régulation de l'expression des gènes comme la transcription ou l'épissage alternatif.

Au cours de ma thèse, j'ai étudié le rôle de DDX5 et DDX17, deux ARN hélicases qui, au cours de la progression tumorale, sont impliquées dans la régulation transcriptionnelle l'épissage alternatif, et la biogénèse des microARNs. Pour cela, j'ai utilisé deux modèles de progression tumorale : le modèle murin 4T1, composé de cellules cancéreuses qui présentent des propriétés métastatiques différentes, et les cellules humaines MCF10A qui, après traitement au TGF- β , sont capables de réaliser la transition épithélio-mésenchymateuse, un processus de trans-différenciation qui contribue à la formation de métastases.

Dans le modèle 4T1, j'ai montré que Ddx17 et Ddx5 contribuent à l'invasivité des cellules tumorales en contrôlant des programmes transcriptionnels et d'épissage alternatif. Plus précisément, j'ai démontré que Ddx5 et Ddx17 favorisent l'agressivité des cellules cancéreuses en régulant l'épissage des variants de l'histone macroH2A1 qui, à leur tour, contrôlent l'expression de gènes impliqués dans la progression tumorale.

Dans le modèle MCF10A où la transition épithélio-mésenchymateuse peut être induite sous TGF- β , j'ai montré que DDX5 et DDX17 orchestrent dynamiquement des programmes transcriptionnels et d'épissage. DDX5 et DDX17 contrôlent un programme transcriptionnel spécifique de la différenciation en agissant comme corégulateurs transcriptionnels des facteurs de transcription SMAD impliqués dans la voie de signalisation TGF- β . Ces protéines contrôlent également l'expression de microARNs de la différenciation. Ces microARNs contrôlent l'expression de DDX5 et DDX17 dans une boucle de rétrocontrôle négative. La diminution de ces protéines au cours de la différenciation permet la mise en place d'un programme d'épissage qui peut contribuer aux changements morphologiques observés au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse.

Le travail effectué pendant ma thèse met en évidence l'importance des ARN hélicases DDX5 et DDX17 comme régulateurs clés de la progression tumorale, et souligne le rôle de l'épissage alternatif lors de la progression tumorale. De plus, ce travail met l'accent sur l'importance d'intégrer les différents niveaux de régulation de l'expression des gènes (transcription, épissage, microARN) pour une compréhension globale de la progression tumorale.

Abstract

Tumor progression leading to the formation of metastases results from deep modifications of gene expression programs at several levels, including transcription and splicing. During my PhD, I investigated the role in tumor progression of DDX5 and DDX17, two highly related multifunctional DEAD box RNA helicases that are involved in transcription and splicing as well as in microRNA biogenesis. For this purpose, I used two breast cancer models of tumor progression: the 4T1 mouse model composed of cancer cells that exhibit different metastatic properties and MCF10a human cells that undergo epithelial-to-mesenchymal transition upon Tgf- β treatment, a trans-differentiation process contributes to metastasis formation.

In the 4T1 mouse model, I showed that Ddx17 and Ddx5 contribute to tumor-cell invasiveness by controlling both transcriptional and splicing programs. More specifically, I demonstrated that Ddx5 and Ddx17 promote cancer cells aggressiveness by regulating the splicing of the macroH2A1 histone which in turn impacts on the expression of genes implicated in tumor cell invasiveness.

In the Tgf- β induced epithelial-to-mesenchymal trans-differentiation model, I showed that DDX5 and DDX17 dynamically orchestrate transcription, microRNA and splicing programs. DDX5 and DDX17 mediate a differentiation-specific transcription program by acting as transcriptional coregulators of the SMAD transcription factors involved in the Tgf- β signaling pathway. Interestingly, DDX5 and DDX17 also directly control the expression of key differentiation microRNAs. Remarkably, these miRNAs downregulate DDX5 and DDX17 in a negative feedback loop during the ensuing differentiation process. Finally, I showed that DDX5 and DDX17 downregulation directly elicits a differentiation-specific splicing program that may contribute to the modification of morphological phenotype during epithelial-to-mesenchymal transition. Therefore, I characterized these RNA helicases as dynamic orchestrators of transcription, miRNA and splicing programs.

The work performed during my PhD highlights the importance of DDX5 and DDX17 RNA helicases as key regulators of tumor progression in breast cancer, and also underlines the role of alternative splicing during tumor progression. Furthermore, this work emphasizes the importance of integrating the different layers of the gene expression process (transcription, splicing, microRNA) for a comprehensive understanding of tumor progression.

Liste des abréviations

3'UTR : 3' Untranslated Region
ARN Pol II : ARN Polymérase II
ARNm : ARN messenger
ATP : Adénosine Triphosphate
ChIP : Chromatin Immunoprécipitation
CLIP : Cross-Linking Immuno Precipitation
DMEM: Dubecco's modification of Eagle's medium
ESE : Exonic Splicing Enhancer
ESS : Exonic Splicing Silencer
FISH : Fluorescent In Situ Hybridization
GFP : Green Fluorescent Protein
HDAC : Histone Deacetylase
hnRNP : heterogeneous nuclear Ribonucleoprotein
ISE : Intronic Splicing Enhancer
ISS : Intronic Splicing Silencer
KO : Knock-Out
miARN : micro ARN
NMD : Non-sense mRNA Decay
nPTB : neuronal Polypyrimidine Tract Binding Protein
NTP : Nucleotide Tri Phosphate
ORF : Open Reading Frame
PDGF : platelet-derived growth factor
PKC : Protein Kinase C
PKR : Protein Kinase R
PTB : Polypyrimidine Tract Binding Protein
RISC: RNA induced silencing complex
RIP : RNA Immunoprecipitation
RRM : RNA Recognition Motif
RT-PCR : Retro-transcriptase Polymerase Chain Reaction
SELEX : Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment
snRNA : small nuclear RNA
snRNP : small nuclear Ribonucleoprotein
SRA : steroid receptor RNA activator
SV40 : Simian Virus 40
tRNA : ARN de Transfert
U2AF : U2 Auxilliary Factor
UV: Ultraviolets

Listes des figures et des tables

Figure 1 : Les caractéristiques d'un tissu tumoral. D'après Hanahan & Weinberg 2011. _____	13
Figure 2 : Immortalisation de fibroblastes humains à partir d'un petit nombre d'altérations génétiques. _____	15
Figure 3 : Phénotypes des tumeurs mammaires 67NR, 168FARN, 4T07 et 4T1. _____	18
Figure 4 : Suivi chimiluminescent de la formation de tumeurs et de métastases après injection de cellules 4T1 chez la souris. _____	19
Figure 5 : La cascade métastatique. Adaptée d'après Scheel C & Weinberg RA SCB 2011 _____	21
Figure 6: Voie de signalisation des protéines Smads en réponse au TGF β . _____	25
Table 1 : Listes des principaux gènes cibles des facteurs de transcription de la TEM. _____	27
Table 2 : Modulation de l'activité des facteurs de transcription de la TEM via leur liaison à des protéines de la chromatine, des co-régulateurs transcriptionnels, des facteurs de transcription ou à des modifications post-traductionnelles. _____	30
Figure 7 : microARNs impliqués dans la TEM. _____	36
Figure 8 : Site d'épissage consensus et réaction d'épissage. _____	39
Figure 9 : Séquence Cis-régulatrice de l'épissage et facteurs d'épissage. _____	41
Figure 10 : Influence de la transcription sur l'épissage alternatif. _____	43
Figure 11 : Exemple d'influence de modifications de la chromatine sur l'épissage alternatif. _____	44
Figure 12 : Exemple de structure secondaire de l'ARN influençant les décisions d'épissage. _____	45
Figure 13 : Exemples de différentes isoformes produites par épissage alternatif relevantes au cours de la progression tumorale. _____	49
Figure 14 : (A) Fonction et localisation des cibles de ESRP. (B) Code d'épissage relatif aux protéines ESRP et RBfox2. _____	52
Figure 15 : motifs des ARN hélicases DEAD. _____	55
Figure 16 : Représentation des processus cellulaires impliquant les ARN hélicases à motifs DEAD. _____	56
Figure 17 : Structure et homologie des ARN hélicases Ddx5 et Ddx17. _____	57
Table 4 : Facteurs de transcription et protéines régulatrices de la transcription interagissant avec DDX5 et DDX17. _____	59
Figure 18 : Schéma des différents rôles de DDX5 et DDX17 dans la maturation de différents ARNs. _____	63
Figure 19 : Modification post-traductionnelle de DDX5 et DDX17 : implication sur leurs fonctions. _____	64
Figure 20 : Fonction de DDX5 dans la TEM. _____	68
Table Supplémentaire 1 : Liste des principaux facteurs d'épissage des familles SR ou hnRNP ainsi que les facteurs d'épissage exprimés de manière tissus spécifiques. _____	144
Table Supplémentaire 2 : Liste des principaux transcrits régulés par épissage alternatif au cours de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse. _____	145

Table des matières

Liste des abréviations	6
Listes des figures et des tables	7
Table des matières.....	8
INTRODUCTION	10
Partie I – La progression tumorale.....	11
A- Définition et mécanismes	11
1- Caractéristiques des cellules cancéreuses	12
2- facteurs favorisant la progression tumorale : Instabilité génétique, microenvironnement et plasticité cellulaire.....	13
3- Modèle de progression tumorale : exemple du modèle 4T1.....	17
4- La cascade métastatique.....	20
B- La Transition Epithélio-Mésenchymateuse : contexte physio-pathologique.....	22
1- Définition et caractéristiques.....	22
2- Rôle pathologique de la TEM	23
3- Induction de la Transition Epithelio-Mésenchymateuse.....	24
C- La Transition Epithélio-Mésenchymateuse : mécanismes moléculaires.....	26
1- Régulation transcriptionnelle.....	27
1.1- Les facteurs Snails	29
1.2- Les facteurs ZEBs	29
1.3- Twist et les autres facteurs de transcription de la TEM	31
1.4- Régulation croisée des facteurs de transcription.....	31
2- Rôle des microARNs	32
2.1- microARNs et cancer.....	32
2.2- microARNs et TEM.....	33
i. Régulation des facteurs de transcription.....	34
ii- Régulation des effecteurs	35
Partie II : Epissage alternatif et progression tumorale	38
A- La réaction d'épissage	38
B- Mécanisme de régulation de l'épissage alternatif.....	40
1- Régulation par les facteurs d'épissage.....	40
2- Influence de la transcription et de la chromatine.....	41
3- Influence des structures secondaires.....	44
C- Epissage alternatif et progression tumorale.....	46

1- Altération du programme d'épissage au cours de la progression tumorale	46
2- Fonctions des variants d'épissage au cours de la progression tumorale.	48
D- Régulation de l'épissage dans la transition épithélio-mésenchymateuse.....	50
Partie III : Les ARN hélicases DDX5 (p68) et DDX17 (p72).....	54
A- Les ARN hélicases à motif DEAD	54
B- Fonctions moléculaires des ARN hélicases DDX5 et DDX17.	57
1- Rôle dans la transcription.....	57
2- Rôle dans l'épissage	59
3- Rôle dans la maturation des microARNs	60
4- Fonctions de DDX5 et DDX17 dans les autres processus du métabolisme de l'ARN.....	61
5- Modification post traductionnelles.....	63
C- Rôles des ARN hélicases DDX5 et DDX17 dans la progression tumorale et la transition épithélio-mésenchymateuse.....	65
1- Implication de DDX5 et DDX17 dans la progression tumorale.....	65
2- Rôle de DDX5 dans la Transition Epithélio-Mésenchymateuse.....	68
Objectifs	70
Résultats.....	71
Article N°1	71
Splicing switch of an epigenetic regulator by RNA helicases promotes tumor-cell invasiveness.	71
Article N°2	91
RNA helicases dynamically orchestrate transcription, microRNA and splicing programs in cell differentiation	91
Discussion.....	134
Rôle des ARN hélicases DDX5 et DDX17 dans la progression tumorale.	134
Mécanisme de régulation de l'épissage par les ARN hélicases DDX5 et DDX17.	139
Programmes d'épissage régulés par DDX5 et DDX17.....	141
Tables Supplémentaires.....	143
Annexe : Rôle des variants de l'histone macroH2A1 dans la progression tumorale.....	147
Appendice	151
Bibliographie	177

INTRODUCTION

L'objectif de ma thèse a été de caractériser le rôle des ARN hélicases DDX5 et DDX17 au cours de la progression tumorale. Ces protéines ont de très nombreuses fonctions moléculaires. Mon travail s'est focalisé, tout d'abord, sur l'importance de la régulation de l'épissage alternatif au cours de la progression tumorale en utilisant le modèle murin 4T1. Par la suite, je me suis intéressé à la coordination de la transcription, l'épissage alternatif et la régulation des microARN par DDX5 et DDX17 au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse, un processus de différenciation récapitulant certains aspects de la progression tumorale.

Cette introduction est divisée en trois parties. Dans la première partie, je détaillerai les mécanismes et les facteurs qui favorisent la progression tumorale. Je décrirai en particulier le modèle 4T1 et la différenciation épithélio-mésenchymateuse, les deux modèles de mon travail. Dans la seconde partie, je commencerai par décrire les mécanismes de l'épissage et de l'épissage alternatif puis étudierai la façon dont ces mécanismes sont impliqués et participent à la progression tumorale. La dernière partie, est consacrée aux ARN hélicases DDX5 et DDX17, à la description de leurs fonctions moléculaires et à leurs implications dans la progression tumorale.

Partie I – La progression tumorale

Ce premier chapitre est consacré à la description des mécanismes qui contribuent à la progression tumorale. Dans ce chapitre, je résume les différents aspects de la progression tumorale et les modèles utilisés pour l'étudier. Après avoir décrit les caractéristiques des cellules cancéreuses puis les facteurs qui favorisent la progression tumorale, je décrirai le modèle 4T1. Dans la seconde partie de ce chapitre, je me focaliserai sur la transition épithélio-mésenchymateuse.

A- Définition et mécanismes

Le cancer désigne un ensemble de pathologies d'origines tissulaires variées et qui sont caractérisées par une prolifération cellulaire anormalement importante. La progression tumorale représente l'ensemble des événements qui conduisent au développement d'un cancer à partir d'une cellule saine. Le processus de progression tumorale conduit à la formation de la tumeur et à la cascade métastatique. Au cours de la progression tumorale, deux groupes de gènes sont affectés : 1- les oncogènes et 2 les gènes suppresseurs de tumeurs qui favorisent ou inhibent le développement de la tumeur. De nombreuses altérations affectant l'activité des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs ont été identifiées. On distingue notamment les mutations et les altérations chromosomiques qui affectent directement la séquence du gène. Par ailleurs, ces altérations peuvent affecter l'expression des gènes en touchant des mécanismes impliqués dans la transcription, dans la maturation et la stabilité de l'ARN messager (épissage alternatif et micro-ARN) ou dans la traduction et les régulations post-traductionnelles.

1-Caractéristiques des cellules cancéreuses

Dix caractéristiques ont été proposées par D.Hanahan et R.A Weinberg pour définir les propriétés d'un tissu tumoral : 1- maintien des signaux prolifératifs, 2- échappement aux signaux antiprolifératifs, 3- résistance à la mort cellulaire, 4- acquisition de capacité répliquative illimitée, 5- dérèglement du métabolisme, 6- induction de l'angiogénèse, 7- activation de l'invasion et formation de métastases, 8- échappement à la destruction par le système immunitaire 9-inflammation du tissu cancéreux et 10- instabilité génétique (Hanahan, Weinberg, 2000; Hanahan & Weinberg, 2011). Le tissu tumoral est un tissu hétérogène composé de cellules tumorales mais aussi de cellules « normales » qui jouent un rôle actif dans la tumorigénèse. Ces cellules normales qui forment le stroma tumoral sont des cellules endothéliales, des péricytes, des cellules du système immunitaire et des cellules stromales. Les dix caractéristiques d'un tissu tumoral sont essentiellement spécifiques aux cellules tumorales mais certaines proviennent également de la collaboration de celles-ci avec les cellules du stroma tumoral. L'ensemble de ces caractéristiques regroupent la capacité des cellules cancéreuses à proliférer sans contrôle (maintien des signaux prolifératifs, échappement aux signaux antiprolifératifs, résistance à la mort cellulaire et acquisition de capacité répliquative illimitée à développer des capacités pour alimenter le tissu tumoral en nutriments (dérèglement du métabolisme, induction de l'angiogénèse) tout en échappant au système immunitaire (*figure 1*).

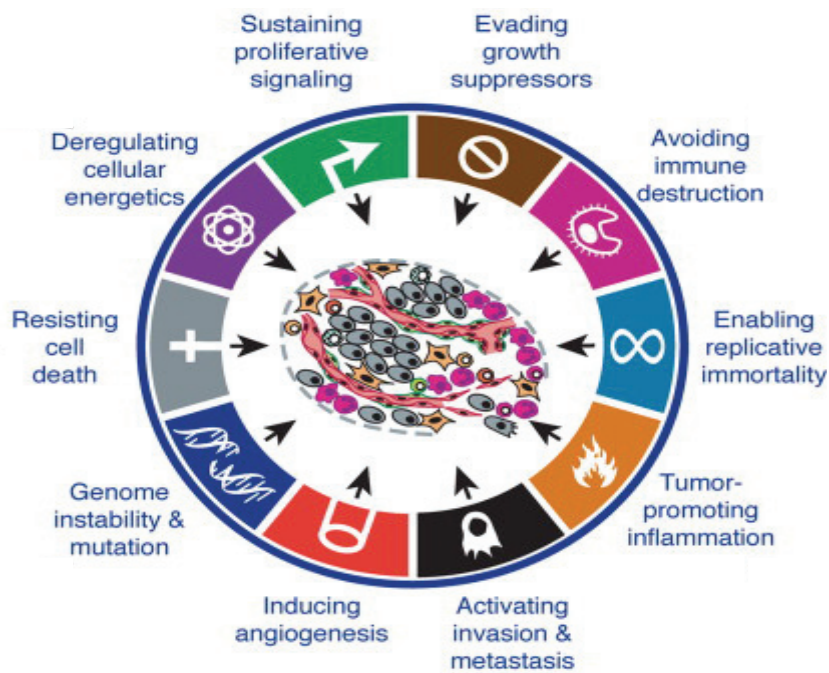


Figure 1 : Les caractéristiques d'un tissu tumoral. D'après Hanahan & Weinberg 2011.

L'acquisition de ces propriétés par les cellules cancéreuses résulte de mutations somatiques dans les gènes requis pour la prolifération et la différenciation puis de la sélection des cellules mutées. Ce phénomène est amplifié par l'instabilité génomique des cellules cancéreuses. Les cellules « normales » évoluent progressivement vers un statut cancéreux en acquérant plusieurs de ces caractéristiques.

2- facteurs favorisant la progression tumorale : Instabilité génétique, microenvironnement et plasticité cellulaire.

Le séquençage de cohortes de tumeurs montre que de très nombreuses altérations génétiques sont présentes dans des tumeurs en comparaison du tissu sain adjacent. La difficulté est d'identifier les mutations qui résultent de l'instabilité génétique propre aux tumeurs vis-à-vis des quelques mutations qui ont conduit à l'établissement de la tumeur (*The Cancer Genome Atlas Network, 2012*). De plus, certaines altérations génomiques semblent sélectionnées au cours de la progression tumorale. Cela suggère que ces altérations jouent un rôle fonctionnel. Par exemple, dans le cas du cancer du sein, 10 à 15 %

du génome serait ainsi préférentiellement altéré par des mutations ou des modifications du nombre de copies de gènes incluant les gènes FGFR1, IKBKB, ERBB2, PROCC, ADAM9, FNNTA, ACACA, PNMT, et NR1D1 qui sont considérés comme pouvant potentiellement faire l'objet de thérapie (Chin et al., 2006). Dans le cadre du cancer du sein héréditaire, une mutation délétère dans le gène BRCA1, augmente fortement le risque de développer un cancer (S. Chen & Parmigiani, 2007).

L'établissement de divers modèles de progression tumorale a permis de montrer que 5 à 10 altérations génétiques différentes sont nécessaires à la transformation tumorale. Par exemple, le groupe de R. Weinberg a transformé des fibroblastes humains et à leurs conférer un pouvoir tumorigène *in vivo* en introduisant la sous-unité catalytique de la télomérase hTERT, la région précoce du virus SV40 (production des antigènes « Small-t » et « Large-T ») et une forme constitutivement active de l'oncogène H- RAS (Elenbaas, 2001; Hahn et al., 1999) (*figure 2*). Les protéines virales ont une action pleiotropique et sont à la fois capables de réprimer p53 et RB et capables d'activer c-Myc, un oncogène. Ces résultats ont été obtenus dans des souris *nude* et ne reflètent ni le rôle du microenvironnement, ni celui de la plasticité des cellules cancéreuses. Ainsi, dans ce modèle, 5 altérations sont suffisantes pour transformer des cellules humaines. Des résultats similaires ont été obtenus avec d'autres types de cellules primaires humaines notamment épithéliales (ex : cellules pulmonaires, prostatiques, ovariennes) (Lazarov et al., 2002; Lundberg et al., 2002; Rich et al., 2001).

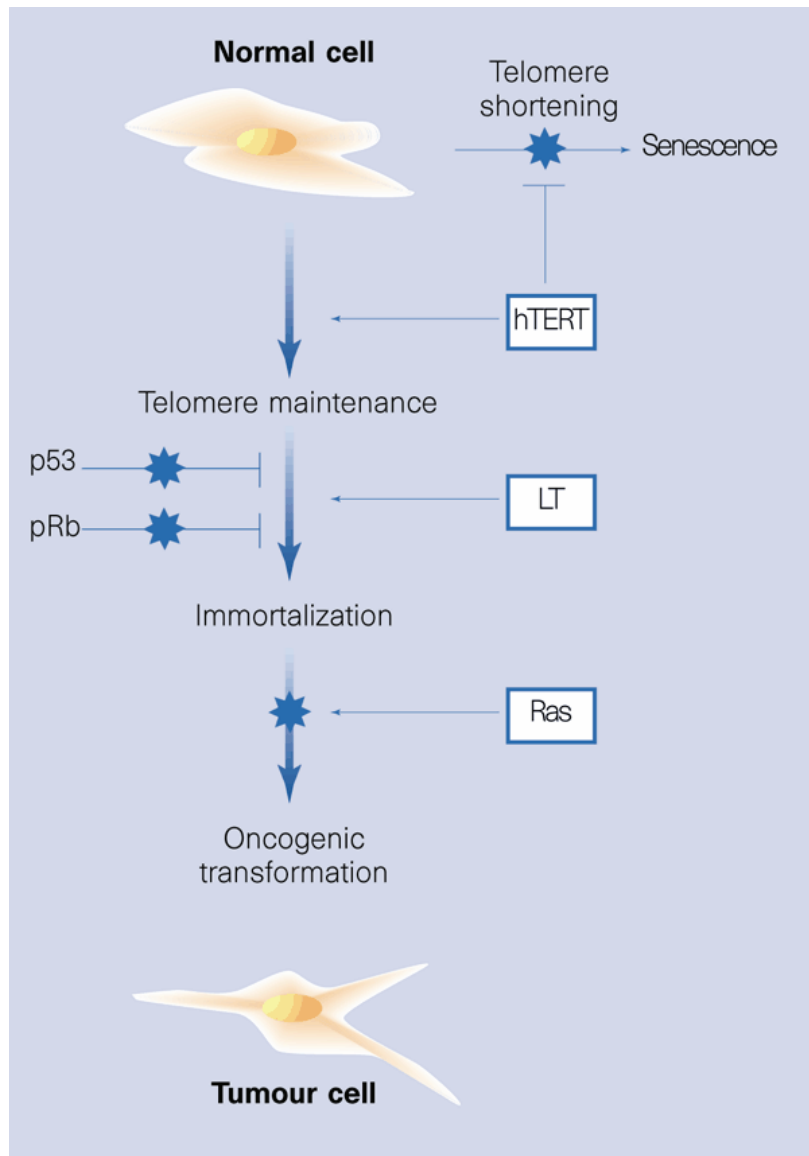


Figure 2 : Immortalisation de fibroblastes humains à partir d'un petit nombre d'altérations génétiques.

D'après Weitzman J.B. et Yaniv M. : Rebuilding the road to cancer. Nature 1999. LT= antigène grand T du virus SV40.

En plus de l'instabilité génétique, d'autres facteurs, comme le microenvironnement ou la plasticité cellulaire, participent à la progression tumorale.

En effet, Les cellules tumorales sont en contact direct avec le microenvironnement. Au cours de la progression tumorale, le stroma est modifié, à la fois dans la nature des cellules qui le composent mais aussi dans la structure de la matrice extracellulaire (Hanahan & Coussens, 2012). Le microenvironnement tumoral se compose de fibroblastes activés, qui produisent des enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire (MMP2,3,9) ainsi que

des facteurs de croissance (HGF, IGF, NGF, Wnt1, FGF2, EGF) (N. A. Bhowmick, Neilson, & Moses, 2004; N. a Bhowmick et al., 2004) et des cellules du système immunitaire. La sécrétion de ces facteurs de croissance peut permettre la prolifération des cellules épithéliales adjacentes. Ainsi les modifications du microenvironnement tumoral ne sont pas uniquement une conséquence ; elles participent aussi à la progression tumorale (Hanahan & Coussens, 2012). Il a été démontré que l'injection de fibroblastes normaux ou issus de tumeurs mammaires augmente la croissance des tumeurs (M. Hu et al., 2008). Cependant, ces résultats sont sujets à controverses car *in vitro*, la co-culture de fibroblastes normaux limite la prolifération de cellules de carcinome (Flaberg et al., 2012). Les fibroblastes activés sont aussi capables de sécréter des cytokines elles-mêmes en mesure de recruter des cellules du système immunitaire. Ces cellules sont à la fois associées à l'élimination des cellules tumorales mais aussi à certains aspects de la progression tumorale. Ainsi la sécrétion de chemokines et d'interleukines par les cellules du système immunitaire infiltrées sont capables de stimuler l'angiogénèse et de modifier la réponse immunitaire anti-tumorale (Numasaki et al., 2005; Terabe et al., 2000). L'angiogénèse est aussi une modification importante du microenvironnement tumoral. Sans oxygène et nutriments apportés par le sang, les cellules tumorales sont incapables de former une tumeur de plus de 2cm de diamètre (Folkman, 2007). En conclusion, le microenvironnement tumoral participe activement au développement et à la progression tumorale.

En plus de ces deux facteurs (l'instabilité génétique et le microenvironnement), la plasticité cellulaire contribue également à la progression tumorale. La différenciation cellulaire est traditionnellement considérée comme un processus irréversible. Au cours des dix dernières années, ce dogme a été mis à mal par des études portant sur la transdifférenciation, la dé-différenciation et la reprogrammation cellulaire (Hochedlinger & Plath, 2009; Yamanaka & Blau, 2010). Ces études ont permis de montrer qu'il est possible de reprogrammer des fibroblastes en cellules pluripotentes en surexprimant les facteurs de transcription Oct-3/4, Sox2, KLF4 and c-Myc (Takahashi & Yamanaka, 2006). De manière similaire, l'expression de SNAIL2 et SOX9, des facteurs de transcription embryonnaires, dans des cellules épithéliales mammaires différenciées, induit leur dé-différenciation et leur permet de reformer des glandes mammaires. Dans le contexte de la progression tumorale mammaire, ces facteurs sont exprimés dans les cellules métastatiques MDA-MB-231 et sont essentielles dans le maintien des propriétés tumorigéniques et métastatiques (Guo et al.,

2012). De plus, l'induction d'un programme de transition épithélio-mésenchymateuse (voir B- la transition épithélio-mésenchymateuse) dans des cellules transformées favorise leur potentiel tumorigénique (Mani et al., 2008; Morel et al., 2008). Ces différentes données montrent que la transformation et la différenciation sont intimement liées et que la différenciation de cellules cancéreuses pourrait directement prendre part aux mécanismes de transformation cellulaires et de progression tumorale.

3- Modèle de progression tumorale : exemple du modèle 4T1.

Il existe de très nombreux modèles cellulaires pour l'étude de la transformation ou de la progression tumorale. Ces modèles cellulaires peuvent provenir de cellules normales, c'est-à-dire isolées à partir d'un prélèvement. Par la suite, ces cellules sont modifiées soit par des traitements soit par la sur-expression d'oncogènes. Le modèle développé par R. A Weinberg évoqué dans la partie précédente fait partie de cette catégorie. D'autres modèles sont issus de prélèvements tumoraux murins ou humains. Ces modèles proviennent de tumeurs spontanées chez l'homme mais peuvent aussi provenir de tumeurs induites chez la souris. Ces modèles sont censés représenter au plus près les caractéristiques de la tumeur initiale. Dans le cadre du cancer du sein, il existe plusieurs dizaines de lignées humaines ainsi établies qui reflètent la diversité des cancers du sein : ainsi des modèles cellulaires exprimant le récepteur aux oestrogènes (MCF-7), sur-exprimant HER-2, ou encore des lignées triples négatives (MDA-MB-231).

Les modèles cellulaires peuvent aussi refléter le stade de progression de la maladie. C'est le cas du modèle 4T1. Ce modèle cellulaire est composé de quatre lignées cellulaires dérivant d'une tumeur mammaire spontanée chez la souris Balb/c (Aslakson & Miller, 1992). Plusieurs sous-populations de cellules ont été ensuite réinjectées de manière syngénique dans les coussinets adipeux mammaires et différentes capacités métastatiques ont été caractérisées en fonction de la sous-population injectée. Cela a permis d'établir 4 lignées cellulaires : les 67NR, 168FARN, 4T07 et 4T1. Ces différentes lignées sont toutes capables de former une tumeur primaire. Cependant toutes ces lignées ont des propriétés métastatiques différentes. Les 67NR ne forment jamais de métastases, les 168FARN sont capables

d'envahir les ganglions lymphatiques. Les 4T07 forment des micrométastases et les 4T1 forment des macrométastases (figure 3 et 4) (Aslakson & Miller, 1992).

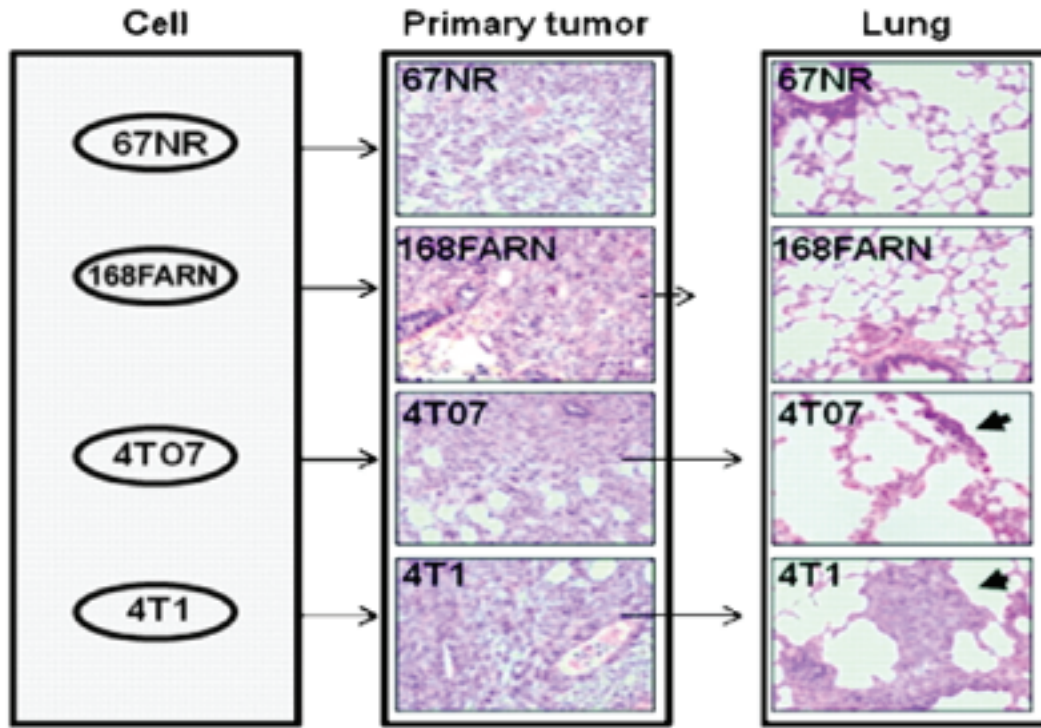


Figure 3 : Phénotypes des tumeurs mammaires 67NR, 168FARN, 4T07 et 4T1.

Vingt et un jours après l'injection de 5×10^5 cellules dans la glande mammaire de souris Balb/c, les tumeurs primaires et les poumons ont été prélevés et inclus en paraffine pour un examen histologique. Aucune métastase pulmonaire n'a été observée chez les souris injectées avec les cellules 67NR et 168FARN, cependant des micrométastases pulmonaires et macrométastases ont été observées chez les souris injectées et avec les cellules 4T07 et 4T1 (flèches). D'après Dutertre et al Cancer Research 2010.

Ce modèle de progression tumorale présente l'avantage d'être un modèle *in vivo* où les cellules peuvent être injectées chez des souris WT. Un autre avantage majeur est que ces différentes lignées sont syngéniques, ce qui permet de s'affranchir du fond génétique. *In vitro*, ces lignées ont des propriétés qui reflètent leurs phénotypes *in vivo*. Par exemple les cellules 4T1 sont capables de migrer et de digérer une matrice de collagène alors que les cellules 67NR n'en sont pas capables.

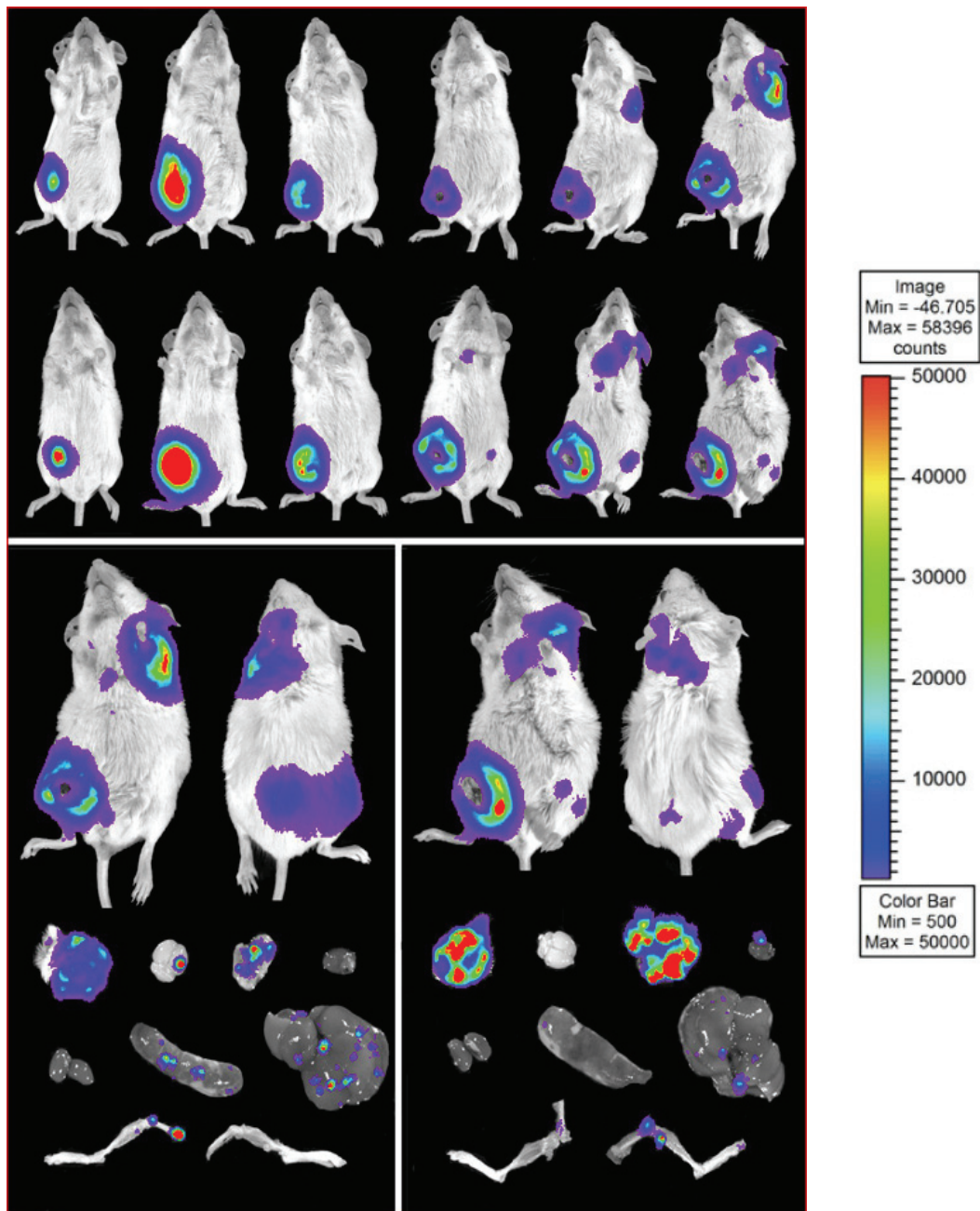


Figure 4 : Suivi chimiluminescent de la formation de tumeurs et de métastases après injection de cellules 4T1 chez la souris.

Des cellules 4T1 exprimant la luciférase ont été introduits dans la glande mammaire de souris BALB / c femelles et les animaux ont été imagés toutes les semaines pendant six semaines.

Les animaux ont été sacrifiés à la fin de la sixième semaine et les organes et les membres postérieurs ont été prélevés et imagés. Les images de deux animaux représentatifs sont présentées. La relation entre la couleur et l'intensité lumineuse en unités arbitraires (chiffres) pour l'ensemble des images d'animaux est donnée par la barre de couleur sur le côté droit de la figure. D'après Tao K. et al. BMC Cancer 2008.

4- La cascade métastatique

Parmi les caractéristiques décrites par Hanahan et Weinberg, on distingue la capacité des cellules tumorales à croître à distance du site initialement atteint. Cette croissance annexe est appelée métastase. Si les divers traitements et l'ablation de la tumeur par chirurgie ont permis d'augmenter significativement le taux de survie des patients, la formation de métastases est un facteur de mauvais pronostic. La dissémination des métastases et leur résistance aux traitements est à l'origine de plus de 90% de la mortalité suite à un cancer. La formation de métastases appelée aussi progression tumorale est un processus complexe qui peut être résumé par la « cascade métastatique » (*figure 5*). La cascade métastatique peut intervenir tôt dans le développement de la tumeur primaire, ou au contraire plus tardivement (Ansieau et al., 2008). Dans un premier temps, quelques cellules vont se détacher de la tumeur primaire, migrer et envahir le tissu de soutien. Dès lors, elles deviennent capables d'entrer, puis de sortir de la circulation sanguine. Ces cellules peuvent ensuite rester à l'état dormant ou former des métastases. Le processus de colonisation entraîne une re-prolifération des cellules. Le processus de progression tumorale et d'invasion est caractérisé par la perte d'expression de la E-cadhérine. Cette régulation associée à certaines mutations sur le gène de la E-cadhérine (CDH1), sont fréquemment observées dans la progression des carcinomes humains (Bex & van Roy, 2009). La E-cadhérine est une protéine clé des jonctions adhérentes nécessaire au maintien du phénotype épithélial. Il est bien établi qu'une forte expression de la E-cadhérine a un effet antagoniste sur les processus d'invasion et de formation de métastases. En plus de la régulation de la E-cadhérine, une baisse d'expression des gènes codants pour des protéines d'adhésion cellules-cellules ou cellules-matrice extracellulaire ainsi qu'une augmentation de l'expression des gènes codants des protéines d'adhésion associées à la migration, sont observés au cours de la progression tumorale. Un des processus majeur impliqué dans l'établissement de la progression tumorale est la transition épithélio-mésenchymateuse.

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est un processus de transdifférenciation au cours duquel des cellules épithéliales vont évoluer en cellules mésenchymateuses. Cela se caractérise par la perte des caractéristiques épithéliales et le développement des propriétés mésenchymateuses. Ce processus a été largement décrit dans des conditions physiologiques comme, par exemple, au cours du développement

embryonnaire, ou chez l'adulte lors de la cicatrisation, mais aussi dans des conditions pathologiques lors de la progression tumorale des carcinomes. Au niveau moléculaire, la TEM est caractérisée par un programme transcriptionnel dirigé par des facteurs de transcription comme les protéines Snail, Zeb ou Twist. En plus de ces programmes transcriptionnels, la TEM est également régulée au niveau de la chromatine, par des mécanismes faisant intervenir des microARNs et de l'épissage alternatif. Ainsi la TEM est un exemple de processus faisant intervenir tous les niveaux de la régulation des gènes.

Dans ce chapitre, après avoir brièvement replacé la TEM dans son contexte physiopathologique, je détaillerai les différentes couches de régulation des gènes participant à ce processus.

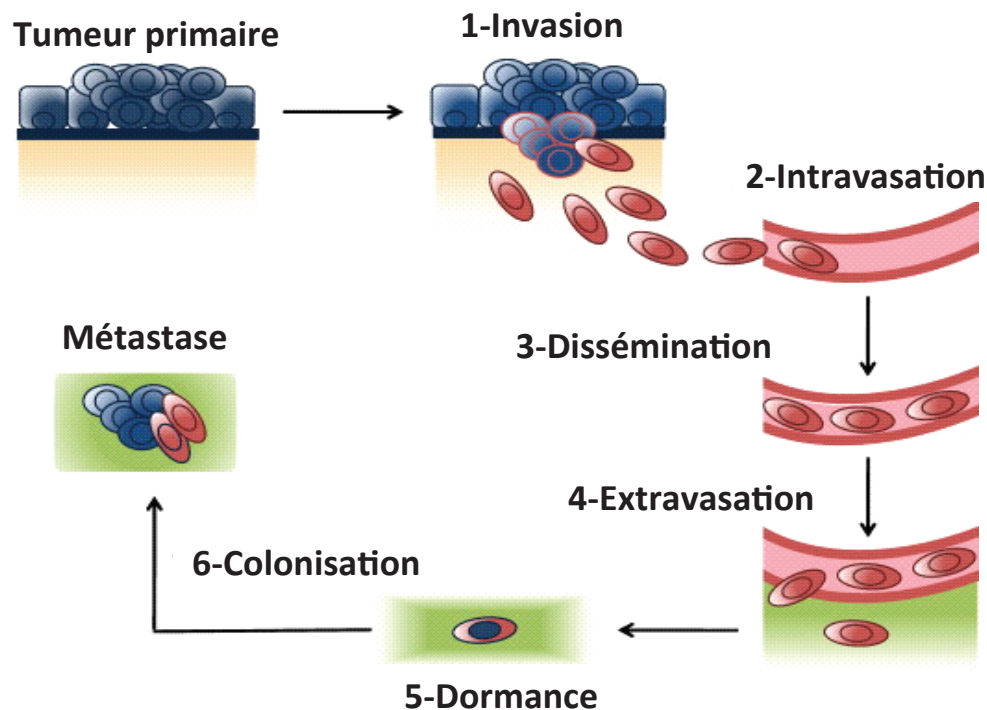


Figure 5 : La cascade métastatique. Adaptée d'après Scheel C & Weinberg RA SCB 2011

B- La Transition Epithélio-Mésenchymateuse : contexte physio-pathologique.

L'étude de la progression tumorale peut se réaliser en étudiant des modèles cellulaires reflétant les caractéristiques du tissu tumoral. Cependant, on peut également étudier des processus qui sont utilisés par les cellules malignes. La transition épithélio-mésenchymateuse est un exemple de processus physiologique qui intervient à différents moments du développement et qui est corrompu au cours de la progression tumorale.

1- Définition et caractéristiques

Au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse la cellule épithéliale va perdre l'expression de protéines spécifiquement épithéliales, en particulier les constituants des jonctions intercellulaires, et exprimer des marqueurs mésenchymateux tels que des protéines permettant la dégradation de la lame basale. Cette différenciation s'accompagne de changements morphologiques caractéristiques, comme le remodelage du cytosquelette avec la perte de l'actine corticale et la formation de lamellipodes, ainsi que l'acquisition de propriétés de migration et d'invasion. Ce processus peut être réversible lors de la transition mésenchymo-épithéliale (TME) au cours de la formation des métastases. Parmi les marqueurs impliqués dans la TEM, on observe la perte d'expression des protéines comme la E-cadhérine (Cdh1) ou l'occludine (Ocln) (jonctions cellulaires épithéliales) et l'augmentation de la N-cadhérine (Cdh2) (cellules mésenchymateuses) et des facteurs de transcription clés de la TEM (TEM-FT pour facteurs de transcription associés à la TEM) comme les protéines Snails, Zeb1 et Twist (Thiery, Acloque, Huang, & Nieto, 2009). Ces marqueurs sont les plus courants mais beaucoup d'autres peuvent être utilisés. En effet, des études récentes utilisant le séquençage massif font état de plus de 3000 gènes régulés lors de la TEM (Shapiro et al., 2011).

2- Rôle pathologique de la TEM

La TEM est un processus biologique qui ne se restreint pas à la formation tumorale. On en distingue plusieurs types. La TEM de type 1 intervient lors du développement embryonnaire. Elle est indispensable très tôt au cours du développement lors de la formation de l'endoderme pariétal, de la gastrulation ou la délamination de la crête neurale. La TEM de type 2 est associée aux processus de cicatrisation tissulaire chez l'adulte et à des phénomènes inflammatoires. La TEM de type 3 est associée à la progression tumorale (Kalluri & Weinberg, 2009).

La TEM est donc d'abord un processus non pathologique qui permet l'acquisition de propriétés migratoires et invasives par des cellules épithéliales qui sont nécessaires au développement et à l'homéostasie tissulaire. Le lien entre TEM et progression tumorale a commencé par l'observation de métastases de carcinomes mais fût longtemps débattu, jusqu'à la mise en évidence de la TEM *in vivo* (Brabletz et al., 2001). La difficulté de mettre en évidence la TEM *in vivo* est probablement due à plusieurs causes. Premièrement, dans les tumeurs, seul un petit nombre de cellules est capable de réaliser la TEM, c'est un processus très peu efficace. Ces cellules sont à l'interface entre la tumeur et le tissu de soutien. Elles sécrètent des cytokines, des protéases et remodelent le stroma (angiogenèse, remodelage de la matrice extracellulaire). Le stroma sécrète des facteurs, qui en retour, favorisent la TEM de ces cellules. Deuxièmement, la TEM *in vivo* dans les tumeurs peut être totale ou partielle, ce qui la rend difficile à mettre en évidence. Troisièmement, la TEM est réversible, ce qui témoigne de la plasticité des cellules tumorales. Les cellules métastatiques peuvent regagner un phénotype épithélial permettant leur prolifération. Cette réversion de la TEM renforce l'efficacité des cellules cancéreuses à former des métastases *in vivo* (Ocaña et al., 2012; Tsai, Donaher, Murphy, Chau, & Yang, 2012).

La TEM est donc un processus transitoire et les facteurs de transcription clés impliqués dans la différenciation (Snails, ZEBs, voir partie suivante) sont très fréquemment surexprimés dans plus de dix types de carcinomes (Sánchez-Tilló et al., 2012). En plus de l'acquisition de capacités migratrices et invasives, la TEM est impliquée dans la résistance à l'apoptose et à l'angiogénèse (Thiery et al., 2009). La TEM a également été proposée comme un mécanisme capable de générer des cellules souches cancéreuses (Mani et al., 2008).

En conclusion, dans les cellules cancéreuses, la TEM est la réactivation et la corruption d'un programme cellulaire normal par les cellules tumorales. Ce processus témoigne de la plasticité des cellules tumorales d'origine épithéliales.

3- Induction de la Transition Epithelio-Mésenchymateuse

La TEM peut être induite par une large variété de signaux comme les facteurs de croissance par l'intermédiaire des intégrines, des cytokines ou sous l'effet de déformation mécanique. Parmi les cytokines inductrices de la TEM, on retrouve le TGF β , l'EGF, l'IGF, le FGF, le HGF, le PDGF ainsi que des composants des voies de signalisation Wnt/beta-caténine, Hedgehog, NF κ b et Notch. Par exemple, dans la voie canonique du TGF β , le ligand TGF β se lie à un complexe de récepteurs formés par deux protéines TBR1 et deux protéines TBR2. Cette liaison initie une cascade de signalisations incluant la phosphorylation de TBR1 par TBR2. Le domaine GS (riche en résidus glycine et sérine) de TBR1 phosphorylé permet l'interaction avec les protéines Smad2 et Smad3 via leurs domaines MH2. Les protéines Smad2 et Smad3 sont ensuite phosphorylées par TBR1 au motif SSXS situé à l'extrémité C-terminal du domaine MH2 (Nakao et al., 1997) (*figure 6*). Les protéines Smad2 et Smad3 ainsi phosphorylées sont capables de changer de conformation et de se lier à Smad4 (Chacko et al., 2004). Le complexe est alors relocalisé dans le noyau. Le signal de localisation nucléaire (NLS) est situé dans le domaine MH1 des protéines Smads. Ce domaine confère aux protéines Smad3 et Smad4 leur capacité à lier l'ADN (Shi et al., 1998), alors que la protéine Smad2 n'est pas capable de lier l'ADN (Dennler et al., 1999). Les protéines Smad3 et Smad4 se lient spécifiquement à des éléments de réponse SBE (Smad Binding Element) au niveau des promoteurs des gènes cibles (*figure 6*). Cependant la liaison des Smads à l'ADN est de faible affinité et de faible spécificité. De plus ces protéines interagissent de manière spécifique et efficace avec de nombreux partenaires nucléaires et notamment des régulateurs co-transcriptionnels. Parmi ces co-régulateurs transcriptionnels, on retrouve des membres de la famille Forkhead tels que FoxH1 (Germain et al., 2000) ou FoxO1,3 et 4 (Seoane et al., 2004). On retrouve également l'ARN hélicase DDX5 (p68) (Warner et al., 2004).

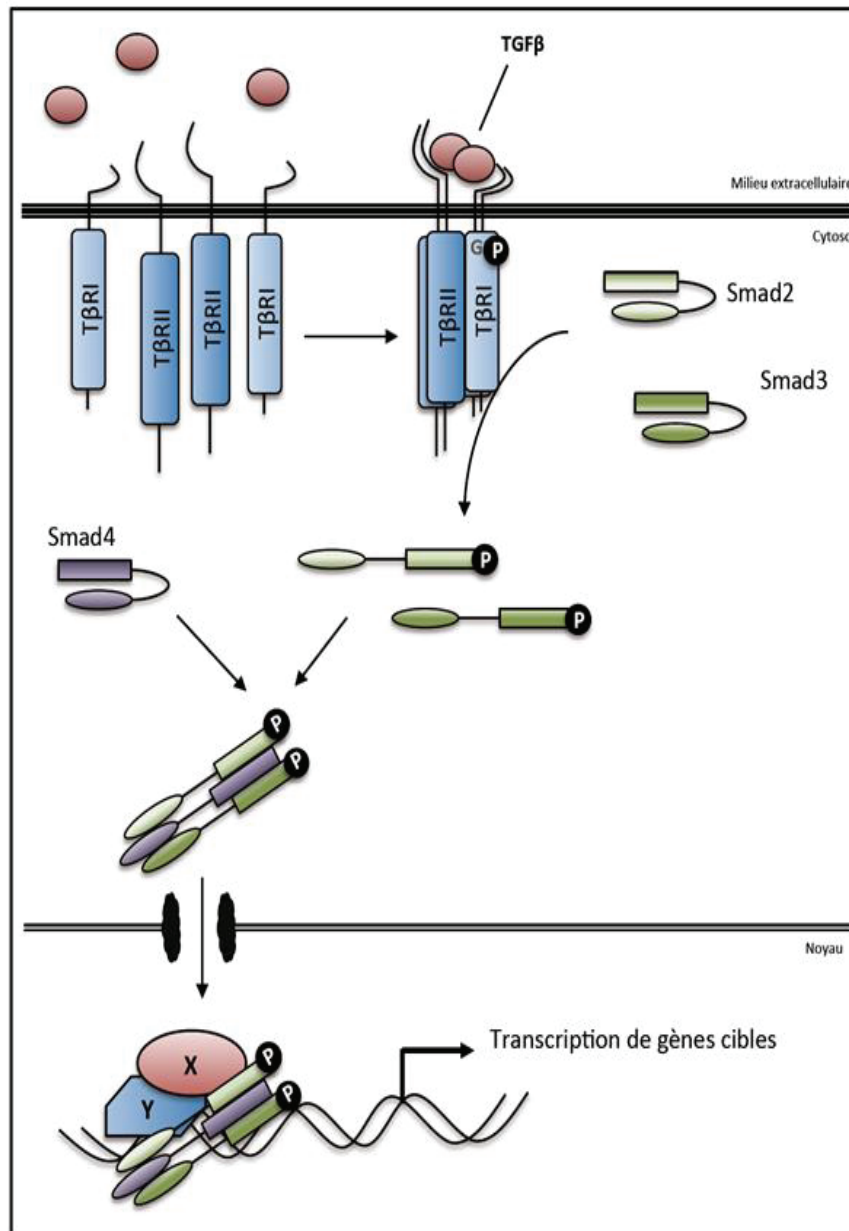


Figure 6: Voie de signalisation des protéines Smads en réponse au TGFβ.

X et Y représentent des protéines co-régulatrices e la transcription.

Le TGFβ est un puissant inducteur de la TEM et favorise l'expression d'un panel de facteurs de transcription clés comme les facteurs Snails et Zebs via la voie canonique du TGFβ. Les voies non canoniques sont néanmoins nécessaires pour la réalisation d'une TEM complète et l'activation de certaines métalloprotéinases (Y. E. Zhang, 2009). Le TGFβ est également capable d'induire ou d'inhiber l'expression d'ARN non codant ou de protéines intervenant à différents niveaux de contrôle. Par exemple, le TGF-β est capable d'activer l'expression d'ADN méthyl-transférase (modification épigénétique), d'induire ou d'inhiber

l'expression de microARNs ou de réprimer l'expression de facteurs d'épissage. Ces différents niveaux de régulation de la TEM seront décrits dans la partie suivante.

C- La Transition Epithélio-Mésenchymateuse : mécanismes moléculaires

Le rôle des facteurs de transcription dans la TEM est bien établi. Certains facteurs répriment de manière directe l'expression de la E-cadhérine (CDH1) en se fixant sur son promoteur. Cette perte de la E-cadhérine est un événement fondamental car c'est un marqueur de la perte des jonctions adhérentes (spécifiques aux cellules épithéliales) étape essentielle dans la TEM, mais aussi parce que cette perte induit une cascade de signalisations favorisant la TEM (Wheelock & Johnson, 2003). En plus de la E-cadhérine, il est établi que ces facteurs de transcription contrôlent des programmes transcriptionnels nécessaires à la TEM. Depuis quelques années, il apparaît clairement que la TEM n'est pas seulement un programme gouverné par des facteurs de transcription. De nombreux autres niveaux de régulation des gènes comme les microARNs, l'épissage alternatif et les modifications post-traductionnelles, sont impliqués dans la TEM. Les mécanismes de régulation de la TEM sont complexes à plusieurs points de vues. Premièrement, il existe des régulations croisées entre facteurs de transcription. Certains facteurs de transcription sont capables d'en activer d'autres ce qui renforce la TEM. Ils sont également capables de se réguler eux-mêmes en s'auto-activant ou en s'auto-inhibant. Deuxièmement, les différents niveaux de régulation sont intimement connectés. Les facteurs de transcription sont modifiés post-transcriptionnellement affectant ainsi leur stabilité. Les microARNs participant à la TEM ciblent à la fois des facteurs de transcription clés et des effecteurs de la TEM. Les différents niveaux de régulation sont détaillés dans les sous-parties suivantes.

1- Régulation transcriptionnelle

Les facteurs de transcription impliqués dans la TEM ont d'abord été identifiés au cours du développement embryonnaire. Ils peuvent être classés en deux catégories : d'une part ceux qui régulent de manière directe l'expression de la E-cadhérine en se fixant sur son promoteur et d'autre part ceux qui régulent la E-cadhérine de manière indirecte. Les facteurs Snails, Zeb1, TCF3 et KLF8 se fixent directement sur le promoteur de E-cadhérine et répriment son expression. Les facteurs Twist1, FoxC2, goosecoid, TCF4, SIX1 et PRRX1 semblent capables de déclencher la TEM sans se fixer directement sur le promoteur de la E-cadhérine. De plus tous ces facteurs de transcription sont capables d'induire ou de réprimer un grand nombre de gènes impliqués dans les jonctions cellulaires ou dans l'acquisition de la motilité et la dégradation de la matrice extracellulaire (*table 1*).

Table 1 : Listes des principaux gènes cibles des facteurs de transcription de la TEM. En rouge la E-cadhérine indiquant la redondance d'action des TEM-FT. En bleu les tem-FT illustrant les régulations croisées des facteurs de transcription de l'TEM. Adapté d'après Thierry & Al, Cell, 2009 et Sanchez-Tillo & Al, CMLS, 2012.

TEM-FT	Marqueurs Epithéiaux	Marqueurs Mésoenchymateux	Prolifération	Motilité et invasion	Survie	Autres
Snail 1/2	E-Cadherin	Snail1	Cyclin D2	Aggrecan	Caspases	BRCA2
	Cadherin-16	Fibronectin	Cdk4	Collagen II	DFF40	Egr1
	Cadherin-6B (4)	FoxC2	PCNA	δNp63	Puma	ERα
	VE-cadherin	Lamininα4	Rb phosph	Collagen I	p53	FKP
	Claudins	SMA	p21	MMPs	Atrn	PGDH
	Connexin 43	Snail2	p27	RhoB	Bcl-xL	Rab25
	Crumbs3	Vitronectin		SDF-1α	Bid	RKIP
	Cytokeratins	Vimentin		SPARC	Cxcl1	SCL27A2P
	Desmoplakin	Zeb1		Osteopontin	Foxg1	Runx2
	Dlg1				Fos	VDR
	HNF-1β				Mst4	Ets-1
	HNF-4α				Mt1	Id1
	Integrinα3 / α6				PI3K activity	LEF1
	Integrinβ1/β4				Erks activity	
	Laminins α3,α5,α6					
	Laminin γ2 (15, 17)					
	Mucin-1					
	Nephrin					
	Na,K-ATPase					
	Occludins					
PTEN						
ZEB 1/2	E-Cadherin	Zeb1	Cyclin D1	Collagen I	p73 (66)	Brachyury
	P-cadherin	Vimentin	Rb phosph	δNp63		Integrin α4
	Claudins	N-cadherin	Cyclin G2	VDR		miR-200
	Connexin26/31 (56)		Rb like 2	MMP1-2		Sema3F
	Crumbs3					Ovalbumin
	Desmoplakin					
	Lg2					
	Mucin-1					
	Pals1					
	Pg2					
	PKP2/PKP3					
	ZO1/ZO3					
Twist	E-Cadherin	N-cadherin	Gli1	MMP2		AKT2
	Integrinβ1			MT1-MMP		
KFL8	E-Cadherin					
	E-Cadherin	Vimentin	p21			Id1
TCF3 (E12/E47)		Fibronectin	p16(INK4a)			Bowline
		SMA				Adiponectin

1.1- Les facteurs Snails

Les facteurs de la famille Snail, Snail1 (Snail), Snail2 (Slug) et Snail3 (Smuc) contiennent des domaines à doigt de zinc en C-terminal de la protéine qui leur permettent de lier l'ADN sur des domaines E-box (CAGGTG). En N-terminal, on distingue un domaine SNAG qui leur permet d'interagir avec des protéines de modification de la chromatine ou des complexes co-transcriptionnels comme LSD1-coRest, HDAC1/2 ou Ajuba-PRMT5-PRC2 (voir *table 2* pour la liste des interactants des TEM-FT). Les facteurs Snail1 et Snail2 répriment l'expression de protéines des jonctions cellulaires comme les claudines (jonctions adhérentes) l'occludine (jonctions serrées) et activent l'expression de la vimentine, la fibronectine et des métalloprotéases (voir *table 1*). Les protéines Snail1 et Snail2 régulent un grand nombre de gènes communs comme le récepteur à la vitamine D (Larriba et al., 2009) mais certaines expériences démontrent que quelques gènes sont régulés par l'une ou par l'autre (Moreno-Bueno et al., 2006).

L'activité des facteurs de transcription de la TEM peut être modifiée par des modifications post-traductionnelles. La phosphorylation de Snail1 (sérine 11 et sérine 92) et Snail2 (sérine4) favorisent leurs activités transcriptionnelles alors que la phosphorylation par Gsk3- β inhibe leurs activités. Snail1 et Snail2 peuvent être également ubiquitinilées et dégradées.

1.2- Les facteurs ZEBs

Les facteurs de la famille ZEB, ZEB1 (δ EF1), ZEB2 (SIP1) et ZEB3 sont des protéines contenant deux groupes de domaines à doigt de zinc séparés par un homo-domaine et un domaine de liaison aux Smads. La liaison à l'ADN est médiée par leurs domaines à doigt de zinc. L'interaction des protéines ZEB avec CtBP est une marque de répression de même que l'interaction entre ZEB1 et Tip60, BRG1 et Sirt1 (protéines du remodelage chromatinien). De même l'interaction de ZEB2 avec le complexe NuRD, est associée à la répression (Sánchez-Tilló et al., 2011). ZEB1 et ZEB2 n'interagissent donc pas avec les mêmes complexes répressifs (*table 2*). A l'inverse, l'interaction entre les protéines ZEBs et p300 (histone acétyl-transférase) est associée à l'activation transcriptionnelle (Sánchez-Tilló et al., 2011). Les protéines ZEB, tout comme les protéines Snails, apparaissent très proches fonctionnellement. Cependant, ZEB1 et ZEB2 sont induits en réponse au TGF β mais semblent

avoir des modes d'action opposés dans ce contexte. Ces deux protéines interagissent avec les protéines Smads et Smad3 en particulier. ZEB1 interagit Smad3 et p300 et apparaît comme un activateur de la transcription. De manière opposée, ZEB2 interagit avec CtBP et réprime l'expression des gènes (Postigo, Depp, Taylor, & Kroll, 2003). Dans ce contexte les protéines ZEBs semblent jouer des rôles différents. Cette dualité est controversée car la déplétion de ZEB1 dans des cellules NMuMG induite au TGFβ induit une augmentation de l'activité du promoteur de la E-cadhérine, ce qui suppose que ZEB1 est un répresseur transcriptionnel (Shirakihara, Saitoh, & Miyazono, 2007). De plus, ZEB1 et ZEB2 sont capables d'interagir avec p300 (van Grunsven et al., 2006).

En plus de réprimer les cadhérines épithéliales, les facteurs ZEB, sont également capables de réprimer des marqueurs de la polarité épithéliales comme Crumbs3, ainsi que des composants des desmosomes (Desmoplakine, plakophiline 3), des jonctions serrées (Occludine, claudine7, ZO3), des jonctions communicantes (Connexine 26/31) et d'induire l'expression de marqueurs mésenchymateux comme la vimentine et la N-cadhérine (table 1).

TEM-FT	Co-Régulateurs/Facteurs de transcription	Modifications post traductionnelles
Snail1	Hdac1/2	Phosphorylation (PKA, CK2, PKD1, Gsk3b)
	Ajuba-PRMT5-PRC2	Lysyl oxidation (Loxl2/3)
	LSD1-coREST	dephosphorylation (SCP)
	Smads	Ubiquitine (FBXL14)
Snail2	Hdac1/2	Phosphorylation
	Ajuba-PRMT5-PRC2	Ubiquitine (MDM2)
	LSD1-coREST	
	CtBP (Snail2)	
Zeb1	NCoR	
	CtBP	SUMOylation (pc2)
	Tip60 (Histone acétyl transférase)	Acetylation (p300)
	BRG1 (SWI/SNF ATPase)	Phosphorylation
	Sirt1 (Histone déacétylase)	
	p300/pCAF	
Zeb2	Smads	
	NuRD	SUMOylation (pc2)
	CtBP	Ubiquitination (FBXL14)
	p300/pCAF	Phosphorylation
Twist	Smads	
	Runx2	
	p300	
	NF-kB	
	PRC1/2	
	NuRD	
SET8		

Table 2 : Modulation de l'activité des facteurs de transcription de la TEM via leur liaison à des protéines de la chromatine, des co-régulateurs transcriptionnels, des facteurs de transcription ou à des modifications post-traductionnelles.

Données compliées à partir de Sanchez-Tillo & Al, CMLS, 2012

1.3- Twist et les autres facteurs de transcription de la TEM

Twist est un facteur de transcription à domaine bHLH (pour basic/helix-loop-helix) qui lui permet de se fixer à l'ADN, et à domaine « twist box » situé en C-terminal qui lui permet de fixer des régulateurs co-transcriptionnels. Twist est capable de fixer des complexes d'activation et de répression de la transcription comme p300 ou NuRD (*table 2*) pour activer (N-cadhérine) ou réprimer (E-cadhérine) les marqueurs de la TEM. Les autres facteurs de la TEM ont été identifiés principalement sur leurs capacités à réprimer de manière directe ou indirecte la E-cadhérine.

La majorité des facteurs de transcription identifiés dans la TEM contrôlent et favorisent le phénotype mésenchymateux. Ces facteurs sont induits lors de la TEM. Néanmoins, certains facteurs de transcription apparaissent réprimés au cours de la TEM et semblent spécifiques aux cellules épithéliales. Les facteurs ELF3, ELF5 et GRHL2 sont réprimés au cours de la TEM et sont ré-exprimés au cours du processus inverse, la TME. (Chakrabarti et al., 2012; Cieply et al., 2012). Au cours de la TEM, il y a donc une balance de facteurs de transcription caractérisée par une baisse d'expression des facteurs favorisant le phénotype épithélial et une augmentation de l'expression des facteurs favorisant le phénotype mésenchymateux.

1.4- Régulation croisée des facteurs de transcription

Les facteurs de transcription sont capables de se réguler entre eux. Snail1 apparaît comme le facteur exprimé le plus précocement dans la transition. Snail2, Zeb1 et Twist sont exprimés plus tardivement et pourraient jouer un rôle dans le maintien du phénotype mésenchymateux. Snail1 est capable d'induire l'expression de Snail2 et des protéines ZEBs (Zheng & Kang, 2013). Le contrôle de Zeb2 par Snail1 est réalisé par la régulation d'un transcrit antisens (Beltran et al., 2008). La régulation croisée des TEM-FT est aussi médiée par la régulation de microARN (voir partie suivante).

2- Rôle des microARNs

Les microARNs (miR) sont des ARNs non-codants de 22 nucléotides agissant comme des régulateurs post-transcriptionnels de l'expression des gènes. Le génome humain code pour environ 1000 miARN. Plus de 60% des gènes humains peuvent être des cibles des microARNs (Friedman, Farh, Burge, & Bartel, 2009). Chez les animaux, les miRs se fixent sur la partie 3' non traduite des ARN messagers. L'appariement entre le miR et l'ARNm est partiel, seule une séquence « seed » de 6 à 8 nucléotides est parfaitement complémentaire. Le microARN, avec les protéines de la famille argonaute, (AGO) vont dégrader l'ARNm (activité ribonucléase H) et inhiber sa traduction.

Les microARNs peuvent être produits à partir d'un gène ou à partir d'une séquence intronique épissée. Les gènes de microARNs sont transcrits par la polymérase II (Lee et al., 2004). Les transcrits sont capés et poly-adyénylés. Ces transcrits possèdent une structure tige-boucle d'environ 80 nucléotides et sont appelés microARN primaire (pri-miARNs). La structure double brin d'ARN est reconnue par DGCR8 (Pasha) qui se lie à Drosha, une enzyme qui va cliver le précurseur pour former le Pre-miARN (Gregory et al., 2006). Cette étape est nucléaire. Le pre-miARN est exporté dans le cytoplasme et est clivé par Dicer pour former le duplexe mature de 22 nucléotides (Lund & Dahlberg, 2006).

2.1- microARNs et cancer.

Les microARNs peuvent être exprimés spécifiquement dans certains tissus ou de manière ubiquitaire. Dans les tumeurs, il a été observé une diminution globale de l'expression des microARNs (Lu et al., 2005). Au-delà de cette observation, certains microARNs sont sur-exprimés dans les tumeurs comme miR-21 et miR-155 dans les cancers du sein et du poumon (Pencheva & Tavazoie, 2013). L'expression des microARNs change donc profondément lors de la progression tumorale. L'altération de l'expression des microARNs s'exprime à plusieurs niveaux. Ainsi: 1- Au niveau chromosomique, les gènes codant les microARNs peuvent se trouver sur des régions génomiques amplifiées, transloquées ou délétées (exemple de miR-15a/16-1 (Calin et al., 2002)). 2- Au niveau

épigénétique, de la même manière que les autres gènes, certains gènes codant les microARNs sont associés à des îlots CpG dont la régulation dépend de la méthylation de l'ADN (Lyko, 2007). 3- Au niveau de la transcription. De nombreux microARNs sont régulés par des facteurs de transcription jouant un rôle suppresseur de tumeur ou un rôle d'oncogène comme TP53, MYC ou RAS (Krol, Loedige, & Filipowicz, 2010). 4- Au niveau de la biogénèse des microARNs où les protéines clés de la machinerie de la biogénèse des microARNs comme Drosha et Dicer sont dérégulées dans des tumeurs (Kumar, Lu, Mercer, Golub, & Jacks, 2007).

En plus de leur rôle fonctionnel dans la TEM (voir sous-partie suivante), les microARNs sont impliqués dans plusieurs autres caractéristiques du cancer comme la prolifération (ex : miR-16 (Q. Liu et al., 2008)), la sénescence (ex : miR-34 (Tazawa, Tsuchiya, Izumiya, & Nakagama, 2007)), l'angiogénèse (ex : miR-107 (Yamakuchi et al., 2010)) ou les dommages à l'ADN (ex : miR-605 (Xiao, Lin, Luo, Luo, & Wang, 2011)).

2.2- microARNs et TEM

Les microARNs peuvent être exprimés de manières tissus spécifiques et contrôlés par l'expression de facteurs de transcription tissus spécifiques. Ces microARNs peuvent être exprimés de manière aberrante lors de la corruption des programmes transcriptionnels au cours de la progression tumorale (ex : la transition épithélio-mésenchymateuse). Au cours de la TEM, on observe une diminution des microARNs exprimés dans les tissus épithéliaux et une augmentation des microARNs exprimés dans les tissus mésenchymateux. Cela correspond au changement d'expression de facteurs de transcription au cours de ce processus. Les microARNs impliqués dans la TEM peuvent être classés en deux catégories : 1- Les microARNs ciblant les facteurs de transcription de la TEM et 2- les microARNs ciblant les effecteurs de la TEM. Ces microARNs ciblent des composants du cytosquelette, ou des marqueurs épithéliaux ou mésenchymateux (*table 3*).

i. Régulation des facteurs de transcription

La première famille de miARNs impliquée dans la TEM est la famille miR-200. Elle est exprimée à partir de deux clusters sur le chromosome 1 (miR-200a, miR-200b et miR429) et sur le chromosome 12 (miR-200c et miR-141). L'expression de ces miRs est associée au phénotype épithélial et diminue donc lors de la TEM (Park, Gaur, Lengyel, & Peter, 2008). A l'inverse la sur-expression de miR-200 annule le phénotype mésenchymateux. Cette famille de mi-RNAs ciblent les facteurs ZEB1 et ZEB2 qui sont eux mêmes capables de les réprimer (Gregory et al., 2008). En effet, ZEB1 et ZEB2 se fixent sur la séquence E-box des promoteurs des clusters de la famille miR-200. Ces facteurs sont aussi ciblés par d'autres microARNs (*table 3*).

La même boucle de rétrocontrôle est observée pour Snail1 et miR-34 : miR-34 cible Snail1 qui réprime son expression en se fixant sur la séquence E-box de son promoteur (Siemens et al., 2011). Snail1 est également ciblé par miR29b et miR-30a.

Tous les microARNs ciblant les facteurs Snail ou ZEB voient leurs expressions diminuées au cours de la TEM. Cette diminution est aussi relevante dans les cancers puisque ces microARNs jouent un rôle apparent de suppresseur de tumeur. Par exemple miR-200 est sous-exprimé dans les cancers de la vessie, gastrique, carcinome de la tête et du cou, de l'ovaire (X. Hu et al., 2009; Shinozaki et al., 2010; Wiklund et al., 2011; Zidar et al., 2011) et miR-34 dans les cancers du sein, du poumon, du colon, du pancréas, et de l'ovaire (Corney et al., 2010; Vogt et al., 2011; Z. Wang et al., 2011).

Régulateurs	microARNs	cibles	Fonction des cibles
ZEBs, TP53	200a	Zeb1 et Zeb2	EMT-FT
	200b		
	200c		
	141	Zeb1 et Zeb2	
	429		
	205	Zeb2	
	138		
	29b	Snail1	
Snail1	30a		
	34	Snail1	
Snail2	203		
	1	Snail2	
Zeb3	200b	Snail2	
	204		
TP53	192	Zeb1 et Zeb2	
ZEBs	283	Bmi,1 Sox2, KIF4	
	203		
	9	Ecadherine	Jonctions
	194	N-cadhérine	migration
	491-5p	Par3	Polarité/jonctions
	661	Nectin-1, StarD10	Jonctions
	138	Rock2	Cytosquelette
	155	Rho-A	Jonctions/cytosquelette
	24	Net1	Jonctions
	204	TGFB2	Signalisation TGFB
	302		
	372		

Table 3 : Les principaux microARNs impliqués dans la TEM, leurs cibles majeures et leurs régulateurs.

En vert les microARNs dont l'expression est diminuée lors de la TEM, en rouge ceux dont l'expression est augmentée au cours de la TEM. En bleu, les boucles de rétrocontrôle de l'expression des TEM-FTs par les microARNs. Données compilées à partir de Lamouille, S et & al 2013 Current opinion in cell biology

ii- Régulation des effecteurs

Les membres d'une même famille de microARN partagent des cibles communes. Individuellement, un microARN peut cibler de nombreux ARNm d'une voie de signalisation, ce qui renforce leurs effets (Subramanyam & Blelloch, 2011). Dans ce contexte, miR-200 qui régule les facteurs ZEBs, régule aussi l'expression d'autres gènes en particulier ceux impliqués dans la formation de la matrice extracellulaire (Schliekelman et al., 2011). Parmi

ces microARNs dont l'expression est diminuée au cours de la TEM, certains ciblent des marqueurs mésenchymateux comme la N-cadhérine (miR-194) ou la vimentine (miR-138) (figure 7). D'autres microARNs sont décrits comme sur-exprimés au cours de la TEM. C'est le cas pour miR-9 qui cible directement la E-cadhérine et qui favorise la migration et l'invasion (Ma et al., 2010).

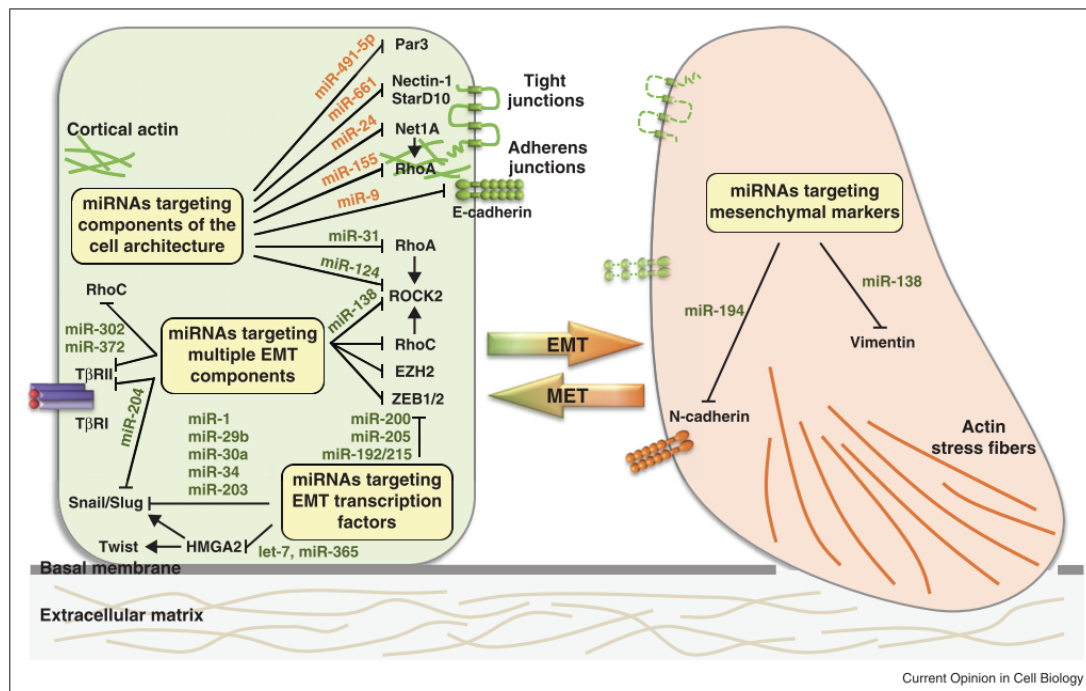


Figure 7 : microARNs impliqués dans la TEM.

D'après Lamouille, S et al 2013 Current opinion in cell biology

Conclusion

La Transition Epithélio-Mésenchymateuse est associée à la progression tumorale (Savagner, Yamada, & Thiery, 1997; Thiery, 2002). La répression de la E-cadhérine par le facteur de transcription Snail1 est considérée comme un dogme depuis son observation au début des années 2000. Depuis cette mise en évidence, la découverte d'autres facteurs de transcription induisant la TEM a renforcé l'idée que ce processus est contrôlé par un programme transcriptionnel. L'ensemble de ces facteurs de transcription régule tous les phénotypes observés lors de la TEM : La perte des jonctions épithéliales, l'acquisition de la motilité mais aussi la résistance à la sénescence, l'apoptose, et la résistance aux radio- et chimiothérapies (Thiery et al., 2009).

En plus de ce programme transcriptionnel, de nombreuses évidences relient les microARNs à la régulation de la TEM. Comme décrit dans cette partie, les microARNs sont à la fois des régulateurs des facteurs de transcription, des régulateurs de la TEM et sont aussi capables de réguler les effecteurs de la TEM comme les transcrits codants pour des protéines impliquées dans des jonctions cellulaires, la migration, le cytosquelette d'actine etc.... L'impact des microARNs sur la TEM, et le fait qu'ils ciblent un grand nombre de transcrits, fait des microARNs des régulateurs aussi importants que les facteurs de transcription.

Au cours de ces dernières années, de nombreuses modifications d'épissage ont été observées au cours de la progression tumorale. En particulier, il a été identifié un programme d'épissage alternatif au cours de la TEM contrôlé par différents facteurs d'épissage comme ESRP et Rbfox2. Dans la partie suivante, je commencerai par détailler les mécanismes de régulation de la réaction d'épissage et de l'épissage alternatif. Dans un second temps, je décrirai les évidences des modifications d'épissage alternatif au cours de la progression tumorale et particulièrement au cours de la TEM.

Partie II : Epissage alternatif et progression tumorale

Le séquençage du génome humain au début des années 2000 a permis d'estimer que celui-ci est composé d'environ 20 000 gènes. Ce chiffre est cependant inférieur aux prévisions de l'époque qui tablaient sur 300 000 gènes. De fait, le génome humain contient un nombre de gènes assez similaire à d'autres espèces comme la souris, le poisson zèbre ou la drosophile. Le génome humain comprend environ 95% de gènes discontinus, c'est-à-dire que l'information codant les protéines (essentiellement codées par les exons) est séparée par de larges portions génomiques généralement non-codantes appelées introns. Les exons sont de courtes séquences dont la taille est comprise entre 50 et 250 nucléotides environ (moyenne 145). Les introns, séquences intragéniques généralement non codantes, ont été identifiés à la fin des années 70 (Berget, Moore, & Sharp, 1977). Leur taille est en moyenne 10 fois plus grande que celle d'un exon, ce qui signifie qu'ils constituent plus de 90% de l'unité de transcription. Les ARNm sont transcrits par la polymérase II. L'épissage est un processus nucléaire au cours duquel les introns sont excisés et mis bout à bout. Ce processus intervient co- ou post-transcriptionnellement.

Le premier objectif de cette seconde partie est de définir l'épissage et l'épissage alternatif et de préciser les mécanismes moléculaires de régulation de l'épissage alternatif. Le deuxième objectif est de mettre en évidence le rôle de l'épissage alternatif lors de la progression tumorale et notamment lors de la TEM.

A- La réaction d'épissage

Les sites d'épissage sont peu conservés et sont composés d'un site donneur, un site accepteur, un point de branchement et une séquence riche en pyrimidine (*figure 8*).

La réaction d'épissage est opérée par le spliceosome, un complexe macromoléculaire de plus de 200 protéines (Hegele et al., 2012). Les petites ribonucléoprotéines nucléaires (snRNP) sont des composantes du spliceosome. La réaction d'épissage fait appel à 5 snRNPs : U1, U2, U4, U5 et U6. U1 s'associe au site 5' d'épissage et U2 s'associe au point de branchement, le tout constitue le pré-spliceosome (complexe A). U4 et U6 font le pont entre U1 et U2 ; U5 permet la liaison avec le site 3' d'épissage et le tout constitue le spliceosome mature

(complexe B). La dissociation de l'ARN de U4 et U6 induit des changements de conformation, ce qui rend le complexe actif et permet des réactions de transestérification. La première réaction a lieu entre le 2'OH du point de branchement et la jonction du site 5' ce qui forme une boucle d'ARN appelée le lariat. La seconde réaction a lieu entre les jonctions 5' et 3'. De nombreuses protéines interviennent dans ce processus. On distingue notamment huit ARN hélicases qui catalysent les réarrangements ARN-ARN et ARN-Protéine : Sub2/UAP56, Prp5, Prp28, Brr2, Prp2, Prp16, Prp22, et Prp4 (Cordin, Hahn, & Beggs, 2012).

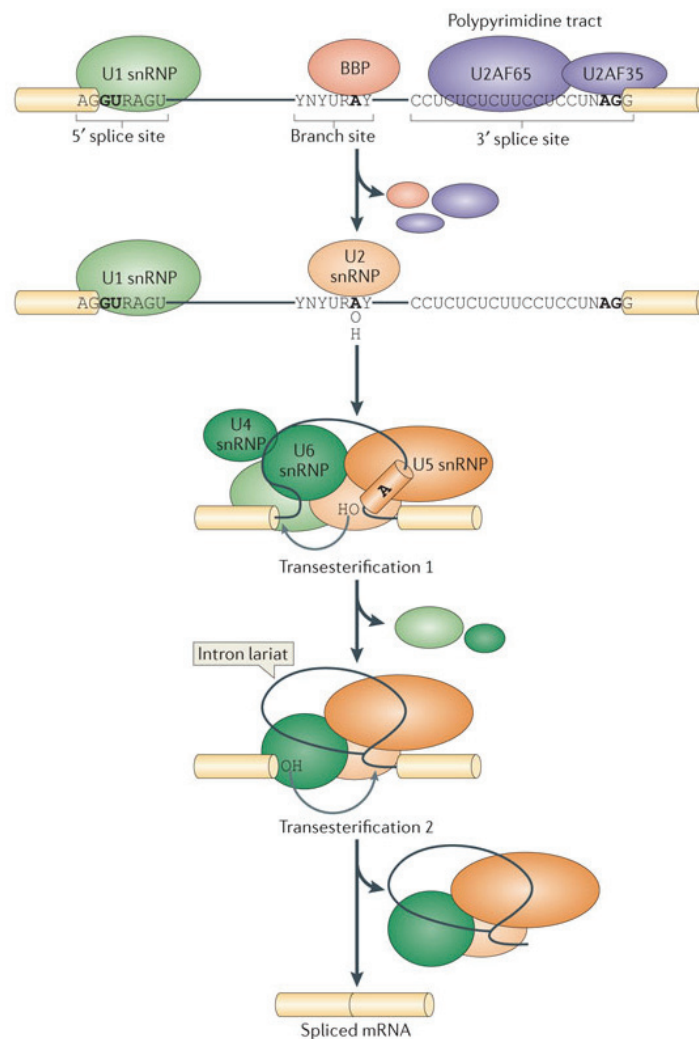


Figure 8 : Site d'épissage consensus et réaction d'épissage.

D'après A. R Kornblihtt & al. Nature Review Molecular Cell Biology.

B- Mécanisme de régulation de l'épissage alternatif

1- Régulation par les facteurs d'épissage

Les sites d'épissage sont déterminés par des séquences d'épissage qui peuvent être plus ou moins éloignées de la séquence consensus qui est la suivante : AG/UAAGU pour la liaison exon/intron, UAUAAAC pour la boîte de branchement et Y_n NCAG/G pour la liaison intron/exon. Un site d'épissage « fort » est plus proche de la séquence consensus qu'un site dit « faible ». La fréquence d'utilisation d'un site d'épissage est déterminée en partie par la force intrinsèque de chaque site. Cependant les séquences d'épissage sont très dégénérées et ne suffisent pas à définir un exon. Des facteurs d'épissage se fixent sur les éléments cis-régulateurs (séquences exoniques ou introniques) et sont capables de favoriser ou d'inhiber le recrutement du spliceosome et en particulier les snRNPs (*figure 9*). Il existe deux familles de facteurs d'épissage qui se fixent sur ces motifs : les protéines SR (Ser/arg rich) et les protéines hnRNP (heterogenous nuclear ribonucleoprotein) (*table Sup1*). Les protéines SR favorisent la reconnaissance du site d'épissage en facilitant le recrutement de U1 et U2. A l'inverse, les protéines hnRNP ont généralement un rôle répresseur en masquant les sites d'épissage (Busch et al., 2013). Les données les plus récentes de la littérature montrent que les protéines SR peuvent également réprimer l'épissage alors que les protéines hnRNPs peuvent le favoriser et agir de concert pour réguler ce processus. Leurs régulations dépendent également de la position de leurs recrutements sur les éléments cis-régulateurs par rapport à l'exon (Huelga et al., 2012; Pandit et al., 2013; Witten & Ule, 2011). L'épissage alternatif est donc régulé de manière combinatoire et compétitive par les facteurs d'épissage.

A ces deux familles s'ajoutent des facteurs d'épissages tissus ou cellules spécifiques. Par exemple, les protéines NOVA-1 et NOVA-2 sont exprimées dans le cerveau (Darnell, Jelen, Ule, & Marko, 2007), ESRP1 et ESRP2 sont exprimées dans les cellules épithéliales (Warzecha, Sato, Nabet, Hogenesch, & Carstens, 2009). En fonction de la position de ces protéines, elles peuvent favoriser ou inhiber l'épissage. Ces protéines contrôlent de manière spécifique des programmes d'épissage tissus ou cellules spécifiques.

Ainsi, la régulation de l'épissage alternatif est une compétition entre sites d'épissage et dépend de la présence et de la position des séquences cis-régulatrices ainsi que du niveau d'expression des facteurs d'épissage.

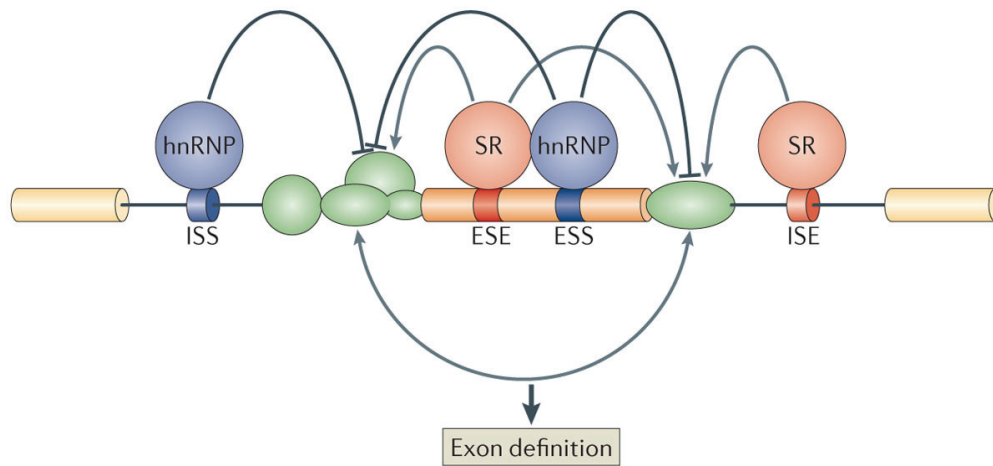


Figure 9 : Séquence Cis-régulatrice de l'épissage et facteurs d'épissage.

D'après A. R Kornblihtt & al. *Nature Review Molecular Cell Biology*. ESE (Exonic Splicing Enhancer), ISE (Intronic Splicing Enhancer), ESS (Exonic Splicing Silencer) et ISS (Intronic Splicing Silencer)

Grâce aux études à large échelle, il est possible, en tenant compte de la position des éléments régulateurs de l'épissage et de l'expression des facteurs d'épissage, de prédire l'inclusion ou l'exclusion d'un exon dans un tissu donné (Barash et al., 2010). Ce code de l'épissage a été utilisé pour valider des programmes d'épissage spécifiques à certains tissus (Barash et al., 2010). Cependant, une des limites de ce code de l'épissage est qu'il ne prend pas en compte les autres niveaux de régulation de l'épissage comme l'influence de la transcription ou de la chromatine.

2- Influence de la transcription et de la chromatine

Pendant longtemps la transcription et l'épissage ont été considérés comme des processus indépendants mais il apparaît à la lumière des études de séquençage à haut débit (Khodor et al., 2011) que l'épissage est réalisé co-transcriptionnellement et que ces deux mécanismes sont couplés. De fait, la molécule d'ARN pré-messager (pré-mARN) est une

molécule virtuelle car les exons sont épissés au fur et à mesure de leur transcription. Si l'épissage d'exons constitutifs apparaît co-transcriptionnel, l'épissage alternatif peut dans certains cas intervenir post-transcriptionnellement (Vargas et al., 2011). De plus, des facteurs de transcription, des co-régulateurs transcriptionnels (Auboeuf, Batsché, Dutertre, Muchardt, & O'Malley, 2007) et des protéines du remodelage et de la structure de la chromatine (Luco, Allo, Schor, Kornblihtt, & Misteli, 2010; Luco, Pan, et al., 2010) sont également capables d'influencer les choix d'épissage. Deux mécanismes complémentaires sont responsables de ce couplage entre transcription et épissage (figure 10). Premièrement, la cinétique d'élongation de la polymérase II influence directement l'épissage. En effet une diminution de la vitesse d'élongation laisse davantage de temps à l'intron, tout juste synthétisé pour être reconnu par le spliceosome (ex : Exon 33 de la fibronectine (Kornblihtt et al., 1997) et donc favoriser son inclusion. A l'inverse, une vitesse d'élongation plus élevée laisse moins de temps à des régulateurs (positifs ou négatifs) pour se fixer sur le transcrit en cours de synthèse et donc de favoriser l'inclusion ou l'exclusion d'exon (Kornblihtt et al., 2013). Deuxièmement, le recrutement des facteurs d'épissage par la machinerie transcriptionnelle est un processus clé dans les choix d'épissage. En effet de nombreux facteurs d'épissage sont recrutés par le domaine CTD (domaine carboxy-terminale) de la pol II (David, Boyne, Millhouse, & Manley, 2011) et des régulateurs de la transcription comme MED23 se lient à des facteurs d'épissage (ex : hnRNP L (Huang et al., 2012)).

Le mécanisme de couplage transcription/épissage est particulièrement important dans le cadre de la progression tumorale car de nombreux traitements anti-cancéreux utilisés couramment sont des inhibiteurs de l'élongation de la polymérase (ex : Camptothécine, Doxorubicine). L'hypothèse est que ces traitements pourraient modifier le répertoire des exons exprimés, ce qui peut entraîner la production d'isoformes avec des propriétés différentes, potentiellement de mauvais pronostic ou impliqués dans la résistance aux traitements.

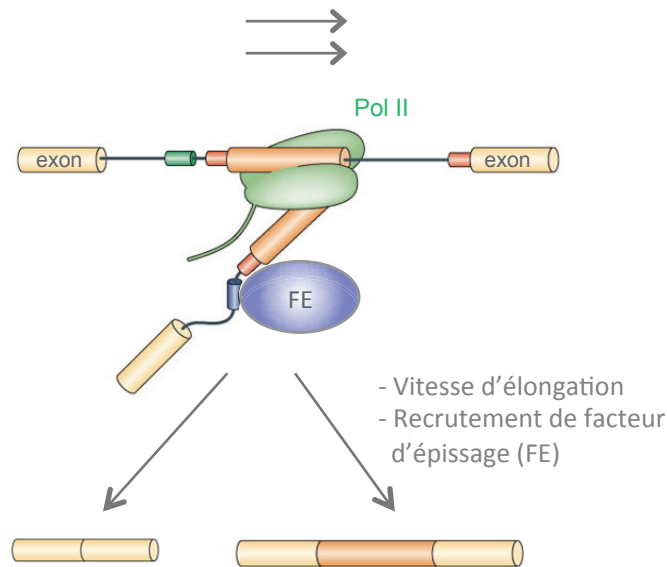


Figure 10 : Influence de la transcription sur l'épissage alternatif.

Modifié d'après A.R Kornblihtt & al. Nature Review Molecular Cell Biology.

Diverses études ont aussi pointé le rôle de la chromatine et des modifications épigénétiques dans la régulation de l'épissage alternatif. Tout d'abord, les modifications d'histones peuvent influencer la vitesse d'élongation de la polymérase et réguler l'épissage alternatif de la même manière que décrite dans le paragraphe précédent (Pelisch, Allo, Kornblihtt, & Schor, 2009). Les modifications d'histone ne sont pas distribuées aléatoirement le long des gènes. C'est le cas de la modification H3K9me2 qui est enrichie au niveau des exons. Des protéines de la chromatine (ex : MRG15 ou Psip1/ledgfp52) sont capables de se fixer spécifiquement sur cette modification et de recruter des facteurs d'épissage (respectivement PTB et SRSF1) pour influencer la décision d'épissage (*figure 11*) (Luco, Pan, et al., 2010; Pradeepa, Sutherland, Ule, Grimes, & Bickmore, 2012).

Les nucléosomes, apparaissent eux aussi positionnés non-aléatoirement le long des gènes. Ils enroulent une séquence d'ADN d'environ 150 paires de bases, une taille très similaire à celle d'un exon. Les nucléosomes sont enrichis au niveau des exons et ce positionnement a été proposé comme participant à la définition des exons (Schwartz, Meshorer, & Ast, 2009; Spies, Nielsen, Padgett, & Burge, 2009; Tilgner et al., 2009).

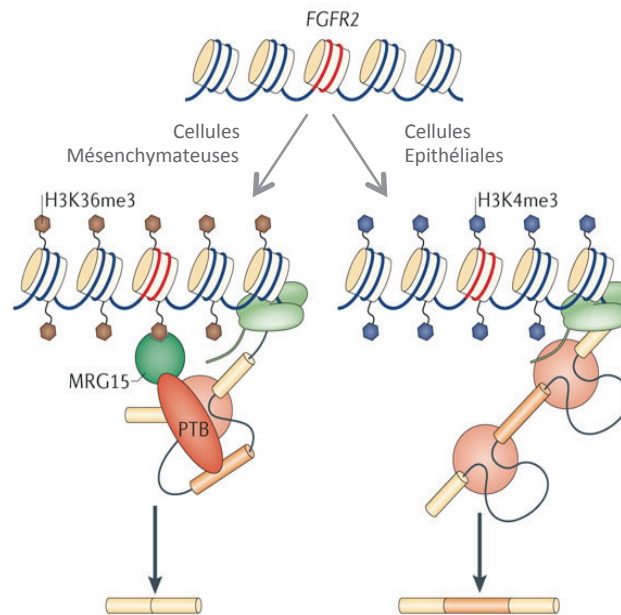


Figure 11 : Exemple d'influence de modifications de la chromatine sur l'épissage alternatif.

Modifié d'après A. R Kornblihtt & al. Nature Review Molecular Cell Biology.

3- Influence des structures secondaires.

Les facteurs d'épissage interagissent avec l'ARN grâce à différents motifs protéiques (ex : les domaines KH (hnRNP K homology), RRM (RNA recognition motifs) ou les motifs à doigt de zinc). Ces motifs reconnaissent des séquences d'ARN simple brin de 2 à 10 nucléotides (Auweter, Oberstrass, & Zu, 2006) (Table Sup 1). Cependant, les molécules d'ARN peuvent se structurer et adopter de nombreuses conformations grâce à des appariements intramoléculaires (*figure 12*). La formation de structures secondaires peut directement influencer la décision d'épissage. En effet, il a été montré que les structures secondaires stables sont enrichies au niveau des exons alternatifs avec un taux riche en GC (Y. Yang et al., 2011). Très récemment, il a été montré par l'équipe de G. YEO que la formation de structure secondaire est très importante pour l'épissage alternatif de l'exon 12 du gène ENAH. En effet, cette équipe a identifié une région activatrice de l'épissage situé en

aval de l'exon qu'elle régule. La particularité est qu'elle est située à plus de 500 pb du site 5' d'épissage (Lovci et al., 2013). La formation de structures secondaires apparaît donc comme un élément régulateur de la décision d'épissage.

Les structures secondaires de l'ARN peuvent masquer un site d'épissage, ou une séquence cis-régulatrice, ce qui entraîne un défaut de recrutement du facteur d'épissage. Au contraire, certaines structures secondaires permettent le rapprochement entre l'exon et une séquence cis-régulatrice et autorisent la réaction d'épissage. Les structures secondaires influencent aussi le choix des exons mutuellement exclusifs (*figure 12*) (Y. Yang et al., 2011). Les ARN hélicases, sont des enzymes capables de modifier les structures secondaires de l'ARN. De nombreuses ARN hélicases interviennent dans la réaction d'épissage et participent au recyclage des snRNPs (Netter, Weber, Benecke, & Wahl, 2009). DDX5 et DDX17 sont deux ARN hélicases de la famille des DEAD box pour lesquelles il a été montré qu'elles régulent l'épissage alternatif en modifiant des structures secondaires de l'ARN (voir Partie 3).

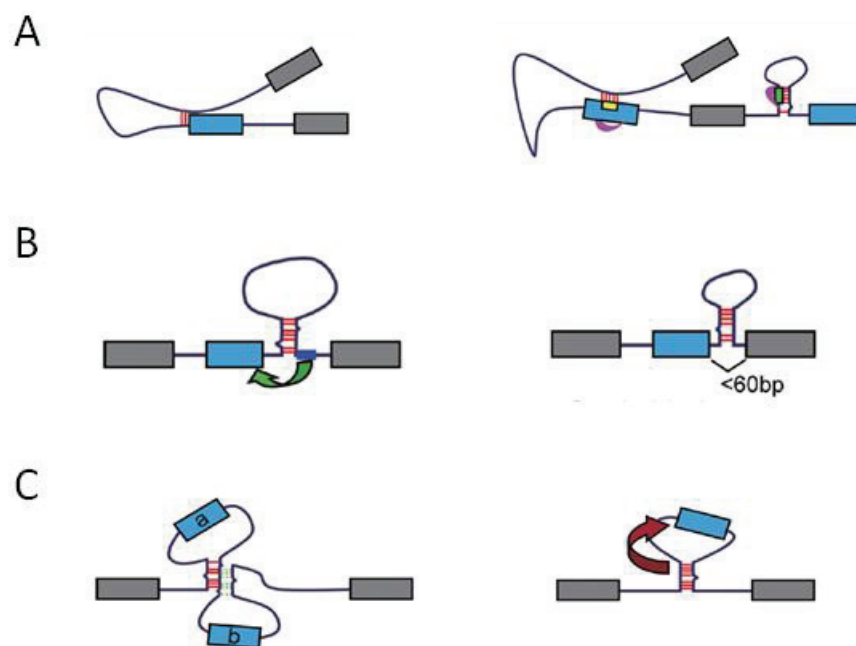


Figure 12 : Exemple de structure secondaire de l'ARN influençant les décisions d'épissage. (A) Structure affectant le recrutement de facteur d'épissage. (B) structure permettant le rapprochement de séquences cis-régulatrices. (C) Compétition entre structures secondaires.

Adapté d'après Jin & al RNA biology 2011.

C- Epissage alternatif et progression tumorale

L'altération de l'épissage alternatif est un phénomène retrouvé dans de nombreuses pathologies, notamment certaines maladies génétiques et le cancer. Plusieurs études ont permis d'observer la dérégulation de l'épissage dans les cancers et de mettre en évidence l'ampleur de ces dérèglements. L'importance de ce phénomène dans la progression tumorale a été soulignée au travers de deux aspects. Premièrement, des études à large échelle, réalisées notamment au sein de notre équipe, ont permis de mettre en évidence des changements majeurs en terme d'épissage entre des tissus tumoraux et des tissus sains ou des lésions bénignes, ou en comparant différents modèles de progression tumorale. De plus des altérations d'expression ainsi que des mutations de facteurs d'épissage au cours de la progression tumorale ont également pu être observées. Deuxièmement la fonction de certains variants retrouvés altérés au cours de la progression tumorale a été caractérisée. Ces études démontrent que ces variants ont des fonctions pro ou anti-tumorale.

1- Altération du programme d'épissage au cours de la progression tumorale

De nombreuses études à large échelle ont permis de définir l'ampleur du dérèglement du processus d'épissage alternatif au cours de la progression tumorale. L'équipe dans laquelle j'ai effectué ma thèse a réalisé une étude à large échelle pour étudier le transcriptome de tumeurs provenant du modèle 4T1 (présenté dans la première partie de mon introduction). L'ARN de tumeurs provenant de tumeurs primaires induites par l'injection de cellules 67NR, 168FARN, 4T07 et 4T1 a été analysé à l'aide des puces exons d'affymétrie. Les deux principales conclusions de ce travail indiquent que d'une part il est possible de caractériser l'agressivité de ces tumeurs en analysant les exons différenciellement régulés. Cela suggère, d'autre part, que l'expression d'exon alternatif est associé à la capacité des tumeurs primaires à former des métastases. De plus ces exons différenciellement retrouvés dans des tumeurs formant ou pas des métastases chez la souris sont associés à une survie sans métastases chez des patientes atteintes de cancer du sein (Dutertre et al., 2010). Ce type d'étude réalisé dans l'équipe sur un modèle cellulaire murin a

également été mené directement avec des échantillons de patientes. L'équipe de F. André a ainsi comparé le transcriptome de 120 échantillons de cancer du sein à 45 lésions bénignes. Cette étude a ainsi permis de définir 950 exons différentiellement exprimés entre échantillons tumoraux et échantillons bénins (André et al., 2009). Ces études, à large échelle, démontrent que l'épissage alternatif peut être un marqueur pour la prédiction de la formation de métastases chez l'Homme. Elles permettent également d'établir un répertoire d'exons différentiellement régulés au cours de la progression tumorale. Des candidats à des études fonctionnelles peuvent être alors définis qui permettront de déterminer la fonction et la relevance de chaque variant d'épissage dans la progression tumorale.

Ce type d'analyse à large échelle permet aussi l'observation des différences d'expression de facteurs d'épissage. L'étude menée par F. André, comparant des tumeurs du sein à des lésions bénignes a ainsi mis en évidence que les facteurs ou les protéines impliqués dans l'épissage apparaissent également dérégulés dans la progression tumorale. D'autres études ont montré des altérations d'expression de facteurs d'épissage. C'est le cas de SRSF1 (ASF/SF2) considéré comme un proto-oncogène (Anczuków et al., 2012). Ce facteur d'épissage contrôle notamment l'épissage du proto-oncogène RON. La sur-expression de SRSF1 entraîne l'exclusion de l'exon11 de RON, ce qui conduit à la production de Δ RON, une forme constitutivement active de cette tyrosine kinase capable de favoriser la migration (Ghigna et al., 2005). Certaines hnRNPs (A1 et A2) sous le contrôle de c-MYC régulent les exons mutuellement exclusifs de PKM (pyruvate kinase).

En plus des altérations du niveau d'expression, certains facteurs d'épissage apparaissent mutés dans des échantillons tumoraux. C'est par exemple le cas du facteur SF3B1 dans les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC). SF3B1 apparaît très fréquemment muté dans les LLC et ces mutations sont associées à une maladie plus agressive et à un taux de survie plus court des patients (Quesada et al., 2012).

2- Fonctions des variants d'épissage au cours de la progression tumorale.

Le rôle de l'épissage alternatif dans le cancer et la progression tumorale est également mis en avant par des études fonctionnelles sur différents variants d'épissage. Ces études ont permis de montrer que certains gènes peuvent coder pour des variants ayant des fonctions biologiques différentes dans le cadre de la progression tumorale. Les différences d'épissage observées dans les cancers peuvent être soit la conséquence de mutations affectant les séquences cis-régulatrices de l'épissage, soit la conséquence de l'activation ou à la répression aberrante de facteurs d'épissage.

Plusieurs caractéristiques des cellules tumorales décrites par Hanahan et Weinberg sont associées à des variants d'épissage qui contribuent au phénotype associé à ces caractéristiques. Par exemple, de nombreux gènes des voies apoptotiques sont capables de produire des isoformes pro ou anti-apoptotiques comme par exemple BCL-X ou Fas (Miura, Fujibuchi, & Unno, 2012). Le gène VEGF-A est également capable de produire deux variants d'épissage aux fonctions opposées pro ou anti-angiogénique (Oliveira & Pavarino, 2012) (*figure 13*). Les formes anti-apoptotique et pro-angiogénique sont retrouvées davantage exprimées dans les cellules cancéreuses (Bonnal, Vigevani, & Valcárcel, 2012) voir *figure 13*. La production de l'isoforme PKM2 dans les cellules cancéreuses leur permet de réaliser une glycolyse anaérobie et donc de survivre dans des conditions anaérobiques hostiles (effet Warburg) très fréquemment observées durant la progression tumorale (David, Chen, Assanah, Canoll, & Manley, 2010; Israelsen et al., 2013).

De plus, d'autres gènes fortement impliqués dans la progression tumorale comme TP53, Bard1 ou le récepteur aux androgènes (AR), codent pour différents variants d'épissage aux fonctions différentes (J. Chen & Weiss, 2014).

Ainsi plusieurs caractéristiques des cellules cancéreuses décrites par Hanahan et Weinberg, comme la résistance à la mort cellulaire, le dérèglement du métabolisme, l'induction de l'angiogénèse, l'activation de l'invasion ou la formation de métastases sont régulés, en partie, par des événements d'épissage.

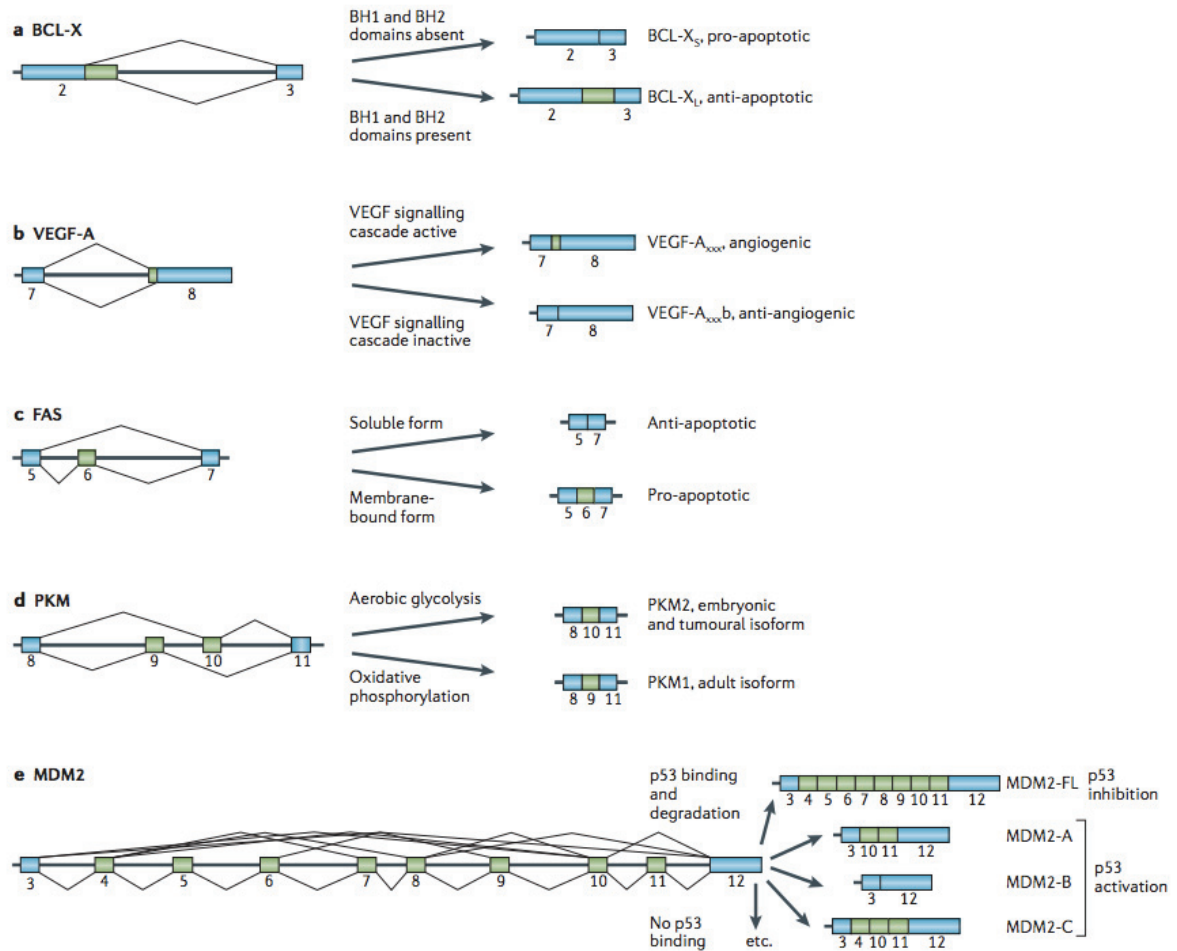


Figure 13 : Exemples de différentes isoformes produites par épissage alternatif relevantes au cours de la progression tumorale.

D'après Bonnal & Al. Nature Review Drug Discovery

Ces dernières années, de nombreuses études ont décrit les altérations d'épissage au cours de la progression tumorale ce qui a permis de souligner l'importance de ce phénomène. Cependant assez peu de variants ont été réellement caractérisés pour jouer un rôle dans la pathologie. Parmi les centaines d'exons régulés entre un tissu cancéreux et un tissu sain, le prochain objectif sera de définir lesquels participent effectivement au phénotype cancéreux. Le second challenge sera d'identifier les régulateurs de ces altérations afin de proposer des stratégies de traitement.

La partie suivante est consacrée aux événements d'épissage retrouvés au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse

D- Régulation de l'épissage dans la transition épithélio-mésenchymateuse.

Il est bien établi que les processus de différenciation cellulaire sont contrôlés par des facteurs de transcription (ex : MyoD dans la différenciation musculaire). Les événements d'épissage régulés aux cours de ces processus de différenciation sont spécifiquement associés à la fonction du tissu. Par exemple, les épissages alternatifs observés spécifiquement dans le cerveau sont contrôlés par un facteur d'épissage spécifique du cerveau (NOVA) et affectent des ARNs codants pour des fonctions neurales (Ule et al., 2005).

L'étude des isoformes de FGFR2, p120 catenin et ENAH (Mena) a permis de mettre en évidence l'épissage alternatif dans la TEM (Goswami et al., 2009; Keirsebilck et al., 1998; Savagner, Vallés, Jouanneau, Yamada, & Thiery, 1994). On sait par exemple que les exons mutuellement exclusifs de FGFR2 codent pour des récepteurs avec des affinités différentes pour le ligand FGF (X. Zhang et al., 1999) et que la forme mésenchymateuse de la p120-catenin réduit l'activité de RhoA, augmentant ainsi les capacités invasives des cellules (Yanagisawa et al., 2008). Enfin, on sait que les deux isoformes de ENAH ou MENA (Mammalian ortholog of the Drosophila protein ENA) régulent les interactions entre les filaments d'actine à l'extrémité des lamellipodes mais que seule la forme mésenchymateuse favorise la migration et l'invasion des cellules (Roussos, Balsamo, et al., 2011a).

L'arrivée de technologies permettant l'analyse de l'épissage alternatif à large échelle comme les puces ou le séquençage, a permis de mieux caractériser les événements induits lors de la TEM mais aussi de caractériser les régulateurs de ces événements d'épissage. Parmi les régulateurs identifiés, on distingue les protéines ESRP1 et ESRP2 (epithelial splicing regulatory protein 1/2) qui régulent l'épissage de FGFR2 et qui sont uniquement exprimés dans les cellules épithéliales (Hovhannisyan & Carstens, 2005). En effet leur expression est réprimée par les facteurs de transcription clés de la TEM, Snail1, ZEB1 et Twist (Horiguchi et al., 2012; Reinke, Xu, & Cheng, 2012; Shapiro et al., 2011). L'utilisation de puces jonctions a permis de montrer que ces protéines régulent différents types d'épissage alternatif (Warzecha et al., 2009) et que le programme d'épissage est abrogé lors de la TEM (Warzecha et al., 2010). ESRP1 et ESRP2 régulent également de très nombreux événements d'épissage des transcripts codant des protéines impliquées dans l'acquisition du phénotype mésenchymateux (protéines du cytosquelette, de fixation à l'actine, de la matrice extra-

cellulaire, des jonctions cellules-cellules, de Rho GTPase ou des composants de la voie MAP kinase) (Warzecha et al., 2010) (*Figure 14 table Sup S2*).

Un autre facteur d'épissage impliqué dans la TEM est le facteur Rbfox2 (RBM9) (Venables et al., 2013a; Venables, Vignal, Baghdiguian, Fort, & Tazi, 2012). Il est également connu pour être important dans la machinerie d'épissage des cellules souches embryonnaires (Yeo et al., 2009). Son expression est légèrement supérieure dans les cellules mésenchymateuses que dans les cellules épithéliales. Il régule un ensemble d'exons participant à la définition de la cellule mésenchymateuse. De nombreux exons régulés sont communs avec les cibles de ESRP1/2 (mais régulés dans le sens inverse) (Braeutigam et al., 2013; Venables et al., 2013b). L'analyse à large échelle des cibles de ESRP1 et ESRP2 ainsi que RbFox2 a permis de définir un code d'épissage relatif à ces deux facteurs (*figure 14*). Lorsque les protéines ESRPs ou Rbfox2 se fixent sur l'intron n, cela favorise l'inclusion de l'exon n. A l'inverse, si les protéines ESRPs se fixent sur l'exon n ou sur l'intron n-1, cela favorise l'exclusion de l'exon n (*figure 14*).

De plus, les différents travaux sur ESRPs et RBfox2 ont montré que la sur-expression ou l'extinction de ces protéines est suffisante pour établir une TEM partielle en utilisant des marqueurs phénotypiques comme la migration cellulaire, le remodelage du cytosquelette d'actine ou l'expression de protéines épithéliales ou mésenchymateuses. Cela démontre que l'épissage joue un rôle majeur dans la transition épithélio-mésenchymateuse. Dans le contexte du cancer du sein, les protéines ESRPs sont très peu exprimées dans le sous-type des lignées « Claudine-low » (basal B) qui sont les plus agressives (Lapuk et al., 2010; Neve et al., 2006). Cependant, à ce jour, aucune étude n'a associé l'expression de ces protéines régulatrices de l'épissage dans la TEM à l'agressivité dans des tumeurs humaines.

D'autres facteurs d'épissage ont été impliqués dans la TEM comme SRSF1 qui contrôle notamment l'épissage de RON (Ghigna et al., 2005) et la Rho GTPase Rac1 (Matos & Ã, 2009). SRSF1 peut être régulé par un autre facteur d'épissage, SAM68 en réponse à la voie ERK. Ces facteurs sont exprimés de façon plus ubiquitaires. Les facteurs d'épissage comme MBNL1, ou des membres de la famille des hnRNPs sont également impliqués dans la régulation de la TEM (Shapiro et al., 2011).

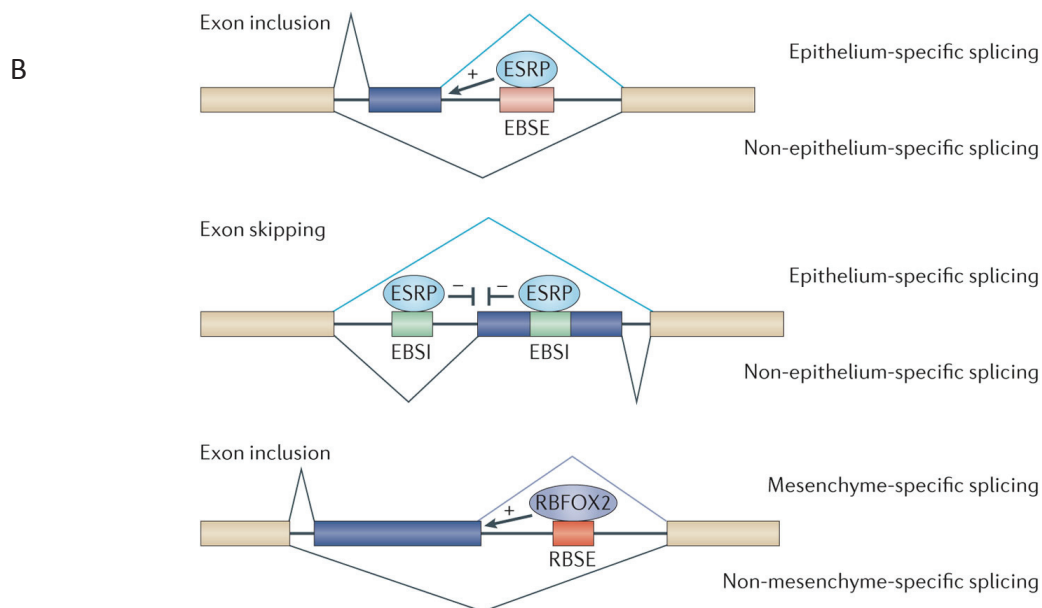
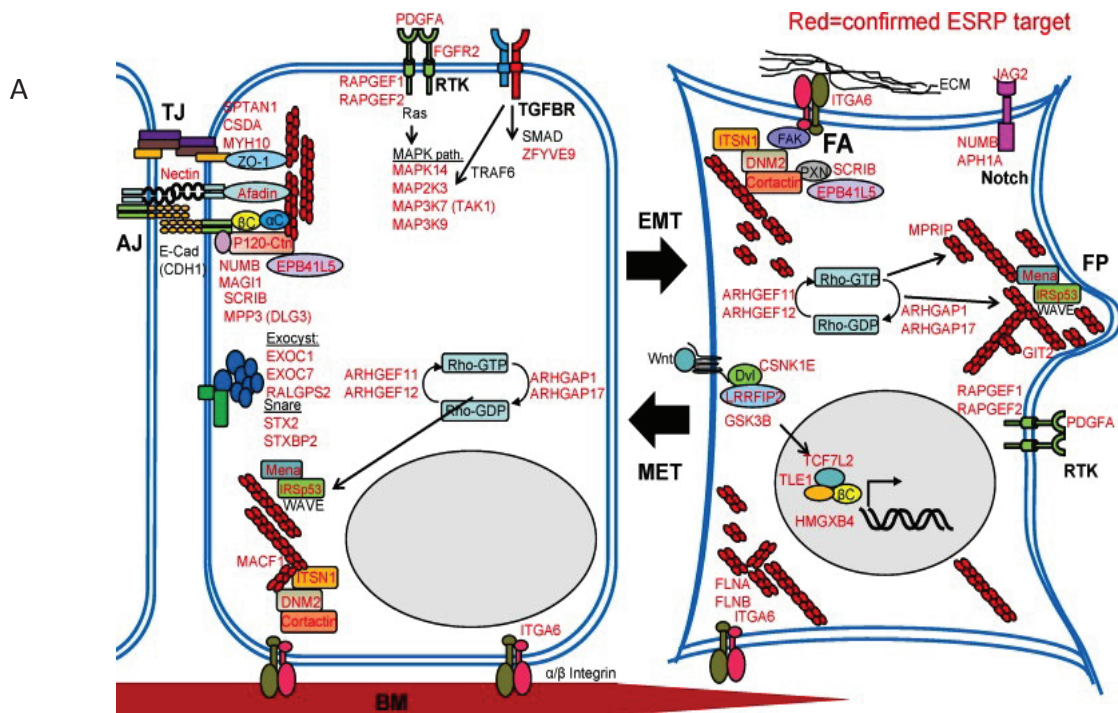


Figure 14 : (A) Fonction et localisation des cibles de ESRP.

(B) Code d'épissage relatif aux protéines ESRP et RBfox2.

EBSE=ESRP binding slicing enhancer, ESBI=ESRP binding splicing inhibitor, RBSE=RbFox2 binding splicing enhancer. D'après Warzecha & Carsten Seminars in cancer biology 2012 et De Craene B et Berx G Nature Review Cancer 2013.

Conclusion

L'épissage alternatif est un processus qui permet de modifier le message de l'expression des gènes. La majorité des gènes humains sont soumis à cette régulation ce qui fait de l'épissage alternatif une des étapes majeures de l'expression des gènes. Ce processus est contrôlé, en partie, par des facteurs d'épissage qui peuvent avoir une expression différentielle en fonction des tissus ou du type cellulaire. Il est indispensable dans des processus cellulaires clés, tels que la différenciation mais également dans de nombreuses pathologies.

Au cours de la dernière décennie, de nombreuses études ont permis de montrer l'expression aberrante d'un grand nombre d'acteurs de l'épissage alternatif dans des tissus cancéreux en comparaison aux tissus sains. Ceci révèle qu'il s'agit d'un processus régulé au cours de la progression tumorale. En identifiant certains régulateurs de ces événements, il apparaît - depuis seulement quelques années - que l'épissage alternatif est un programme d'expression des gènes régulé au cours de la progression tumorale et en particulier pendant la TEM. Les facteurs ESRP1/2 et rbfox2 apparaissent comme les régulateurs majeurs de la TEM observés dans des modèles cellulaires cancéreux.

La partie suivante sera consacrée aux ARN hélicases à motif DEAD box DDX5 et DDX17 et à leurs fonctions dans les différentes étapes du métabolisme des ARNs. J'explicitai notamment leurs fonctions dans la régulation de l'épissage et leurs fonctions au cours de la progression tumorale.

Partie III : Les ARN hélicases DDX5 (p68) et DDX17 (p72).

Les ARN hélicases sont des enzymes capables de lier et d'utiliser l'ATP pour remodeler les structures secondaires de l'ARN et des complexes ARN-Protéine. Contrairement aux ADN hélicases, les ARN hélicases ne peuvent modifier que de courtes séquences (environ 10pb) (Q. Yang & Jankowsky, 2006). Les ARN hélicases sont très conservées et jouent un rôle dans la majorité des étapes du métabolisme de l'ARN, depuis la transcription jusqu'à la traduction (Janknecht, 2010). Après une introduction sur les ARN hélicases, et en particulier sur les ARN hélicases à motif DEAD, l'objectif de cette partie sera de détailler les rôles de deux de ces ARN hélicases, DDX5 et DDX17, dans les différents processus du métabolisme de l'ARN. Par la suite, je préciserai les évidences qui relient les ARN hélicases DDX5 et DDX17 au développement tumoral et à la TEM.

A- Les ARN hélicases à motif DEAD

Les ARN hélicases sont organisées en six grandes familles en fonction de leurs structures et de leurs activités cellulaires. Les ARN hélicases à motif DEAD, appartiennent à la deuxième famille. Cette dernière est composée de plus de 37 membres chez l'Homme dont DDX5 et DDX17 (Fairman-williams & Guenther, 2010). Les ARN hélicases de cette famille possèdent des motifs de fixation à l'ARN et d'hydrolyse à l'ATP extrêmement conservés (*figure 15*). Les motifs Q, I, II et VI sont impliqués dans l'hydrolyse de l'ATP. L'acide aminé D (acide aspartique) du motif caractéristique DEAD interagit avec l'ion magnésium complexé avec l'ATP. Cette interaction est essentielle pour l'établissement d'une poche qui, en association avec les interactions intramoléculaires entre les motifs I et II, les motifs II et III et les motifs II et VI, permet l'établissement d'un site actif enzymatique requis pour l'hydrolyse de l'ATP (Cordin et al., 2012; Shi, Cordin, Minder, Linder, & Xu, 2004). L'acide aminé K (lysine) du motif I établit une liaison hydrophobe avec le β -phosphate de l'ATP (*figure 15*). Toute mutation ponctuelle sur ce résidu abolit l'activité ATPase de la protéine (Caruthers & McKay, 2002; Cordin, Tanner, Linder, & Banroques, 2004). Le mutant portant cette mutation est utilisé lors des différentes expériences de restauration fonctionnelle réalisées dans les différents articles présentés dans la partie résultat.

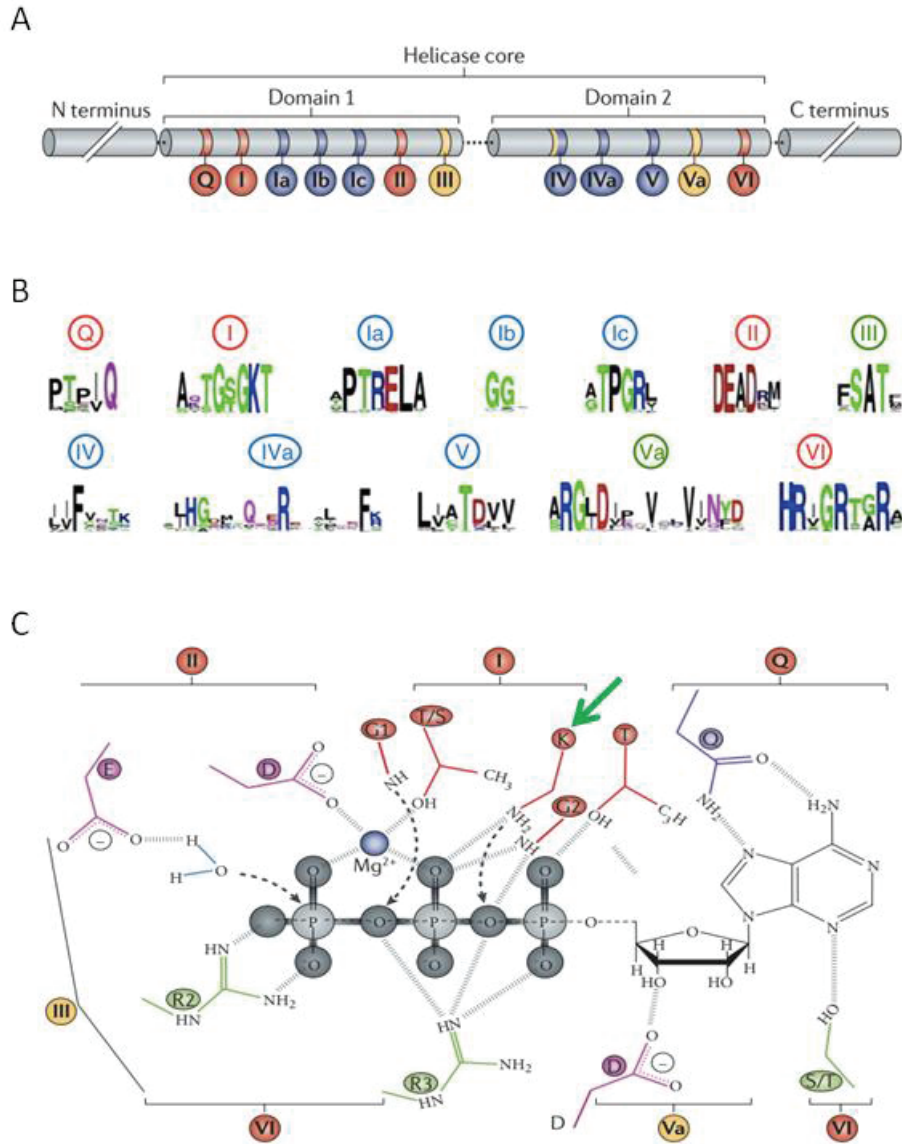


Figure 15 : motifs des ARN hélicases DEAD.

(A) schéma de la distribution des motifs

(B) Séquence des motifs. En rouge les motifs impliqués dans l'hydrolyse de l'ATP, en bleu les motifs impliqués dans la liaison avec l'ARN. (C) Schéma des liaisons hydrophobes entre les acides aminés des motifs Q, I, II et VI et l'ATP. La flèche verte indique le résidu lysine muté afin d'abolir l'activité ATPase de DDX5 et DDX17. Adapté d'après Linder P & Jankowsky E, NRMCB, 2011 et Putnam A.A & Jankowsky E, BBA, 2013.

Les ARN hélicases de la deuxième famille sont associées à toutes les étapes du métabolisme de l'ARN (figure 16). Les grandes étapes du métabolisme de l'ARN nécessitent le recrutement de nombreuses ribonucleoprotéines et de nombreux réarrangements structuraux qui sont médiés par ces ARN hélicases (ex : le spliceosome, la machinerie de traduction).

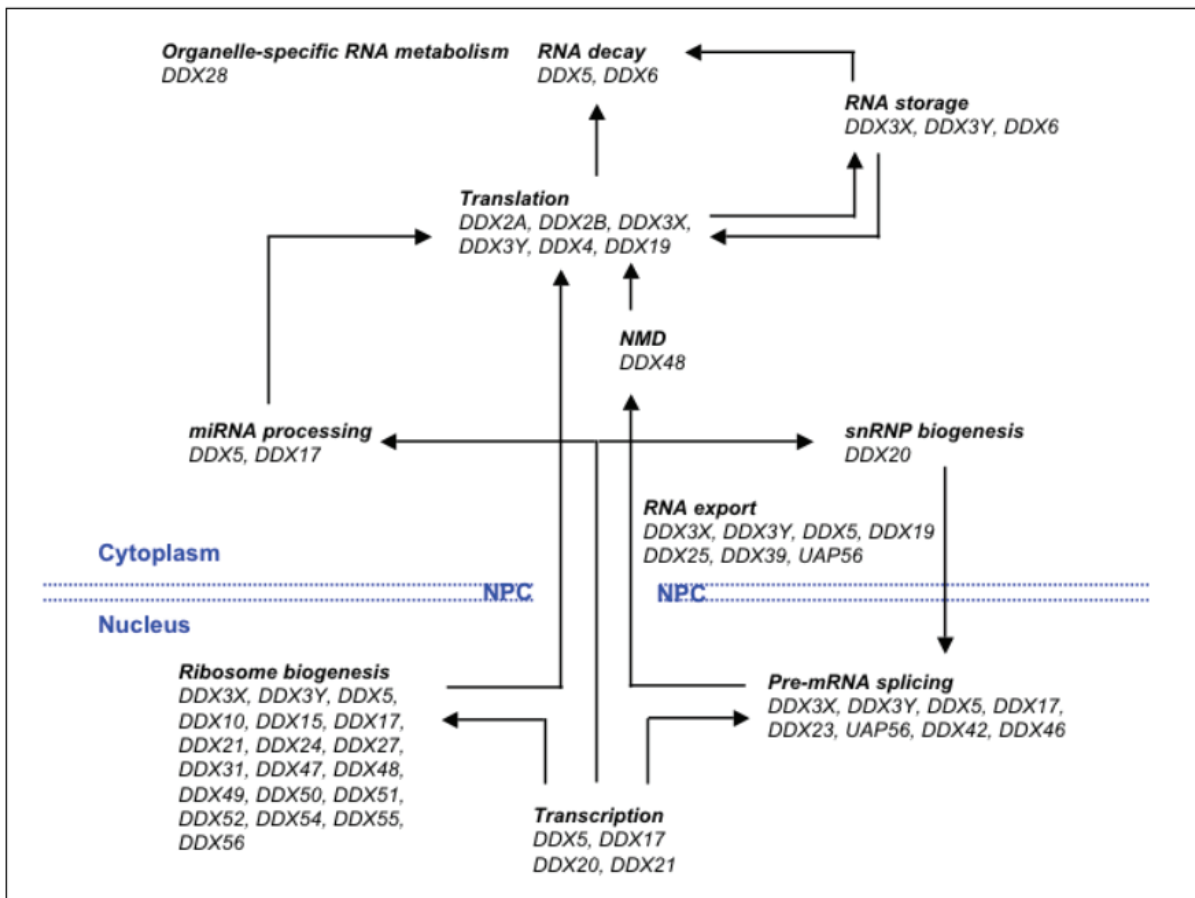


Figure 16 : Représentation des processus cellulaires impliquant les ARN hélicases à motifs DEAD.

Adapté d'après Linder P & Jankowsky E, NRMCB, 2011. Les ARN hélicases sont nécessaires à la transcription, la biogénèse des ribosomes et à l'épissage, des étapes nucléaires. Ces protéines sont aussi impliquées dans des étapes cytoplasmiques comme la traduction ou la dégradation des ARNs.

B- Fonctions moléculaires des ARN hélicases DDX5 et DDX17.

Les ARN hélicases DDX5 et DDX17 sont deux membres typiques de la famille à motifs DEAD. Elles sont impliquées dans la transcription, l'épissage, l'export, la maturation des microARNs, et la dégradation des ARNs. DDX5 et DDX17 ont une activité ATPase et sont capables de dérouler (Janknecht, 2010). DDX5 et DDX17 sont deux protéines paralogues. DDX17 a été identifiée postérieurement à DDX5 grâce à son homologie avec cette protéine. Le domaine hélicase et les neuf domaines (Q, I, Ia, Ib, II, III, IV, V et VI) sont identiques à plus de 90% entre ces deux protéines. Les domaines N- et C- terminaux sont, quant à eux, plus divergents avec respectivement 60% et 30% d'identité (voir figure 17).

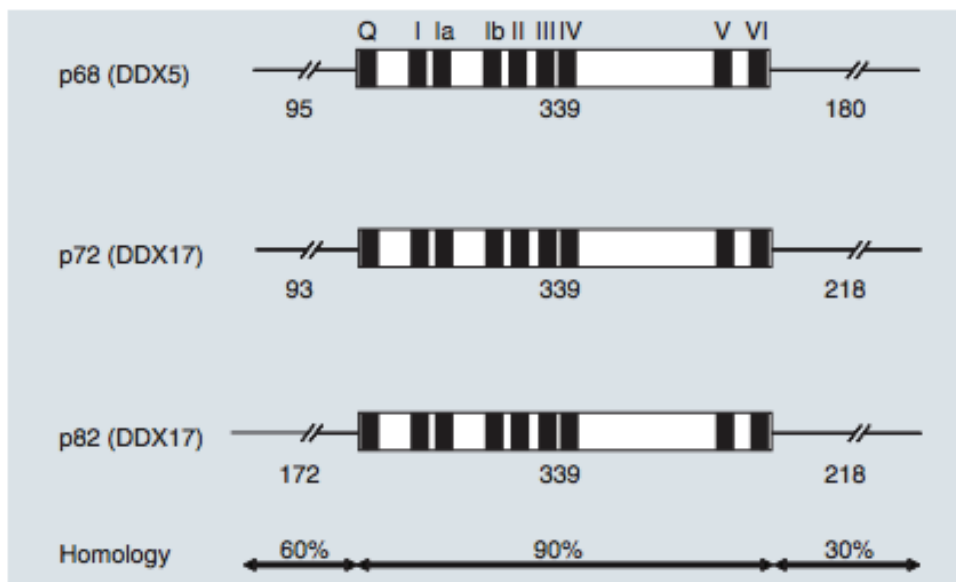


Figure 17 : Structure et homologie des ARN hélicases Ddx5 et Ddx17.

D'après Fuller-pace & Moore . Future Oncol. 2011.

1- Rôle dans la transcription

DDX5 puis DDX17 interagissent avec des facteurs de transcription et sont capables de moduler positivement ou négativement leurs activités. DDX5 et DDX17 sont donc des co-régulateurs transcriptionnels qui interagissent avec la polymérase II (Rossow & Janknecht, 2003). La première évidence du rôle de DDX5 dans la régulation de la transcription a été

démontrée au travers son rôle de co-activateur du récepteur aux estrogènes (ER α) (Endoh et al., 1999). Ce rôle a également été décrit pour DDX17 (Watanabe et al., 2001) et étendu à d'autres récepteurs nucléaires comme le récepteur aux androgènes (AR) (Clark et al., 2008) et le récepteur à la vitamine D (Wagner et al., 2012). DDX5 est un co-activateur du suppresseur de tumeur p53, et contrôle la transcription de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Nicol et al., 2012) DDX5 et/ou DDX17 sont également impliqués dans la différenciation cellulaire où ils jouent le rôle de co-activateurs de différents facteurs de transcription comme Runx2 (Jensen et al., 2008) ou MyoD (Caretta et al., 2006) (*table 4*). Le rôle de DDX5 et DDX17 apparaît particulièrement important pour la mise en place des processus de différenciation contrôlés par ces facteurs de transcription. Ainsi DDX5 et/ou DDX17 sont nécessaires à la différenciation ostéoblastique et à la différenciation du muscle squelettique. Un travail, publié récemment dans l'équipe, a montré que DDX5 et DDX17 sont des co-régulateurs de NFAT5, facteur de transcription impliqué dans la migration cellulaire (Germann et al., 2012). DDX5 co-régule également Smad3 (Warner et al., 2004) mais les gènes cibles de DDX5/Smad3 n'ont pas été identifiés. DDX5 interagit également avec la β -caténine (voir partie 3.3). Les fonctions de co-activateurs transcriptionnels de DDX5 et DDX17 impliquent le recrutement d'autres co-activateurs comme P/CAF ou p300/CBP (deux acétyl-transférases).

DDX5 et DDX17 jouent également le rôle de co-répresseurs transcriptionnels en recrutant des histones déacétylase (HDAC) 1, 2 et 3 (Carter, Lin, Liu, Yang, & Liu, 2010; Jacobs et al., 2007; Wilson et al., 2004). Ces deux fonctions (de co-activateur ou co-répresseur) sont probablement dirigées par une balance entre acétyltransférases et les histones déacétylases. Il a également été montré que DDX5 stabilise le complexe cohesin/CTCF avec l'ARN non codant SRA participant ainsi à la fonction d'insulation (Yao et al., 2010).

DDX5 et DDX17 sont donc des protéines qui jouent un rôle important dans le recrutement de composants essentiels de la machinerie transcriptionnelle en faisant le lien entre le facteur de transcription et des protéines co-régulatrices comme des modificateurs de la chromatine. A la lumière de toutes ces études, il apparaît que les fonctions ATPase et hélicase ne sont pas requises dans leur fonction de co-régulateur transcriptionnel (Fuller-Pace, 2013; Janknecht, 2010) ce qui suggère que ces protéines sont multifonctionnelles et

que leurs différents domaines protéiques sont différenciellement impliqués dans plusieurs processus cellulaires.

	Facteurs de Transcription	Autres facteurs influençant la transcription
Ddx5	ER α AR VDR p53 Runx2 NF- κ B Smad3 E2F1 β -catenin	HDAC1/2/3 ⁻ SRC-1 SRA MAML1/Notch1 CBP/p300 TBP TFIIA Brg-1 P/CAF
Ddx17	ER α p53	SRC-1, SRA, CBP, p300, P/CAF HDAC1/2/3
Ddx5/Ddx17	MyoD NFAT5	

Table 4 : Facteurs de transcription et protéines régulatrices de la transcription interagissant avec DDX5 et DDX17. Données compilées à partir de *Fuller-pace & Moore . Future Oncol. 2011.*

2- Rôle dans l'épissage

DDX5 et DDX17 jouent un rôle important dans l'épissage notamment grâce à leurs fonctions ATPase et hélicase (Lin, Yang, Yang, Huang, & Liu, 2005).

Des analyses par spectrométrie de masse, ont permis d'identifier DDX5 comme composant du spliceosome (Neubauer et al., 1998) et plus précisément du pré-spliceosome (Hartmuth et al., 2002). Des études biochimiques ont montré que DDX5 ne participe pas à la reconnaissance du site 5' d'épissage par le snRNP U1 mais aide à la dissociation du snRNP U1 au niveau du site 5' d'épissage permettant ainsi le passage du pré-spliceosome au spliceosome (Lin et al., 2005; Q. Liu et al., 2008; Z. Liu, 2002). L'activité hélicase est nécessaire à la dissociation de U1 mais cette propriété n'est pas requise pour le recrutement du tri-snRNP U4, U6/U5. A la lumière de ces différents travaux réalisés par le groupe de Z.R Liu, DDX5 apparaît comme un composant essentiel du spliceosome.

DDX5 et DDX17 sont impliquées dans la régulation de l'épissage alternatif de plusieurs transcrits. Par exemple, DDX5 régule l'épissage alternatif de h-ras avec d'autres facteurs d'épissage (Guil, Gattoni, Stévenin, Bach-elias, & Ste, 2003). Elle est également capable de dérouler une structure secondaire au niveau du site 5' d'épissage de l'exon 10 de Tau permettant ainsi la reconnaissance du site 5' par U1 snRNP (Kar et al., 2011). L'épissage de l'exon 5 de la prooporméline T cardiaque est aussi régulé par DDX5 qui favorise la reconnaissance d'un site de fixation pour le facteur d'épissage MBNL1 dans un modèle de dystrophie myotonique (Laurent et al., 2012). Ces deux derniers exemples permettent de montrer que DDX5 régule l'épissage via son rôle dans la modification de la structure secondaire de l'ARN. DDX17 est capable de réguler l'épissage alternatif de CD44 (Honing et al., 2002). Il s'agit de l'unique étude montrant l'implication de DDX17 dans l'épissage alternatif.

DDX5 est donc un régulateur de l'épissage qui agit à plusieurs niveaux de la régulation : aide à la reconnaissance du site 5', dissociation du U1 snRNP et modification de l'accessibilité à d'autres facteurs d'épissage.

3- Rôle dans la maturation des microARNs

De nombreuses évidences relient DDX5 et DDX17 à la maturation des microARNs. En effet, des analyses par spectrométrie de masse, ont permis d'identifier DDX5 comme composant du complexe Drosha et la déplétion de DDX5 ou de DDX17 conduit à des altérations du métabolisme de nombreux microARNs (Fukuda et al., 2007; D. Wang, Huang, & Hu, 2012). L'activité hélicase de DDX5 et DDX17 est requise pour la maturation des microARNs. En effet, il a été montré que cette fonction permet de rendre le pri-microARN accessible pour le clivage par Drosha (Fukuda et al., 2007). De plus l'interaction entre DDX5 et Drosha ainsi que p53 et les protéines Smads sont également nécessaires à la maturation de certains microARNs comme miR-21 (Davis, Hilyard, Lagna, & Hata, 2008; Suzuki et al., 2009). Ces données renforcent l'idée d'une interaction fonctionnelle entre DDX5 et les protéines Smads (Warner et al., 2004) et p53 (Bates et al., 2005). DDX5 joue également un rôle dans la maturation du pré-microARN en aidant à la formation du complexe RISC (Salzman, Shubert-Coleman, & Furneaux, 2007). Enfin DDX5 est aussi requise pour dérouler

le précurseur du microARN let-7 *in vitro* (Salzman et al., 2007) et participe à la maturation de microARNs tels que miR-21 et miR-182 qui ont pour cibles des composants du cytosquelette d'actine (D. Wang et al., 2012). Ainsi, il est proposé que DDX5 contribue au réarrangement du cytosquelette d'actine via sa fonction régulatrice dans la maturation des microARNs ayant pour cible les composants du cytosquelette (D. Wang et al., 2012).

L'ensemble de ces études révèle l'implication de DDX5 et DDX17 dans la maturation des microARNs, mais il se peut également que ces protéines interviennent en amont, notamment au niveau de la transcription de ces microARNs ou de manière indépendante à leur activité d'ARN hélicase.

4- Fonctions de DDX5 et DDX17 dans les autres processus du métabolisme de l'ARN

Parmi les autres fonctions de DDX5 et DDX17 dans le métabolisme de l'ARN, on distingue leur implication dans la maturation de l'extrémité 3' des ARNs (clivage et polyadénylation). Dans ce processus, DDX5 interagit avec SF-A qui participe au clivage de l'ARN pré-messager en association avec PSF et p54nrb (Geißler, Altmeyer, Stein, Uhlmann-Schiffler, & Stahl, 2013). Chez la drosophile, DDX5 régule le relargage de la polymérase de la chromatine (Buszczak & Spradling, 2006a) et chez la levure, la déplétion de DDX5 (DBP2) conduit à de multiples défauts de maturation des ARNs notamment au niveau de la maturation des extrémités 3' (Cloutier, Ma, Nguyen, & Tran, 2012).

La localisation de DDX5 et DDX17 n'est pas restreinte au noyau (Lamm, Nicol, Fuller-Pace, & Lamond, 1996), puisque de nombreuses études révèlent leur localisation cytoplasmique (Rossow & Janknecht, 2003; Shin, Rossow, Grande, & Janknecht, 2007; L. Yang, Lin, & Liu, 2006). En particulier, DDX5 est une protéine capable de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme (H. Wang, Gao, Huang, Yang, & Liu, 2009) où elle est nécessaire à l'export d'ARN messenger (ex : PS2) (Zonta et al., 2012). De plus, DDX5 interagit avec DDX3 dans le cytoplasme au cours de la phase G2/M (Choi & Lee, 2012) et une étude menée par le groupe de ZR Liu, DDX5 révèle que DDX5 interagit avec le calcium et la

calmoduline au niveau des lamellipodes des cellules migratoires. D'après les auteurs, cette fonction de DDX5 pourrait avoir un impact sur la migration des cellules au cours de la progression tumorale (D. Wang et al., 2012).

Chez la levure, DDX5 interagit avec UPF1, une ARN hélicase jouant un rôle majeur dans le NMD (non-sens mediated decay) et la déplétion de DDX5 (Dpd2) conduit à l'accumulation d'ARN non-sens (Bond, Mangus, He, & Jacobson, 2001). Dans des cellules humaines, DDX5 et DDX17 interagissent avec UPF3 et sont capables de réguler la stabilité de leurs ARNs (Geißler et al., 2013). Ces résultats expliquent en partie pourquoi la déplétion de l'une de ces protéines conduit à l'augmentation de son paralogue.

DDX5 et DDX17 sont également impliquées dans la maturation de l'ARN ribosomique chez la levure et dans des cellules humaines (Bond et al., 2001; Jalal, Uhlmann-Schiffler, & Stahl, 2007). La déplétion de ces protéines conduit à des défauts de maturation des ARN ribosomiques et à une perturbation des structures nucléolaires (Jalal et al., 2007).

La fonction hélicase de DDX5 et/ou DDX17 est requise aux cours de ces différents processus qui nécessitent le remodelage de la structure secondaire de l'ARN (maturation des ARN ribosomique) ou le remodelage de complexes ribo-protéiques (Maturation en 3', NMD, maturation des ARN ribosomique, export nucléaire).

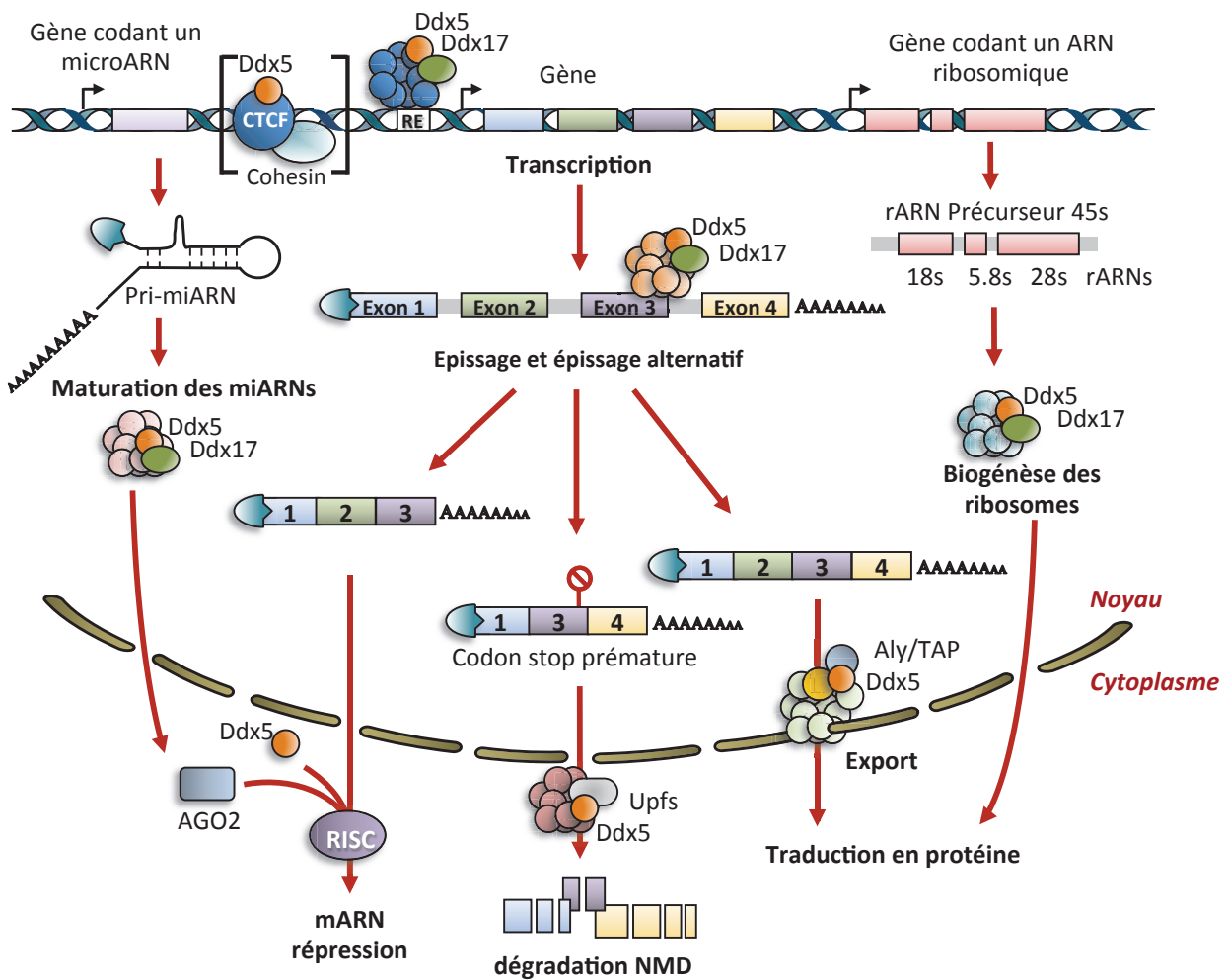


Figure 18 : Schéma des différents rôles de DDX5 et DDX17 dans la maturation de différents ARNs.

Amicalement partagé par Simon Samaan.

5- Modification post traductionnelles

DDX5 et DDX17 participent à de nombreuses fonctions cellulaires du métabolisme des ARNs et les modifications post-traductionnelles sont un aspect important de la régulation de l'activité de ces protéines.

DDX5 et DDX17 peuvent être ubiquitinylées : poly-ubiquitinylée pour DDX5 (Causevic et al., 2001) et mono-ubiquitinylée pour DDX17 (Mooney, Goel, D'Assoro, Salisbury, & Janknecht, 2010). DDX5 et DDX17 sont ubiquitinylées sur une lysine localisée en N-terminale

(K53 pour DDX5 et K50 pour DDX17). DDX5 et DDX17 peuvent également être SUMOylées (Jacobs et al., 2007; Mooney, Grande, Salisbury, & Janknecht, 2010). Ces deux modifications post-traductionnelles modifient la stabilité de DDX5 et DDX17 et affectent leurs activités de transactivation de la transcription ((Mooney, Grande, et al., 2010) (*figure 18*).

DDX5 peut également être phosphorylée, ce qui impacte plusieurs de ses fonctions. La phosphorylation de DDX5 par la protéine kinase C (PKC) (Buelt, Glidden, & Storm, 1994; Rosenberger et al., 2002) impacte l'activité hélicase et la capacité de DDX5 à fixer l'ARN (Buelt 1994 et Yang 2004). La phosphorylation régule donc son activité hélicase. DDX5 est également phosphorylée en réponse au PDGF par c-Alb sur la tyrosine Y593 ce qui a un impact sur sa capacité oncogénique. Cet aspect sera détaillé dans la partie traitant du rôle de DDX5 dans la transition épithélio-mésenchymateuse. DDX17 ne possède pas de tyrosine en position 593 et ne peut donc pas être phosphorylée. DDX5 peut également être phosphorylée par la protéine kinase p38 (MAPKp38) sur la sérine 197. Cette modification affecte la localisation de DDX5 et impacte son rôle dans la maturation des microARNs (Hong et al., 2013).

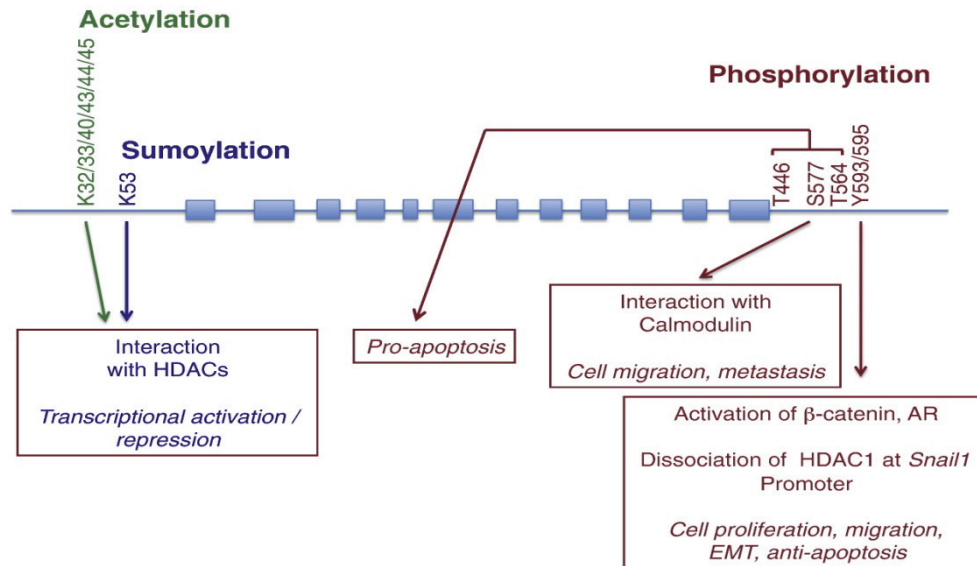


Figure 19 : Modification post-traductionnelle de DDX5 et DDX17 : implication sur leurs fonctions.

D'après Fuller-Pace *Biochimica et Biophysica Acta* 2013.

C- Rôles des ARN hélicases DDX5 et DDX17 dans la progression tumorale et la transition épithélio-mésenchymateuse.

Les multiples fonctions de DDX5 et DDX17 en font des protéines essentielles dans le développement. Chez la souris la suppression de DDX5 ou DDX17 est létale à l'état embryonnaire (DDX5) ou deux jours après la naissance (DDX17) (Fukuda et al., 2007). Chez la levure ou la drosophile, DDX5 et DDX17 jouent un rôle primordial dans le cycle cellulaire et la survie (Barta & Iggo, 1995; Buszczak & Spradling, 2006b; Iggo et al., 1991). L'expression et/ou l'activité de ces protéines sont modifiées dans de nombreux cancers. La plupart du temps, DDX5 et DDX17 ont des propriétés oncogéniques pro-prolifératives et pro-migratoires mais dans certains cas et en fonction du contexte, elles peuvent avoir des fonctions anti-prolifératives et suppresseur de tumeur.

1- Implication de DDX5 et DDX17 dans la progression tumorale

De nombreuses études décrivent DDX5 et DDX17 comme des proto-oncogènes. Cela est basé sur deux aspects. Premièrement DDX5 et/ou DDX17 sont surexprimées dans différents cancers humains. Deuxièmement leurs fonctions moléculaires favorisent la prolifération et la survie cellulaire (Janknecht, 2010).

L'expression de DDX5 et DDX17 est modifiée dans de nombreux types de cancers. Ces protéines sont surexprimées dans le cancer du sein et du colon (Causevic et al., 2001; Wortham et al., 2009). DDX5 est également surexprimée dans les cancers de la prostate (Clark et al., 2013) et de la peau (S. J. Wang, Zhang, You, & Shi, 2012) et poly-ubiquitinylée et phosphorylée dans des tumeurs du sein (L. Yang, Lin, & Liu, 2005a), du colon et du cerveau.(Dey & Liu, 2012) La polyubiquitination de DDX5 bloque sa dégradation par le protéasome.

Dans le cancer du sein, DDX5 et DDX17 sont surexprimées dans 30 à 70% des tumeurs selon les études. 80 % de ces cancers expriment des marqueurs hormonaux comme le récepteur aux estrogènes (ER α) et DDX5 et DDX17 sont deux co-régulateurs

transcriptionnels bien caractérisés du récepteur aux estrogènes (Endoh et al., 1999; Fuller-Pace & Ali, 2008; Watanabe et al., 2001; Wortham et al., 2009). Ainsi la surexpression de DDX5 et DDX17 pourrait favoriser la progression du cancer du sein via leurs rôles dans la régulation transcriptionnelle de ER α . De plus, il a été récemment décrit que DDX5 favorise le passage de la phase G1 à S du cycle cellulaire et donc la réplication de l'ADN, en agissant comme co-activateur du facteur de transcription E2F1 dans des cellules de cancer du sein. Dans cette même étude, les auteurs ont montré que le locus de DDX5 est amplifié dans des échantillons et des lignées de cancer du sein (Mazurek et al., 2012).

D'autres données de la littérature dans des lignées de cancer du sein montrent une surexpression de DDX5 dans les lignées basales en comparaison des lignées luminales. Cette surexpression conduit à la régulation de microARNs ciblant des composants du remodelage du cytosquelette d'actine (D. Wang et al., 2012). Ainsi, dans les cancers du sein ou dans les lignées de cancer du sein, DDX5 et DDX17 ont une action pro-tumorale à cause de leur activité de régulateur co-transcriptionnel mais également à cause de leurs implications dans la maturation des microARNs.

De manière assez similaire, DDX5 est un co-activateur du récepteur aux androgènes (AR) (Clark et al., 2008, 2013) et DDX17 interagit avec AR. Comme ER α dans les cancers du sein, AR joue un rôle important dans l'étiologie du cancer de la prostate. La surexpression de DDX5 dans des cancers de la prostate pourrait jouer un rôle dans la progression tumorale en favorisant l'activité de AR. Dans un modèle de cancer de la prostate DDX5 est également co-activateur de la β -caténine (Clark et al., 2013). En outre, dans le cancer de la prostate DDX5 a été retrouvé fusionné avec ETV4, un facteur de transcription de la famille des ETS (E26 transformation-specific) dont la fonction a largement été décrite dans les tumeurs malignes (Han et al., 2008).

Dans le cancer du côlon, plusieurs évidences relient les fonctions de DDX5 et DDX17 avec la progression tumorale. Elles sont surexprimées de façon croissante en suivant les stades de la progression des cancers colorectaux du stade polype au stade adénome puis adénocarcinome. De plus, comme nous l'avons vu plus tôt DDX5 et DDX17 sont des co-activateurs de la β -caténine et toute déplétion de ces protéines conduit à l'inhibition des

proto-oncogènes c-Myc, Cycline D1, c-jun et fra-1 dont l'expression dépend de la β -caténine (Shin et al., 2007). DDX5 est anormalement phosphorylée dans des lignées de cancers colorectaux comparées à des lignées correspondantes issues de tissus sains. Cette phosphorylation est associée à la prolifération cellulaire (L. Yang, Lin, & Liu, 2005b). La phosphorylation de DDX5 en position Y593 en réponse au PDGF favorise la TEM par différents mécanismes (voir 3.3.2) alors que la phosphorylation sur les positions T564 et T446 par p38 MAP kinase en réponse au traitement par oxaliplatine favorise l'apoptose induite par l'oxaliplatine (Dey & Liu, 2012). Chez la souris, il a été montré que DDX5 et DDX17 forment une boucle de rétrocontrôle avec c-Myc et les microARNs miR-143 et miR-145, deux microARNs jouant des rôles de suppresseur de tumeur. DDX5 et DDX17 participent avec DGCR8 et Drosha à la maturation du cluster miR-143/145. Ces microARNs régulent DDX5 et DDX17 de manière directe ou indirecte (Takaoka et al., 2012). Dans ce modèle, la répression de DDX5 et DDX17 impacte également sur la transcription des gènes c-Myc, Cycline D1 et c-jun.

Dans une lignée de cancer colorectal, l'équipe de Z.R. Liu a également montré que DDX5 interagit avec la calmoduline et les microtubules dans le cytoplasme de cellules en migration. Cette interaction est nécessaire à la migration des cellules. De plus, un peptide inhibant l'interaction entre DDX5 et la calmoduline réduit le nombre de métastase dans deux modèles d'allo- ou xénogreffe (SW620 (homme) et 4T1 (souris)) (H. Wang, Gao, Yang, & Liu, 2013).

A l'inverse, DDX5 agit comme co-activateur de p53 dans le cancer du poumon (Bates et al., 2005) et l'expression de DDX17 est associée à un pronostic favorable dans le cancer du sein (Wortham et al., 2009). Ces données contradictoires suggèrent que les fonctions de DDX5 et de DDX17 peuvent être différentes et dépendantes du contexte cellulaire.

En résumé, dans le cancer du colon, DDX5 et DDX17 participent à la progression tumorale majoritairement aux travers de leurs fonctions de co-régulateurs transcriptionnels et de maturation des microARNs.

2- Rôle de DDX5 dans la Transition Epithélio-Mésenchymateuse.

Plusieurs évidences relient la fonction de DDX5 dans la TEM. Ces études ont été réalisées par l'équipe de Z.R. Liu dans des modèles de cancer du côlon, un modèle où la TEM est un processus relevant dans le cadre de la progression tumorale (L. Yang et al., 2005b). Dans ce modèle DDX5 est phosphorylée par c-abl en position Y593 en réponse au PDGF ce qui induit la TEM. Cette phosphorylation permet la relocalisation de la β -caténine dans le noyau. DDX5 phosphorylée empêche la phosphorylation de la β -caténine par GSK3- β . La β -caténine absente du noyau n'est pas capable d'activer ses gènes cibles pour induire la TEM (L. Yang et al., 2006). Cependant, ces résultats semblent être dépendants des lignées utilisées (Stucke, Gorses, & Hofmann, 2008).

La forme phosphorylée de DDX5 conduit également à la transcription de Snail1. DDX5 phosphorylée dissocie HDAC1 du promoteur de Snail1 et interagit avec le complexe de de-acétylation MBD3 : Mi-2/NuRD en réponse au PDGF (Carter et al., 2010).

De plus, un crible double-hybride a permis d'identifier DDX5 comme un co-activateur de Smad3 (Warner et al., 2004). Ce résultat laisse à penser que DDX5 pourrait jouer un rôle dans la signalisation du Tgf- β qui peut être un inducteur de la TEM.

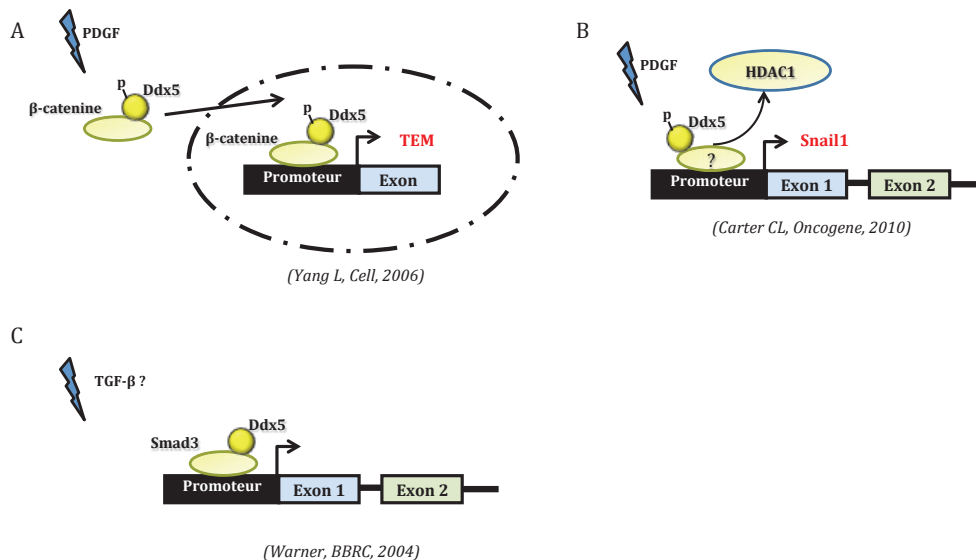


Figure 20 : Fonction de DDX5 dans la TEM.

(A) DDX5 aide à la relocalisation de la β -caténine dans le noyau. (B) DDX5 permet la dissociation de HDAC1 du promoteur de Snail. (C) DDX5 est un co-activateur de Smad3.

Conclusion

DDX5 et DDX17 sont deux membres de la famille des ARN hélicases à motif DEAD. Comme les autres membres de cette famille, ces protéines interviennent dans différents processus du métabolisme des ARNs et notamment dans la régulation transcriptionnelle, la maturation des microARNs et l'épissage. Certaines de ces fonctions requièrent l'activité hélicase (dépendante de l'hydrolyse de l'ATP) et d'autres non. Ces protéines sont donc multifonctionnelles, puisqu'elles servent à la fois de protéines adaptatrices (rôle de co-régulateur transcriptionnel) et de modificateurs des structures ARN-ARN ou ARN-protéine. Pour cette dernière fonction, l'activité hélicase dépendante de l'ATP est requise.

La surexpression de DDX5 et DDX17 est observée dans de nombreux cancers. Sur le plan moléculaire, elles agissent en tant que co-régulateur transcriptionnel et leurs implications dans la maturation des microARNs sont reliées à la progression tumorale. Avant ma thèse, aucune publication n'avait mis en évidence le lien entre le rôle de DDX5 et DDX17 dans l'épissage et la progression tumorale.

Objectifs

DDX5 et DDX17 sont deux ARN hélicases à motifs DEAD qui jouent de nombreux rôles dans le métabolisme de différents ARNs depuis leur transcription jusqu'à leur éventuel traduction. Depuis plus de 20 ans, leurs fonctions moléculaires sont étudiées en détails. Ces protéines très similaires sont surexprimées dans de nombreux cancers et ont été proposées comme des oncogènes potentiels (Janknecht, 2010). Leurs capacités oncogéniques ont été reliées à deux de leurs fonctions moléculaires : 1- Fonctions de co-régulateurs transcriptionnels de plusieurs facteurs de transcription jouant des rôles clés dans la pathologie cancéreuse (ex : $E\alpha$, AR, β -caténine (Fuller-Pace, 2013). 2- Rôles dans la maturation des microARNs, en particulier dans le cancer du sein (D. Wang et al., 2012). Plusieurs travaux mettent en évidence le rôle de DDX5 et DDX17 dans la régulation de l'épissage alternatif. Or ce processus apparaît dérégulé aux cours de la progression tumorale. Au cours de mon travail de thèse, je me suis focalisé sur la régulation de l'épissage alternatif par DDX5 et DDX17 pendant la progression tumorale.

Il est bien établi que DDX5 et DDX17 régulent la transcription, l'épissage alternatif et la maturation des microARNs. Ces différents mécanismes sont les bases du contrôle de l'expression des gènes et leur régulation est critique pour la différenciation cellulaire mais aussi pour la progression tumorale. Ainsi dans un deuxième temps, je me suis intéressé à la coordination et la régulation de la transcription, de l'épissage alternatif et la maturation des microARNs par les ARN hélicases DDX5 et DDX17 dans un modèle de transition Epithélio-Mésenchymateuse induit par le TGF- β .

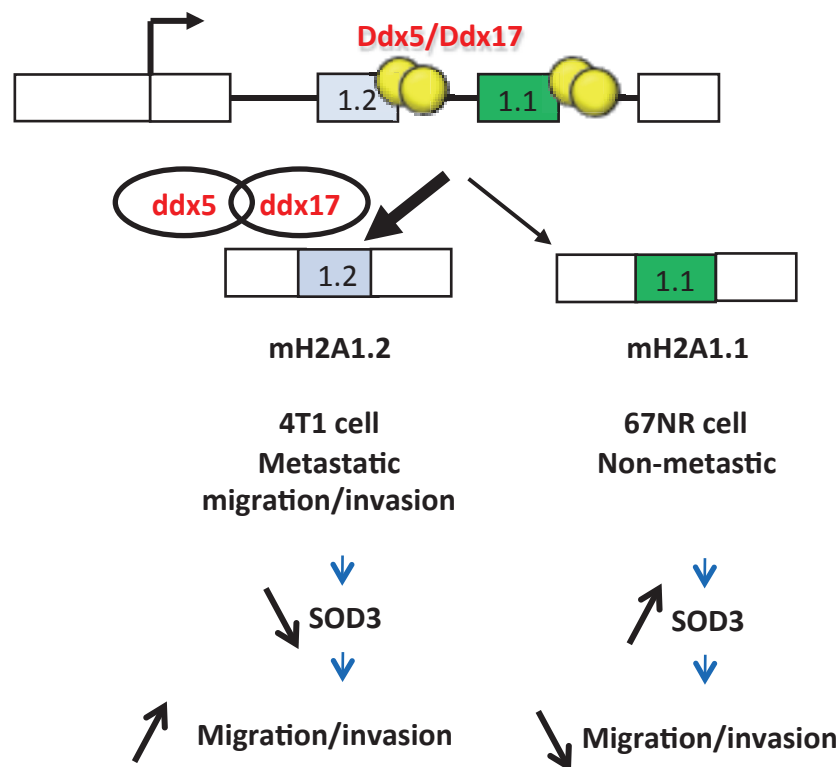
Résultats

Article N°1

Splicing switch of an epigenetic regulator by RNA helicases promotes tumor-cell invasiveness

Les références citées dans cet article sont répertoriées à la fin de l'article.

Dans cet article, j'ai tout d'abord mis en évidence la surexpression de Ddx17 dans les cellules métastatiques 4T1 et souligné le rôle de Ddx17 et de son paralogue Ddx5 dans la migration et l'invasion de ces cellules. Par la suite, je me suis intéressé au rôle de ces protéines dans la régulation de variants d'épissages pouvant jouer un rôle dans le phénotype migratoire et invasif. J'ai pu montrer que Ddx5 et Ddx17 régulent l'épissage de l'histone macroH2A1. Les deux variants d'histone ont un effet opposé sur l'expression de gènes impliqués dans la migration et l'invasion comme le gène SOD3. Mon travail c'est focalisé sur le rôle de de Ddx5 et Ddx17 dans l'épissage de macroH2A1. et sur l'analyse fonctionnelle des deux variants d'épissage. L'analyse de l'expression des tumeurs a été faite en collaboration.



Modèle de régulation du phénotype migratoire et invasif par les différentes isoformes de l'histone macroH2A1.

Splicing switch of an epigenetic regulator by RNA helicases promotes tumor-cell invasiveness

Etienne Dardenne^{1,5}, Sandra Pierredon^{2,3,5}, Keltouma Driouch⁴, Lise Gratadou¹, Magali Lacroix-Triki^{2,3}, Micaela Polay Espinoza¹, Eleonora Zonta¹, Sophie Germann¹, Hussein Mortada¹, Jean-Philippe Villemin¹, Martin Dutertre¹, Rosette Lidereau⁴, Stéphan Vagner^{2,3} & Didier Auboeuf¹

Both epigenetic and splicing regulation contribute to tumor progression, but the potential links between these two levels of gene-expression regulation in pathogenesis are not well understood. Here, we report that the mouse and human RNA helicases Ddx17 and Ddx5 contribute to tumor-cell invasiveness by regulating alternative splicing of several DNA- and chromatin-binding factors, including the macroH2A1 histone. We show that *macroH2A1* splicing isoforms differentially regulate the transcription of a set of genes involved in redox metabolism. In particular, the *SOD3* gene that encodes the extracellular superoxide dismutase and plays a part in cell migration is regulated in an opposite manner by *macroH2A1* splicing isoforms. These findings reveal a new regulatory pathway in which splicing factors control the expression of histone variant isoforms that in turn drive a transcription program to switch tumor cells to an invasive phenotype.

Modifications of gene-expression programs resulting from alterations of epigenetic, transcription and pre-mRNA-splicing regulation largely contribute to the development of various cancers. At the epigenetic level, a plethora of chromatin alterations affecting canonical histone-tail modifications appear to be involved in tumor malignancy^{1–3}. There is also an increasing interest in analyzing the role in cancer of histone variants of the H2A family, including H2A.Z, H2AX, macroH2A1 and macroH2A2. Indeed, the exchange of canonical histones for histone variants is one of the most extensive epigenetic regulation events that affects genomic functions such as cell-cycle control, response to DNA damage, heterochromatin silencing and transcriptional regulation^{3–8}. Changes in the expression of H2A.Z, H2AX or macroH2A1 histones in cancer can affect DNA repair, thereby leading to alterations of chromosome segregation or cell proliferation^{3–7}. Understanding the role in physiological or pathological states of histone variants, whose diversity can also be increased by alternative splicing, remains a major issue.

Numerous studies have also reported changes in the expression of splicing variants in cancers^{9–12}. Alternative splicing is the main mechanism responsible for increasing the diversity of the proteome. Indeed, 90% of human genes generate several splicing variants, producing protein isoforms that can have different and sometimes opposing biological activities^{11–14}. Differential selection of alternatively spliced exons relies on the recognition of the splicing sites by the spliceosome and on splicing-regulatory sequences, located within exons and introns, that are recognized by splicing factors^{13–15}. In a way akin to how transcriptional programs are controlled by transcription factors, splicing

factors control the splicing programs and thus the alternative splicing of gene networks. Although many differences at the splicing level have been described for cancer cells compared to normal cells, one major challenge is to better understand how splicing programs and splicing factors may contribute to specific cancer-associated phenotypes, including cellular invasion and migration. Indeed, deciphering the genetic programs involved in cancer progression will allow researchers to better understand how cancer cells can evolve and form metastases, which are the main cause of death in cancer. Another major perspective is to determine whether and how cross-talk between the different layers of gene-expression regulation, such as epigenetic and splicing programs, contribute to tumor progression.

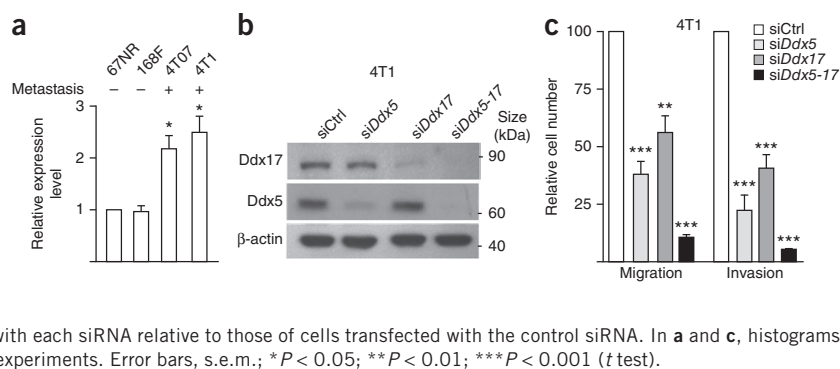
The 4T1 mouse model of tumor progression comprises four syngeneic tumor cell lines that can give rise to primary tumors with a spectrum of metastatic phenotypes when implanted into mouse mammary fat pads^{10,16,17}. Using splicing-sensitive microarrays to analyze the 4T1 mouse model, we and others have reported that several alternative-splicing events are associated with the ability of primary tumors to disseminate^{10,17}. Many of the splicing variants differentially expressed between primary tumors that do or do not develop into metastases are also expressed in normal tissues and have been conserved during evolution, which suggests that they are under the control of conserved splicing regulators¹⁰.

To characterize the role of splicing factors in tumor progression, we focus on the Ddx17 RNA helicase (also known as p72) that we observed to be overexpressed in invasive tumor cells and that we show to contribute to tumor-cell migration and invasion together

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France. ²Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U563, Institut Claudius Regaud, Toulouse, France. ³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U981, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, Villejuif, France. ⁴Laboratory of Oncogenetics, Institut Curie–Hôpital René Huguénin, St-Cloud, France. ⁵These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to S.V. (stephan.vagner@inserm.fr) or D.A. (didier.auboeuf@inserm.fr).

Received 9 November 2011; accepted 24 August 2012; published online 30 September 2012; doi:10.1038/nsmb.2390

Figure 1 The Ddx5 and Ddx17 RNA helicases contribute to cell migration and invasion. **(a)** Relative expression level of *Ddx17* mRNA measured by RT-qPCR in mouse primary tumors with different metastatic capabilities, as indicated. **(b)** Western blot analysis of Ddx5, Ddx17 and β -actin, 48 h after the transfection of mouse 4T1 cells with a control siRNA (siCtrl) or siRNAs targeting *Ddx5* (si*Ddx5*), *Ddx17* (si*Ddx17*) or both *Ddx5* and *Ddx17* (si*Ddx5-17*). **(c)** Relative number of migrating and invasive 4T1 cells after transfection with siCtrl, si*Ddx5*, si*Ddx17* or si*Ddx5-17*. Data are shown as mean number of migrating and invasive cells transfected with each siRNA relative to those of cells transfected with the control siRNA. In **a** and **c**, histograms represent the average of at least three independent experiments. Error bars, s.e.m.; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (*t* test).



with its paralog Ddx5 (p68). Ddx17 and Ddx5 are transcriptional co-regulators of the estrogen receptor and the p53 transcriptional factor^{18–21} and are also splicing regulators known to control alternative splicing of the genes encoding CD44, H-ras and tau^{18,19,22–24}. Our genome-wide analysis at the exon level revealed that Ddx5 and Ddx17 regulate an alternative-splicing network that affects several DNA- and chromatin-binding factors, including the macroH2A1 histone gene (*mH2A1*; also called *H2AFY*). We demonstrate that the *mH2A1* splicing isoforms are differentially expressed in primary tumors that either give rise to metastases or do not. Furthermore, these isoforms differentially regulate breast cancer–cell invasiveness through the transcriptional regulation of genes involved in redox metabolism, including *SOD3*. Thus, our work reveals a new cascade of altered gene-expression events participating in tumor progression, wherein splicing factors (Ddx5 and Ddx17) control the alternative splicing of an epigenetic factor (*mH2A1*), leading in turn to transcriptional alterations of genes involved in a specific cellular program.

RESULTS

Ddx5 and Ddx17 contribute to cell migration and invasion

While analyzing the transcriptome of the 4T1 mouse model of mammary tumor progression¹⁰, we observed that Ddx17 was overexpressed in primary tumors that are more likely to give rise to metastases (4T1 cells) or micrometastases (4T07 cells) as compared to tumors that are not able to disseminate (67NR cells) or that disseminate to the lymph nodes (168FARN cells). We validated this result by reverse-transcription quantitative PCR (RT-qPCR) on RNAs extracted from mouse tumors (Fig. 1a) and also showed that Ddx17 was overexpressed at both the RNA and the protein levels in the invasive 4T1 cell line as compared to the noninvasive 67NR cell line (Supplementary Fig. 1a). To test the potential role of Ddx17 in tumor-cell invasiveness, we knocked down its expression by using a specific siRNA (Fig. 1b). Because Ddx5 and Ddx17 often have redundant functions^{18,19} and although Ddx5 did not seem to be misregulated (Supplementary Fig. 1a), we also used siRNAs against either Ddx5 or against a conserved region that targeted both Ddx5 and Ddx17 (Fig. 1b). Both cell migration and invasion were inhibited by Ddx5 or Ddx17 depletion, and this inhibition was enhanced when both Ddx5 and Ddx17 were depleted (Fig. 1c). Similar effects were obtained with either the single siRNA targeting both Ddx5 and Ddx17 or a mixture of siRNAs separately targeting Ddx5 and Ddx17 in 4T1 cells, whereas depletion of Ddx5 and Ddx17 in the noninvasive 67NR cells had no effect (Supplementary Fig. 1b,c). These results demonstrate that Ddx5 and Ddx17 have a role in cell invasiveness because depletion of Ddx5 and/or Ddx17 neither increased cell apoptosis nor significantly decreased cell-cycle progression (Supplementary Fig. 1d,e).

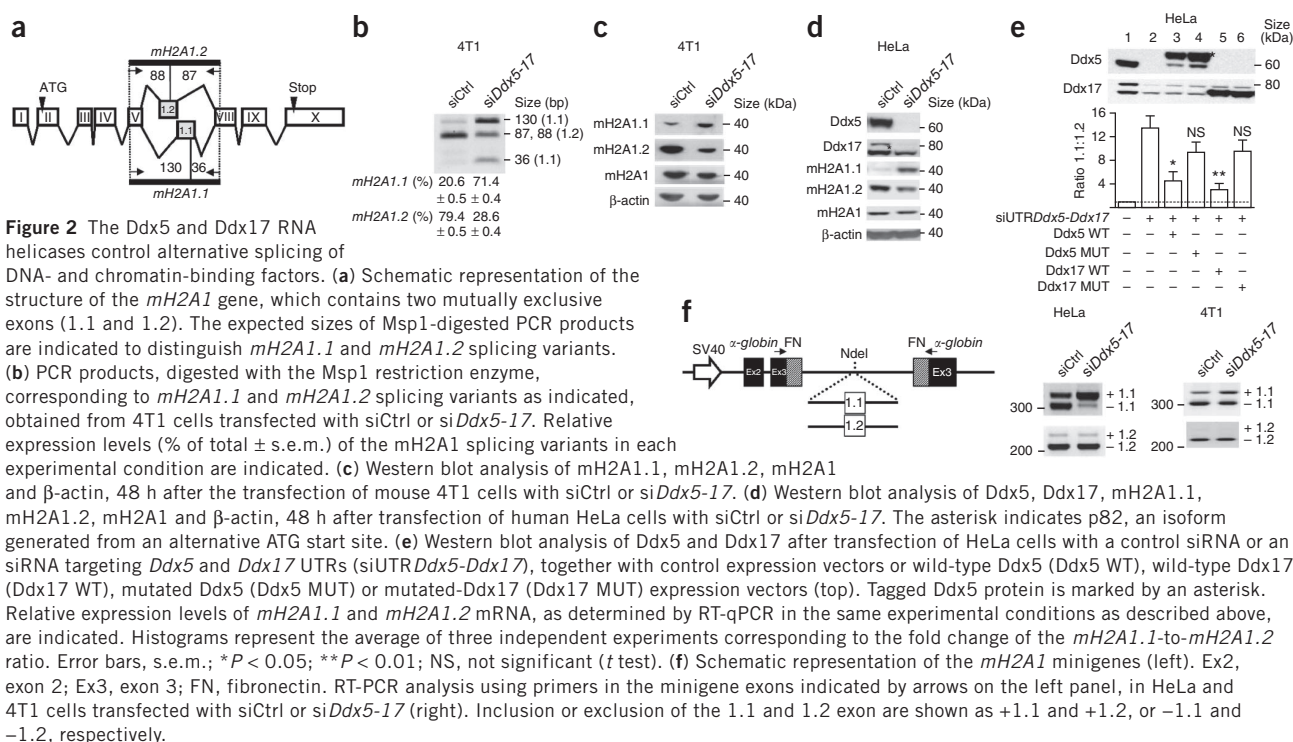
To understand how Ddx5 and Ddx17 regulate cell migration and invasion, we used Affymetrix exon arrays to analyze the transcriptome of 4T1 cells at the exon level, following siRNA-mediated depletion of Ddx5 and Ddx17. There were 1,136 genes predicted to be affected at the global gene-expression level (Supplementary Table 1) and 1,325 genes predicted to be affected at the exon level (Supplementary Table 2). The effect of Ddx5 and Ddx17 depletion was validated by RT-PCR for 31 out of 42 splicing variants (74% validation rate) (Supplementary Fig. 2).

Gene Ontology analysis through the Panther website²⁵ indicated that genes regulated at the splicing level as compared to genes regulated at the global level were enriched in ‘binding activity’ ($P = 2.8 \times 10^{-13}$), in particular ‘nucleic acid binding’ ($P = 2.9 \times 10^{-11}$), ‘RNA binding’ ($P = 9 \times 10^{-8}$), ‘chromatin binding’ ($P = 1.9 \times 10^{-5}$) and ‘DNA binding’ ($P = 5 \times 10^{-4}$). This observation suggests that the set of alternative exons that are co-regulated by Ddx5 and Ddx17 are enriched in functionally related genes and that Ddx5 and Ddx17 regulate the alternative splicing of DNA- and chromatin-binding factors that could in turn affect the transcription of genes involved in tumor progression.

Ddx5 and Ddx17 control *mH2A1* alternative splicing

To test this hypothesis, we focused on the *mH2A1* histone gene because recent reports have described a role for it in cancer^{4,7,8}. The mouse *mH2A1* gene generates two splicing isoforms (*mH2A1.1* and *mH2A1.2*) through the use of two mutually exclusive exons (Fig. 2a). As predicted by the exon-array analysis, depletion of Ddx5 and Ddx17 increased the level of the *mH2A1.1* isoform and decreased that of the *mH2A1.2* isoform but had no effect on the global *mH2A1* gene expression level (Fig. 2b and Supplementary Fig. 3a,b). These results were confirmed at the protein level (Fig. 2c) and were extended in human HeLa cells (Fig. 2d and Supplementary Fig. 4).

To perform rescue experiments, siRNAs targeting the untranslated regions (UTRs) of the endogenous Ddx5 and Ddx17 mRNAs were designed. Transfection of these siRNAs led to an increase in the ratio of *mH2A1.1* to *mH2A1.2* (Fig. 2e, lane 2 compared to lane 1). Furthermore, cell transfection with either Ddx5 or Ddx17 expression vectors (to produce mRNAs without UTRs that are therefore refractory to the UTR-targeting siRNAs) rescued to a large extent the splicing pattern generated by endogenous Ddx5 and Ddx17 protein depletion (Fig. 2e, lane 2 compared to lane 3 and to lane 5). Even though overexpression of Ddx5 or Ddx17 did not fully rescue the splicing pattern induced by Ddx5 and Ddx17 depletion, our data suggest that Ddx5 and Ddx17 have similar functions, as depletion of either Ddx5 or Ddx17 affected *mH2A1* splicing (Supplementary Fig. 4c). Notably, overexpressing mutated Ddx5 or Ddx17 proteins



that lacked the RNA helicase activity did not significantly rescue the *mH2A1* splicing pattern (Fig. 2e, lane 4 compared to lane 3 and lane 6 compared to lane 5).

To directly assay the effect of Ddx5 and Ddx17 on *mH2A1* alternative splicing, exons 1.1 or 1.2 and ~200 nucleotides of their surrounding intronic sequences were cloned into a reporter minigene (Fig. 2f). As expected, Ddx5 and Ddx17 depletion increased exon 1.1 inclusion in HeLa and 4T1 cells transfected with the minigene. Ddx5 and Ddx17 depletion did not increase exon 1.2 skipping (Fig. 2f), which suggested that sequences not included in the minigene are required to regulate exon 1.2. Alternatively, Ddx5 and Ddx17 may regulate exon 1.1 splicing, which in turn could affect exon 1.2 splicing. These results demonstrate that Ddx5 and Ddx17 regulate *mH2A1* alternative splicing and that the RNA helicase activity of Ddx5 and Ddx17 is required for their effects on splicing.

mH2A1 alternative splicing participates in cell invasiveness

We next investigated a possible role of *mH2A1* splicing isoforms in tumor-cell invasiveness. In this context, we observed that the

mH2A1.1 isoform was expressed at a higher level in the noninvasive 67NR cells than in the invasive 4T1 cells, whereas the *mH2A1.2* isoform was expressed at a higher level in 4T1 cells, both at the RNA and protein levels (Fig. 3a,b). Whereas 67NR cells expressed similar levels of *mH2A1.1* and *mH2A1.2* isoforms, 4T1 cells expressed much less *mH2A1.1* than *mH2A1.2* (Fig. 3a,b and Supplementary Fig. 3c,d). This result was confirmed in tumor samples, as a lower ratio of *mH2A1.1* to *mH2A1.2* was observed in mouse primary tumors that gave rise to metastasis (Supplementary Fig. 3e).

Supporting the hypothesis that the *mH2A1* splicing isoforms have different roles in cell migration and invasion, specific depletion of the *mH2A1.2* isoform in the invasive 4T1 cells (Supplementary Fig. 3c) inhibited cell migration and invasion (Fig. 3c), whereas the depletion of the *mH2A1.1* isoform in the noninvasive 67NR cells (Supplementary Fig. 3c) increased cell migration and invasion (Fig. 3d). These results, which were confirmed by using different siRNAs (Supplementary Fig. 5a), demonstrate that the *mH2A1.2* isoform favored breast cancer-cell invasiveness, whereas the *mH2A1.1* isoform had the opposite effect. Transfection of 4T1 cells with siRNA targeting the *mH2A1.1*

Figure 3 Alternative splicing of the macroH2A1 histone variant is involved in tumor progression. (a) PCR products, digested with the MspI restriction enzyme, corresponding to *mH2A1.1* and *mH2A1.2* splicing variants. Template is RNA isolated from 67NR or 4T1 cells. Relative expression levels (% of total \pm s.e.m.) of the *mH2A1* splicing variants in each experimental condition are indicated. (b) Western blot analysis of *mH2A1.1*, *mH2A1.2*, *mH2A1* and β -actin, expressed in 4T1 or 67NR cells. (c) Relative number of migrating and invasive 4T1 cells after transfection with siCtrl or a siRNA targeting *mH2A1.2* (si1.2). (d) Relative number of migrating and invasive 67NR cells after transfection with siCtrl or a siRNA targeting *mH2A1.1* (si1.1). In c and d, histograms represent the average of at least three independent experiments. Error bars, s.e.m.; *** $P < 0.001$ (*t* test).

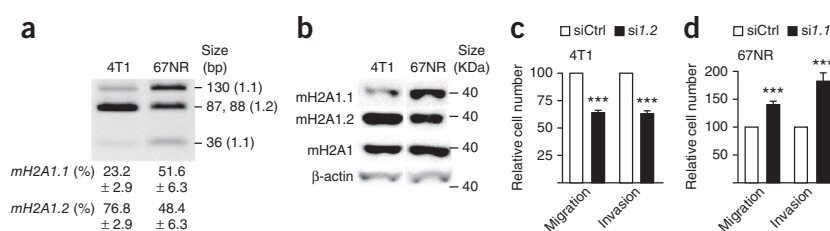


Figure 4 Alternative splicing of the macroH2A1 histone variant

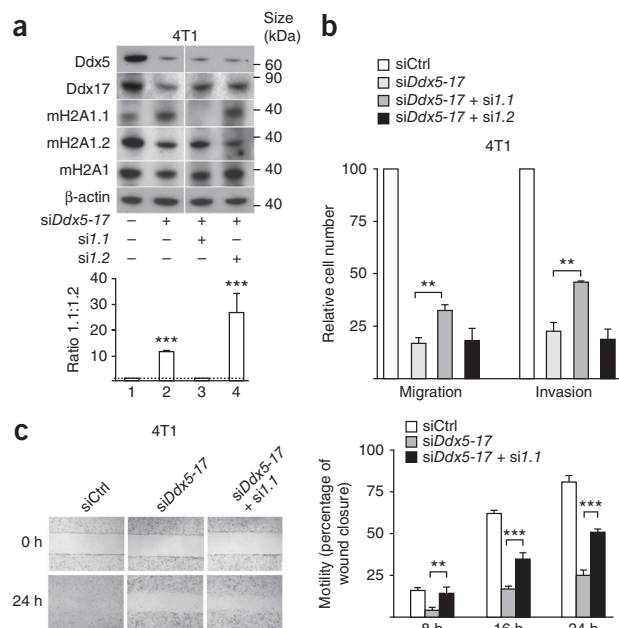
contributes to the Ddx5-Ddx17 effect on cell migration and invasion. (a) Western blot analysis of Ddx5, Ddx17, mH2A1.1, mH2A1.2, mH2A1 and β -actin, 48 h after transfection of mouse 4T1 cells with siCtrl, siDdx5-17, si1.1 or si1.2 isoforms (top). Relative expression levels of mH2A1.1 and mH2A1.2 measured by RT-qPCR in the same experimental conditions as described above are indicated (bottom). Histograms represent the average of three independent experiments corresponding to the fold change of the mH2A1.1 to mH2A1.2 mRNA ratio. (b) Relative number of migrating and invasive 4T1 cells after transfection with siCtrl, siDdx5-17 and either si1.1 or si1.2. (c) Motility of 4T1 cells transfected with siCtrl or with siDdx5-17 alone or together with si1.1, measured by the wound healing assay at 8, 16 or 24 h. Histograms represent the average of at least three independent experiments. Error bars, s.e.m.; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (t test).

isoform had no effect, as the mH2A1.1 isoform is scarcely expressed in 4T1 cells, and depletion of the mH2A1.2 isoform had no effect in the noninvasive 67NR cells (**Supplementary Fig. 5b**).

To further test whether mH2A1 alternative-splicing regulation contributes to the effect of Ddx5 and Ddx17 on tumor cell invasiveness, Ddx5- and Ddx17-depleted 4T1 cells were transfected with siRNAs that specifically targeted each of the mH2A1 splicing variants (**Fig. 4a**). Notably, depletion of the mH2A1.1 isoform but not the mH2A1.2 isoform reduced the inhibitory effect of Ddx5 and Ddx17 depletion on cell invasion and migration (**Fig. 4b**). This result was further confirmed by the depletion of the mH2A1.1 isoform in Ddx5- and Ddx17-depleted cells, which reduced the inhibitory effect of Ddx5 and Ddx17 depletion on cell motility (**Fig. 4c**, siDdx5-17 compared to siDdx5-17 + si1.1). These results support a model in which mH2A1 alternative splicing mediates, at least in part, the inhibition by Ddx5 and Ddx17 depletion of tumor-cell invasiveness.

mH2A1 splicing isoforms control redox metabolism genes

We next performed a high-throughput gene-expression analysis to identify genes whose expression might be differentially regulated by the mH2A1 splicing isoforms and thus could be involved in the



Ddx5- and Ddx17-dependent regulation of the invasive phenotype. For this purpose, we compared the transcriptome of 4T1 cells that had been depleted of either mH2A1.1 or mH2A1.2 in the context of Ddx5 and Ddx17 depletion. Manipulating mH2A1 isoform expression had only weak effects, with changes in the expression levels of only 53 genes by more than 1.5 fold (**Fig. 5a** and **Supplementary Table 3**). This was anticipated because several reports have indicated that mH2A1 has only a slight impact on steady-state levels of gene expression^{26–29}. Reducing the threshold to 1.2-fold revealed 633 genes that were differentially regulated when comparing mH2A1.2- to mH2A1.1-depleted cells (**Fig. 5a** and **Supplementary Table 3**). We validated by RT-qPCR 17 of the 21 tested genes that had fold changes ranging from 1.2 to 2.6 (**Supplementary Fig. 6a** and **Supplementary Table 3**). Among the 633 genes, 501 genes were upregulated and 132 genes were down-regulated in mH2A1.2-depleted cells compared to mH2A1.1-depleted cells, which suggests that the mH2A1.1 and mH2A1.2 isoforms have a differential impact on gene transcriptional activity.

Of the genes that were differentially regulated by mH2A1 splicing isoforms, 45 were also affected by Ddx5 and Ddx17 depletion and were also differentially expressed in 67NR cells as compared to 4T1 cells (**Fig. 5b**), and more than one-third of these are involved in redox metabolism (**Supplementary Table 3**). Notably, metastatic cells may come from cancer cells that have avoided oxidative

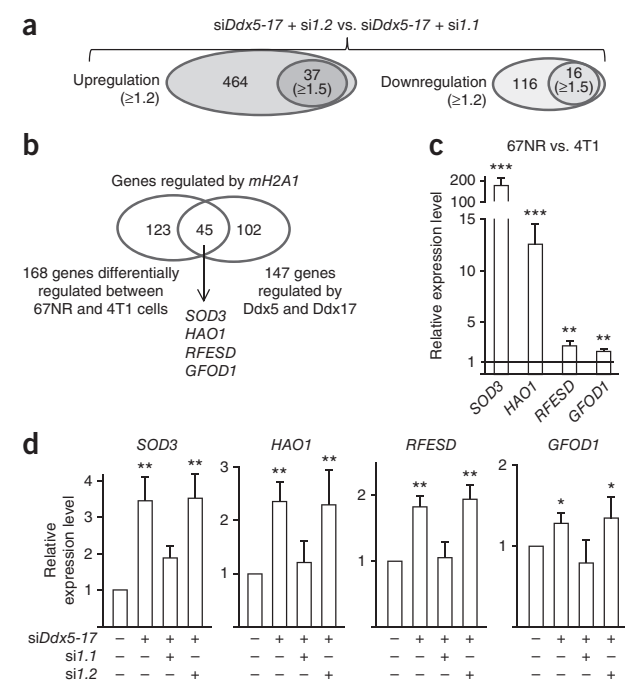
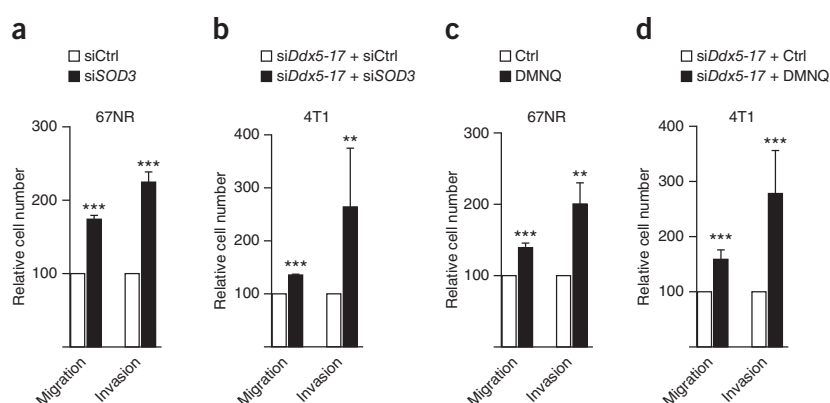


Figure 5 Regulation of mH2A1 splicing isoforms by Ddx5 and Ddx17 affects regulation of genes involved in redox metabolism. (a) Number of genes regulated at the global expression level, as determined by comparing 4T1 cells transfected with siDdx5-17 and with si1.2 or si1.1. (b) Venn diagram corresponding to mH2A1-regulated genes that were regulated by Ddx5 and Ddx17 and differentially expressed in 67NR as compared to 4T1 cells. (c) Relative expression level of SOD3, HAO1, RFESD and GFOD1 mRNAs, as determined by RT-qPCR, comparing nonmetastatic 67NR cells with metastatic 4T1 cells. (d) Relative expression level of SOD3, HAO1, RFESD and GFOD1 mRNAs measured by RT-qPCR in 4T1 cells transfected with siCtrl or siDdx5-17 alone or in combination with either si1.1 or si1.2. Histograms represent the average of at least three independent experiments. Error bars, s.e.m.; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (t test).

Figure 6 Ddx5 and Ddx17-regulated *SOD3* expression is involved in cell migration and invasion. (a) Relative number of migrating and invasive 67NR cells after transfection with siCtrl or siRNA against *SOD3* (si*SOD3*), as determined by comparing with the number of cells transfected with siCtrl that migrated and invaded. (b) Relative number of migrating and invasive 4T1 cells after transfection with si*Ddx5-17* alone or in combination with si*SOD3*. (c) Relative number of migrating and invasive 67NR cells in the absence or presence of DMNQ. (d) Relative number of migrating and invasive 4T1 cells in the absence or presence of DMNQ. Histograms represent the average of at least three independent experiments. Error bars, s.e.m.; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (t test).



damage from excess reactive oxygen species (ROS) in the primary tumor site^{30,31}. We therefore focused on four genes involved in redox metabolism: the extracellular superoxide dismutase (*SOD3*), hydroxyacid oxidase 1 (*HAO1*), Rieske (Fe-S) domain containing (*RFESD*) and glucose-fructose oxidoreductase domain containing 1 (*GFOD1*). We observed by RT-qPCR that 67NR cells that expressed a high *mH2A1.1* to *mH2A1.2* ratio as compared to metastatic 4T1 cells also expressed higher levels of *SOD3*, *HAO1*, *RFESD* and *GFOD1* mRNAs than metastatic 4T1 cells (Fig. 5c). Furthermore, Ddx5 and Ddx17 depletion increased *SOD3*, *HAO1*, *RFESD* and *GFOD1* mRNA expression (Fig. 5d). Finally, depletion of *mH2A1.1*, but not of *mH2A1.2*, abrogated the increase mediated by Ddx5 and Ddx17 depletion (Fig. 5d). Altogether, these data show that *mH2A1* splicing isoforms mediate a part of Ddx5- and Ddx17-induced regulation of gene expression in 4T1 cells, including that of genes involved in redox metabolism.

SOD3 regulation by *mH2A1* contributes to cell invasiveness

To directly examine the impact on tumor-cell invasiveness of Ddx5- and Ddx17-mediated regulation of *mH2A1* alternative splicing and the downstream *mH2A1*-dependent transcriptional regulation, we focused on *SOD3*, which converts extracellular superoxide radicals ($[O_2]^-$) into hydrogen peroxide (H_2O_2)^{32–35} and is known to be involved in invasion^{32–35}. As shown in Figure 6a, *SOD3* depletion (Supplementary Fig. 5d) indeed led to an increased invasiveness of the noninvasive 67NR cells. Notably, transfection of Ddx5- and Ddx17-depleted 4T1 cells with an siRNA targeting *SOD3* increased cell migration and invasion (Fig. 6b). This result suggests that Ddx5 and Ddx17 depletion increased the *mH2A1.1* isoform level (Fig. 2), which in turn increased *SOD3* expression level (Fig. 5d) and thereby reduced cell migration and invasion (Fig. 6b). Further supporting this model, directly adding *SOD3* protein to 4T1 cell-culture medium inhibited cell migration (Supplementary Fig. 5e), whereas adding 2,3-dimethoxy-1,4-naphthoquinone (DMNQ), a redox-cycling agent that induces superoxide anion formation and mimics *SOD3* depletion, increased the migration and invasion capability of 67NR cells and Ddx5- and Ddx17-depleted 4T1 cells (Fig. 6c,d).

The differential effects of the *mH2A1* splicing variants on the gene-expression level could be explained if the two isoforms act on different genes or if they act on the same genes but have opposite effects on gene transcription activity. Consistent with the second hypothesis, *mH2A1.2* depletion in metastatic 4T1 cells led to an increasing amount of *SOD3* mRNA, which suggested that *mH2A1.2* repressed *SOD3* expression (Fig. 7a). Conversely, depletion of *mH2A1.1* in non-metastatic 67NR cells decreased the amount of *SOD3* mRNA, which

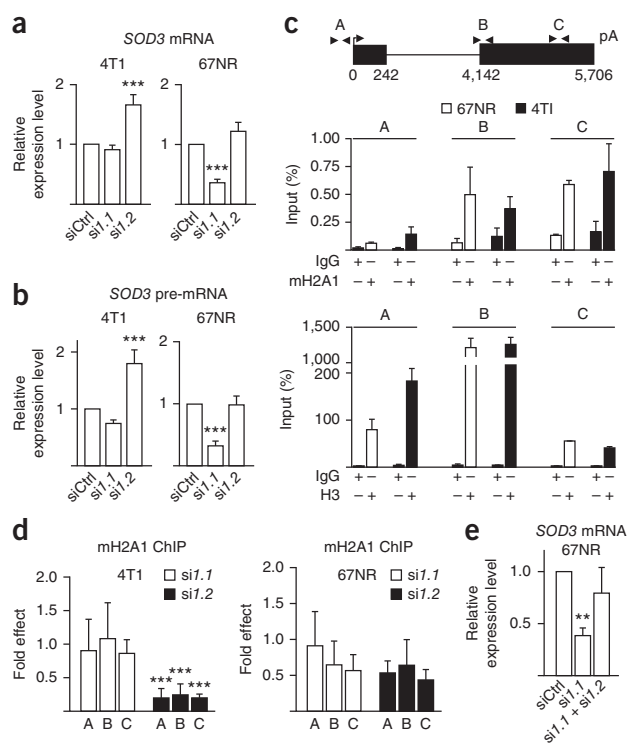


Figure 7 *mH2A1* associates with the *SOD3* gene, and its splicing variants regulate *SOD3* transcription activity in an opposite manner. (a) Relative *SOD3* mRNA expression level measured by RT-qPCR in 4T1 or 67NR cells transfected with siCtrl, si*1.1* or si*1.2*. (b) Relative *SOD3* pre-mRNA expression level measured by RT-qPCR, in 4T1 or 67NR cells transfected with siCtrl, si*1.1*, or si*1.2*. (c) Schematic representation of the *SOD3* gene structure and localization of the primers used to analyze *mH2A1* incorporation (upper panel). qPCR analysis with primers targeting the *SOD3* gene after ChIP using control antibodies (against IgG) or antibodies against *mH2A1* (middle panel) or histone H3 (lower panel). (d) Effect of *mH2A1.1* depletion (si*1.1*) or *mH2A1.2* depletion (si*1.2*) on the incorporation of *mH2A1* in the *SOD3* gene in 4T1 cells or in 67NR cells. Primers A, B, and C were as shown in c. (e) Relative *SOD3* mRNA expression level measured by RT-qPCR in 67NR cells transfected with siCtrl, si*1.1* alone or in combination with si*1.2*. Histograms represent the average of at least three independent experiments. Error bars, s.e.m.; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (t test).

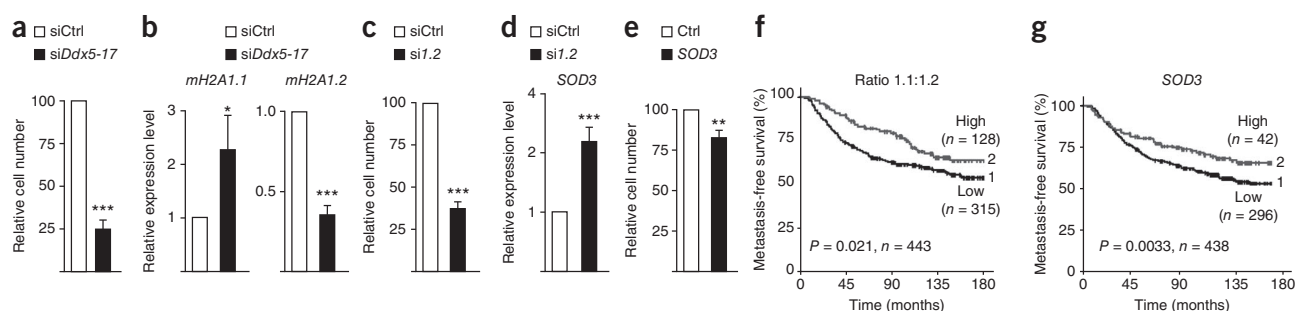


Figure 8 mH2A1 alternative splicing controlled by Ddx5 and Ddx17 in MDA-MB-231 cells. **(a)** Relative number of migrating MDA-MB-231 cells after transfection with siCtrl or siDdx5-17. **(b)** Relative expression level of *mH2A1.1* and *mH2A1.2* mRNAs measured by RT-qPCR in MDA-MB-231 cells transfected with siCtrl or siDdx5-17. **(c)** Relative number of migrating MDA-MB-231 cells after transfection with siCtrl or si1.2. **(d)** Relative expression level of *SOD3* mRNA measured by RT-qPCR in MDA-MB-231 cells transfected with siCtrl or si1.2. **(e)** Relative number of migrating MDA-MB-231 cells after addition of recombinant *SOD3* protein to the cell-culture medium. Histograms represent the average of at least three independent experiments. Error bars, s.e.m.; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (*t* test). **(f)** Kaplan-Meier curves for 180-month outcome in patients with breast cancer ($n = 443$) based on the *mH2A1.1*-to-*mH2A1.2* splicing ratio. **(g)** Kaplan-Meier curves for 180-month outcome in patients with breast cancer ($n = 438$) based on *SOD3* mRNA expression level.

suggested that mH2A1.1 stimulated *SOD3* expression (Fig. 7a). These results were confirmed by the *SOD3* pre-mRNA levels (Fig. 7b), so we concluded that mH2A1 isoforms had opposite effects on *SOD3* gene transcription activity.

We next tested whether the mH2A1 histone was incorporated into the *SOD3* gene in 67NR and 4T1 cells. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was performed with an antibody that recognizes both mH2A1 isoforms, as isoform-specific antibodies did not give any signal above background (data not shown). PCR analysis was performed by using primers at several locations along the *SOD3* gene (Fig. 7c). As shown in Figure 7c, mH2A1 was detected all along the *SOD3* gene, both in 67NR and 4T1 cells. A slightly higher level of mH2A1 was detected on the *SOD3* promoter in 4T1 as compared to 67NR cells (Fig. 7c), but there was also more nucleosome in the *SOD3* promoter in 4T1 as compared to 67NR cells, as demonstrated by H3 histone ChIP (Fig. 7c). Moreover, mH2A1.2 depletion but not mH2A1.1 depletion strongly decreased the mH2A1 histone level incorporated in the *SOD3* gene in 4T1 cells (Fig. 7d). Thus, the mH2A1.2 isoform, which is the main mH2A1 isoform expressed in 4T1 cells, is incorporated in the *SOD3* gene (Fig. 7d) and contributes to *SOD3* gene repression in these metastatic cells (Fig. 7a).

In contrast, in the nonmetastatic 67NR cells that expressed a similar level of the mH2A1.1 and mH2A1.2 isoforms, depletion of either the mH2A1.1 or the mH2A1.2 isoform induced a similar, statistically insignificant decrease in the level of the mH2A1 incorporated into the *SOD3* gene (Fig. 7d). Because mH2A1.1 depletion in 67NR cells decreased *SOD3* mRNA and pre-mRNA levels and mH2A1.2 depletion had opposite effects in 4T1 cells (Fig. 7a,b), we hypothesized that the mH2A1.2 isoform replaced the mH2A1.1 isoform on the *SOD3* gene following mH2A1.1 depletion in 67NR cells. This hypothesis was supported by the fact that *SOD3* gene repression in the 67NR cells that resulted from mH2A1.1 depletion was reversed by the co-depletion of the mH2A1.2 isoform (Fig. 7e). Collectively, these results suggest that both competition between the mH2A1.1 and mH2A1.2 isoforms for their incorporation into the *SOD3* gene and a higher mH2A1.2-to-mH2A1.1 ratio contribute to breast cancer-cell invasiveness through *SOD3* gene repression.

To further challenge this model, the human invasive MDA-MB-231 breast cancer-cell line was transfected with an siRNA that targeted both Ddx5 and Ddx17, which inhibited cell migration (Fig. 8a) and decreased the mH2A1.2 isoform and increased the mH2A1.1

isoform (Fig. 8b), as had been observed in the 4T1 mouse cell line. As expected, depletion of the mH2A1.2 isoform in MDA-MB-231 cells also inhibited cell migration (Fig. 8c) and increased the *SOD3* mRNA expression level (Fig. 8d). Therefore, the mH2A1.2 isoform may favor cancer-cell migration by repressing *SOD3* expression, as addition of *SOD3* in MDA-MB-231 cell-culture medium inhibited cell migration (Fig. 8e).

Further supporting the physiopathological significance of our findings, analyses of a cohort of 443 patients with primary breast tumors with a well-documented clinical follow-up (Supplementary Table 5) indicated that low mH2A1.1-to-mH2A1.2 expression ratio was associated with shorter metastasis-free survival (Fig. 8f). Notably, a high level of mH2A1.2 isoform expression was associated with shorter metastasis-free survival, which represents a prognostic factor for disease severity that is independent of other known markers (Supplementary Fig. 7). Notably, the mH2A1.2 splicing isoform that represses *SOD3* expression in 4T1 and MDA-MB-231 cells (Figs. 7a and 8d) correlated negatively with the expression level of *SOD3* ($P = 0.00019$; Spearman rank correlation test) in the primary breast-tumor collection. Finally, a high expression level of *SOD3* was associated with longer metastasis-free survival (Fig. 8g), in agreement with the inhibitory effect of *SOD3* on *in vitro* migration (Figs. 6 and 8e).

DISCUSSION

RNA helicases, which comprise more than 60 enzymes that use the energy of ATP hydrolysis to remodel RNA or RNA-protein complexes, are thought to be required at all stages of cellular RNA metabolism^{18,19,36}. However, their target mRNAs and their cellular functions are poorly defined. In this context, whereas Ddx5 and Ddx17 have been shown to play a part in the splicing process, their effect on alternative splicing has been reported only for a few cases^{22–24}. To the best of our knowledge, we provide the first evidence that RNA helicases can have a widespread impact on alternative splicing (Supplementary Table 2 and Supplementary Fig. 2). Notably, we observed that the 5' splicing sites of exons that are skipped upon Ddx5 and Ddx17 depletion are within GC-rich regions as compared to the 5' splicing sites of exons that are included following depletion (Supplementary Fig. 2b). Because we show that the helicase activity of Ddx5 and Ddx17 is critical for their ability to regulate mH2A1 splicing (Fig. 2e), this result suggests that these proteins regulate alternative splicing by affecting RNA secondary structure²⁴.

Ddx5 and Ddx17 have been reported to have an impact on cellular phenotypes, owing to their functions as transcriptional coregulators^{18,19,37}. For example, we recently showed that Ddx5 and Ddx17 are transcriptional coactivators of the NEAT5 promigratory transcription factor and that they participate in controlling the transcriptional activity of genes involved in cell migration and invasion, including *S100A4* (ref. 38). We now show that the splicing activity of Ddx5 and Ddx17 contributes to their role in cell migration and invasion, by modulating the splicing of the *mH2A1* gene, whose product in turn regulates genes involved in cell migration and invasion, such as *SOD3*. As NEAT5 and mH2A1 do not control the expression of the same genes (**Supplementary Fig. 8**), our data demonstrate that both the transcriptional and the splicing activities of Ddx5 and Ddx17 influence tumor progression by affecting different gene-expression programs. Notably, a recent report also demonstrates that Ddx5 affects the expression of another set of genes that are also involved in tumor progression (for example, cofilin and profilin) by modulating the expression of micro RNAs (miRNAs)³⁹. In sum, these results demonstrate that the different activities of Ddx5 and Ddx17 in transcription, splicing and miRNA processing affect different gene-expression programs, which collectively contribute to their effects on tumor progression.

In agreement with a proposed role in cancer, several reports have shown that Ddx5 or Ddx17 are overexpressed in different tumor types^{18,19,40–42}. Although we found that Ddx17 was overexpressed in the metastatic 4T1 cells and tumors (**Fig. 1a** and **Supplementary Fig. 1**), a high level of *Ddx17* (and/or *Ddx5*) mRNA did not correlate with a poor metastasis-free survival rate in the analyzed set of human tumors (data not shown). However, analyzing Ddx5 and Ddx17 expression in human tumors is very challenging because Ddx5 or Ddx17 alterations might occur at the protein level or at a post-translational modification level, as suggested by several reports^{43–47}.

Our work also revealed a role for *mH2A1* histone pre-mRNA alternative splicing in breast cancer progression. Notably, it has been previously shown that the mH2A1.1 isoform inhibits lung cancer–cell proliferation and that patients with low mH2A1.1 levels in lung tumor samples are more likely to relapse than those with strong nuclear mH2A1.1 staining^{7,8}. Similar results were recently reported in colon cancer⁴⁸. Notably, the proportion of mH2A1.1 isoform (as a percentage of total mH2A1) decreased in tumors relative to normal samples in several cancer types including breast cancer⁸. In the tumor samples that we analyzed, we observed that the mH2A1 global level strongly correlates with the level of mH2A1.2 isoform (**Supplementary Fig. 7b**), which we showed favors cancer-cell invasiveness (**Fig. 3**). On the basis of the data obtained from cancers in lung⁷, colon⁴⁸ and breast (this study), one model is that the decrease in the mH2A1.1 isoform–expression level in tumor cells as compared to normal cells could favor cell proliferation, and overproduction of the mH2A1.2 isoform in tumor samples could further increase cell aggressiveness. Alteration of mH2A1 alternative splicing during tumor initiation and progression could be mediated by several splicing factors, as the QKI splicing factor, which is downregulated in cancer compared to normal cells, has also been shown to affect mH2A1 splicing⁸.

Notably, a recent study demonstrated that the loss of mH2A1 histone is positively correlated with an increasing malignant phenotype of melanoma cells in culture and human tissue samples and that the suppressive effects of mH2A1 on melanoma progression is mediated through the regulation of CDK8 (ref. 4). Because we did not observe a general downregulation of the *mH2A1* gene associated with breast cancer aggressiveness (data not shown) and because we did not find any change in *CDK8* gene expression in the 4T1 breast cancer

model of tumor progression (**Supplementary Fig. 6b**), these results suggest that mH2A1 expression might be altered in different ways depending on tumor types, which may result in alteration of different gene-expression programs.

In addition, the role of mH2A1 in cancer may also rely on post-translational modifications. In this context, it is important to underscore the fact that the macrodomain of the mH2A1.1 splicing isoform, but not that of the mH2A1.2 isoform, binds ADP-ribose and related NAD metabolites. It has been proposed that mH2A1.1 but not mH2A1.2 recognizes ADP-ribosylated chromatin components to promote rearrangement of chromatin loops^{28,29,49}. This specific feature of the mH2A1.1 splicing isoform is particularly relevant with respect to our observation that mH2A1.1 and mH2A1.2 differentially regulate genes involved in redox metabolism. Indeed, ADP-ribosylation is a consequence of PARP activation under stress conditions, particularly in the context of redox metabolism alteration and exposure to ROS^{30,50–52}. In addition, NAD metabolites have a central role in redox and ROS metabolism, and increasing evidence indicates that redox metabolism in turn affects epigenetic regulation^{30,50–52}. Therefore, nonmetastatic 67NR cells that express a higher mH2A1.1-to-mH2A1.2 ratio than metastatic 4T1 cells might be able to adapt their genetic programs to redox metabolism by expressing genes such as *SOD3*, which would in turn affect cell invasiveness. Indeed, the *SOD3* gene codes for the extracellular superoxide dismutase that converts extracellular [O₂]^{•−} into H₂O₂. Notably, it has been recently shown that the overexpression of *SOD3* inhibits invasion by breast cancer cells^{32–35}, which is consistent with the findings of this study. Indeed, by converting extracellular [O₂]^{•−} into H₂O₂, *SOD3* attenuates oxidative fragmentation of the extracellular-matrix components such as heparan sulfate, thereby decreasing invasion and migration, and it may prevent other effects of ROS on cell motility^{30,32–35,53–56}. In support of a role for *SOD3* in tumors, we report that *SOD3* is an indicative factor for good prognosis (**Fig. 8g**). Notably, as well, it has been recently shown that the mH2A1.2 isoform but not the mH2A1.1 isoform can interact with and regulate HER2, which is a major player in breast cancer initiation and progression⁵⁷. Therefore, further experiments are required to decipher the precise mechanisms by which mH2A1.1 and mH2A1.2 differentially contribute to cancer.

In conclusion, this study reveals a role of tumor-associated alternative splicing of an epigenetic factor in tumor progression, which leads in turn to transcriptional alterations of genes involved in a specific cellular program. Because epigenetic factors can also have an impact on alternative splicing (reviewed in ref. 58), it is likely that cross-talk between splicing and epigenetic networks may contribute to the control of cell phenotypes during both physiological and pathological states.

METHODS

Methods and any associated references are available in the [online version of the paper](#).

Accession codes. Microarray data have been deposited in the Gene Expression Omnibus database under accession code [GSE40737](#).

Note: Supplementary information is available in the online version of the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Buschbeck and V.A. Raker for critically reading the manuscript and L. Mhamdi for technical assistance. We thank C. Vanbelle and C. Boucharon from CeCILE - SFR Sante Lyon-Est for technical assistance and helpful discussion. This work was supported by the Institut National du Cancer (2008-1-PL BIO 01 to D.A. and S.V.), Agence Nationale de la Recherche (BLAN07-3_186592 to D.A. and S.V.), Association d'Aide à la Recherche Cancérologique de Saint-Cloud (to R.L.).

and Fondation Recherche Médicale (Equipe FRM DEQ20110421278). S.G. was supported by Association pour la Recherche sur le Cancer; L.G. and S.P. by Agence Nationale de la Recherche; E.Z., H.M. and J.-P.V. by FRM; E.D. by Ligue Nationale Contre le Cancer; and M.P.E. by Association Française contre les Myopathies.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

E.D., S.P., M.D., R.L., S.V. and D.A. designed the experiments; S.V. and D.A. supervised the project; E.D., S.P., K.D., L.G., M.L.-T., E.Z. and S.G. conducted the experiments; M.P.E., H.M. and J.-P.V. performed all bioinformatics analysis. All authors performed the data analysis and wrote the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Published online at <http://www.nature.com/doi/10.1038/nsmb.2390>.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

- Füllgrabe, J., Kavanagh, E. & Joseph, B. Histone onco-modifications. *Oncogene* **30**, 3391–3403 (2011).
- Portela, A. & Esteller, M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat. Biotechnol.* **28**, 1057–1068 (2010).
- Dalvai, M. & Bystrycky, K. The role of histone modifications and variants in regulating gene expression in breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **15**, 19–33 (2010).
- Kapoor, A. *et al.* The histone variant macroH2A suppresses melanoma progression through regulation of CDK8. *Nature* **468**, 1105–1109 (2010).
- Srivastava, N., Gochhait, S., de Boer, P. & Bamezai, R.N. Role of H2AX in DNA damage response and human cancers. *Mutat. Res.* **681**, 180–188 (2009).
- Valdés-Mora, F. *et al.* Acetylation of H2A.Z is a key epigenetic modification associated with gene deregulation and epigenetic remodeling in cancer. *Genome Res.* **22**, 307–321 (2012).
- Sporn, J.C. *et al.* Histone macroH2A isoforms predict the risk of lung cancer recurrence. *Oncogene* **28**, 3423–3428 (2009).
- Novikov, L. *et al.* QKI-mediated alternative splicing of the histone variant macroH2A1 regulates cancer cell proliferation. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 4244–4255 (2011).
- Venables, J.P. *et al.* Cancer-associated regulation of alternative splicing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 670–676 (2009).
- Duterte, M. *et al.* Exon-based clustering of murine breast tumor transcriptomes reveals alternative exons whose expression is associated with metastasis. *Cancer Res.* **70**, 896–905 (2010).
- David, C.J. & Manley, J.L. Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. *Genes Dev.* **24**, 2343–2364 (2010).
- Duterte, M., Vagner, S. & Auboeuf, D. Alternative splicing and breast cancer. *RNA Biol.* **7**, 403–411 (2010).
- Stamm, S. *et al.* Function of alternative splicing. *Gene* **344**, 1–20 (2005).
- Pan, Q., Shai, O., Lee, L.J., Frey, B.J. & Blencowe, B.J. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat. Genet.* **40**, 1413–1415 (2008).
- Witten, J.T. & Ule, J. Understanding splicing regulation through RNA splicing maps. *Trends Genet.* **27**, 89–97 (2011).
- Aslakson, C.J. & Miller, F.R. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res.* **52**, 1399–1405 (1992).
- Bemmo, A. *et al.* Exon-level transcriptome profiling in murine breast cancer reveals splicing changes specific to tumors with different metastatic abilities. *PLoS ONE* **5**, e11981 (2010).
- Fuller-Pace, F.V. & Moore, H.C. RNA helicases p68 and p72: multifunctional proteins with important implications for cancer development. *Future Oncol.* **7**, 239–251 (2011).
- Janknecht, R. Multi-talented DEAD-box proteins and potential tumor promoters: p68 RNA helicase (DDX5) and its paralog, p72 RNA helicase (DDX17). *Am. J. Transl. Res.* **2**, 223–234 (2010).
- Bates, G.J. *et al.* The DEAD box protein p68: a novel transcriptional coactivator of the p53 tumour suppressor. *EMBO J.* **24**, 543–553 (2005).
- Endoh, H. *et al.* Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5363–5372 (1999).
- Höning, A., Auboeuf, D., Parker, M.M., O'Malley, B.W. & Berget, S.M. Regulation of alternative splicing by the ATP-dependent DEAD-box RNA helicase p72. *Mol. Cell Biol.* **22**, 5698–5707 (2002).
- Guil, S. *et al.* Roles of hnRNP A1, SR proteins, and p68 helicase in c-H-ras alternative splicing regulation. *Mol. Cell Biol.* **23**, 2927–2941 (2003).
- Kar, A. *et al.* RNA Helicase p68 (DDX5) regulates tau exon 10 splicing by modulating a stem-loop structure at the 5' splice site. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 1812–1821 (2011).
- Thomas, P.D. *et al.* PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. *Genome Res.* **13**, 2129–2141 (2003).
- Gamble, M.J., Frizzell, K.M., Yang, C., Krishnakumar, R. & Kraus, W.L. The histone variant macroH2A1 marks repressed autosomal chromatin, but protects a subset of its target genes from silencing. *Genes Dev.* **24**, 21–32 (2010).
- Buschbeck, M. *et al.* The histone variant macroH2A is an epigenetic regulator of key developmental genes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1074–1079 (2009).
- Timinszky, G. *et al.* A macrodomain-containing histone rearranges chromatin upon sensing PARP1 activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 923–929 (2009).
- Gamble, M.J. & Kraus, W.L. Multiple facets of the unique histone variant macroH2A: from genomics to cell biology. *Cell Cycle* **9**, 2568–2574 (2010).
- Grek, C.L. & Tew, K.D. Redox metabolism and malignancy. *Curr. Opin. Pharmacol.* **10**, 362–368 (2010).
- Pani, G., Galeotti, T. & Chiarugi, P. Metastasis: cancer cell's escape from oxidative stress. *Cancer Metastasis Rev.* **29**, 351–378 (2010).
- Chaiswing, L. & Oberley, T.D. Extracellular/microenvironmental redox state. *Antioxid. Redox Signal.* **13**, 449–465 (2010).
- Mori, K., Shibamura, M. & Nose, K. Invasive potential induced under long-term oxidative stress in mammary epithelial cells. *Cancer Res.* **64**, 7464–7472 (2004).
- Teoh, M.L., Fitzgerald, M.P., Oberley, L.W. & Domann, F.E. Overexpression of extracellular superoxide dismutase attenuates heparanase expression and inhibits breast carcinoma cell growth and invasion. *Cancer Res.* **69**, 6355–6363 (2009).
- Svensk, A.M., Soini, Y., Paakko, P., Hiravikoski, P. & Kinnula, V.L. Differential expression of superoxide dismutases in lung cancer. *Am. J. Clin. Pathol.* **122**, 395–404 (2004).
- Abdelhaleem, M. Helicases: an overview. *Methods Mol. Biol.* **587**, 1–12 (2010).
- Yang, L., Lin, C. & Liu, Z.R. P68 RNA helicase mediates PDGF-induced epithelial mesenchymal transition by displacing Axin from β -catenin. *Cell* **127**, 139–155 (2006).
- Germann, S. *et al.* Dual role of the ddx5/ddx17 RNA helicases in the control of the pro-migratory NFAT5 transcription factor. *Oncogene* **618**, 1038–1048 (2012).
- Wang, D. *et al.* RNA helicase DDX5 regulates microRNA expression and contributes to cytoskeletal reorganization in basal breast cancer cells. *Mol. Cell Proteomics* **11**, M111.011932 (2012).
- Shin, S., Rossow, K.L., Grande, J.P. & Janknecht, R. Involvement of RNA helicases p68 and p72 in colon cancer. *Cancer Res.* **67**, 7572–7578 (2007).
- Mooney, S.M., Grande, J.P., Salisbury, J.L. & Janknecht, R. Sumoylation of p68 and p72 RNA helicases affects protein stability and transactivation potential. *Biochemistry* **49**, 1–10 (2010).
- Wortham, N.C. *et al.* The DEAD-box protein p72 regulates ER α -oestrogen-dependent transcription and cell growth, and is associated with improved survival in ER α -positive breast cancer. *Oncogene* **28**, 4053–4064 (2009).
- Yang, L., Lin, C. & Liu, Z.R. Phosphorylations of DEAD box p68 RNA helicase are associated with cancer development and cell proliferation. *Mol. Cancer Res.* **3**, 355–363 (2005).
- Carter, C.L., Lin, C., Liu, C.Y., Yang, L. & Liu, Z.R. Phosphorylated p68 RNA helicase activates Snail1 transcription by promoting HDAC1 dissociation from the Snail1 promoter. *Oncogene* **29**, 5427–5436 (2010).
- Causevic, M. *et al.* Overexpression and poly-ubiquitylation of the DEAD-box RNA helicase p68 in colorectal tumours. *Oncogene* **20**, 7734–7743 (2001).
- Jacobs, A.M. *et al.* SUMO modification of the DEAD box protein p68 modulates its transcriptional activity and promotes its interaction with HDAC1. *Oncogene* **26**, 5866–5876 (2007).
- Mooney, S.M., Goel, A., D'Assoro, A.B., Salisbury, J.L. & Janknecht, R. Pleiotropic effects of p300-mediated acetylation on p68 and p72 RNA helicase. *J. Biol. Chem.* **285**, 30443–30452 (2010).
- Sporn, J.C. & Jung, B. Differential regulation and predictive potential of MacroH2A1 isoforms in colon cancer. *Am. J. Pathol.* **180**, 2516–2526 (2012).
- Kustatscher, G., Hothorn, M., Pugieux, C., Scheffzek, K. & Ladurner, A.G. Splicing regulates NAD metabolite binding to histone macroH2A. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 624–625 (2005).
- Krishnakumar, R. & Kraus, W.L. The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Mol. Cell* **39**, 8–24 (2010).
- Giansanti, V., Dona, F., Tillhon, M. & Scovassi, A.I. PARP inhibitors: new tools to protect from inflammation. *Biochem. Pharmacol.* **80**, 1869–1877 (2010).
- Cyr, A.R. & Domann, F.E. The redox basis of epigenetic modifications: from mechanisms to functional consequences. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 551–589 (2011).
- Acharya, A., Das, I., Chandhok, D. & Saha, T. Redox regulation in cancer: a double-edged sword with therapeutic potential. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **3**, 23–34 (2010).
- Weaver, A.M. Regulation of cancer invasion by reactive oxygen species and Tks family scaffold proteins. *Sci. Signal.* **2**, pe56 (2009).
- Svineng, G., Ravuri, C., Rikardsen, O., Huseby, N.E. & Winberg, J.O. The role of reactive oxygen species in integrin and matrix metalloproteinase expression and function. *Connect. Tissue Res.* **49**, 197–202 (2008).
- Radisky, D.C. *et al.* Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* **436**, 123–127 (2005).
- Li, X. *et al.* The atypical histone macroH2A1.2 interacts with HER-2 in cancer cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 23171–23183 (2012).
- Luco, R.F., Allo, M., Schor, I.E., Kornblihtt, A.R. & Misteli, T. Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell* **144**, 16–26 (2011).

ONLINE METHODS

Cell culture, treatment and transfection. 67NR, 168FARN, 4T07 and 4T1 cells were kindly provided by F. Miller (Michigan Cancer Foundation, Detroit, Michigan, USA). Cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS at 37 °C. Transient transfection of siRNAs (25 nM) was performed by using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Cells were harvested 48 h after transfection. For rescue experiments, HeLa cells were transfected with siRNA targeting the *Ddx5* and *Ddx17* UTR regions. Twenty-four hours later, wild-type and either mutated *Ddx5* or *Ddx17* expression vectors were transfected by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Cells were harvested 48 h later. siRNA sequences are provided in **Supplementary Table 4**. *siDdx5-17* is an siRNA that targets a conserved sequence that simultaneously affects *Ddx5* and *Ddx17* (and not a mixture of *siDdx5* and *siDdx17*) (**Supplementary Table 4**).

Minigene assay and PCR digestion. *hH2AFY* exon 6, with 200 bp and 174 bp of flanking introns, was amplified by PCR with the primers 5'-GGAATTCATATGGAATTCCTAGTTTGCTTGC-3' and 5'-GGAATTCATATGGAATTCACACTTGGAAATGGC-3' that contained the NdeI restriction site. *hH2AFY* exon 7, with 106 bp and 212 bp of flanking introns, was amplified by PCR with the primers 5'-GGAATTCATATGGAATTCATATGCTGCTGCGT-3' and 5'-GGAATTCATATGGAATTCATATGCTGCTGCGT-3' that contained the NdeI restriction sites. NdeI-digested PCR products were cloned into pTBminigene. Primers used for minigene assay are described in **Supplementary Table 4**.

RNA preparation and RT-qPCR. Total RNA was extracted by using TRIzol (Invitrogen). One microliter of Glycoblue (Ambion) was added before RNA precipitation with isopropanol. RNA (1 µg) was treated with DNase I (DNAfree, Ambion) for 30 min at 37 °C and reverse-transcribed (RT) by using SuperScript II and random primers (Invitrogen). Before PCR, all RT reaction mixtures were diluted to contain 2.5 ng/µl of initial RNA. PCR reactions were performed using 5 µl of the diluted cDNAs and GoTaq polymerase (Promega). Quantitative PCR (qPCR) was performed using 2.5 µl of the diluted cDNAs and SYBR Green I Master mix (Roche). Primer sequences are provided in **Supplementary Table 4**. The relative RNA levels were determined on the basis of the threshold cycle for each PCR product (Ct).

ChIP. Cells were cross-linked with 1% formaldehyde for 10 min and lysed in buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM KCl, 5 mM EDTA, 1% NP40, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 50 mM sodium fluoride and phosphatase and protease inhibitors. Chromatin was sheared by sonication with a Bioruptor (Diagenode) to generate ~200-bp DNA fragments and incubated with antibodies against mH2A1 (5 µg, Abcam cat. no. 37264), H3 (1 µg, Abcam cat. no. 1791) or control immunoglobulins (Santa Cruz) and magnetic beads overnight at 4 °C. Beads were washed five times with buffer containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM KCl, 1% NP40 and 0.25% sodium deoxycholate, and two times with TE buffer⁵⁹. Antibody-bound chromatin was reverse cross-linked overnight at 65 °C and treated with proteinase K (Qiagen) before DNA purification on column (Qiagen). Purified DNA was diluted three times in water and analyzed by qPCR.

Western blot analysis. Protein extracts were obtained by using NP-40 buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 0.4 M NaCl, 5 mM EDTA, pH 8, 1% NP40, 0.2% SDS and 1 mM DTT) and protease inhibitors (Sigma). Ten micrograms of total proteins were separated by SDS-PAGE, and western blotting was subsequently performed with antibodies against *Ddx5* (PAb204, Upstate/Millipore, 1:1,000), *Ddx17* (ab24601, Abcam, 1:250), mH2A1.1 (4160, Cell Signaling, 1:1,000), mH2A1.2 (4287, Cell Signaling, 1:1,000), mH2A1 (ab37264, Abcam, 1:1,000) and β -actin (Mab1501, Millipore, 1:1,000).

Cell-migration, invasion and wound-healing assays. For cell-migration assay, cells (4×10^4 for 67NR and 2×10^4 for 4T1) were plated, in serum-free medium 48 h after transfection, in the upper chamber of 8-µm pore-size ThinCerts.

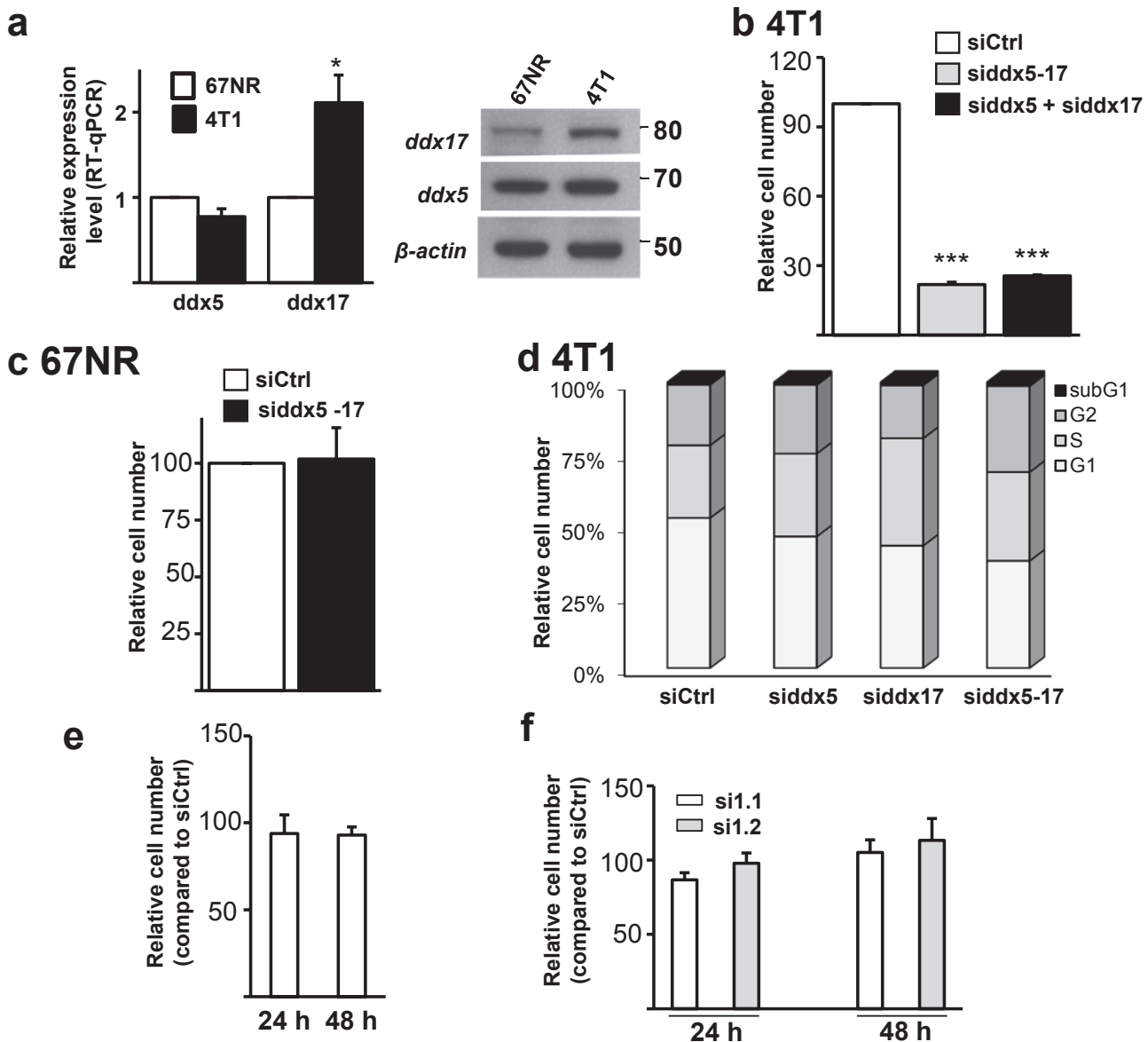
The bottom chamber was filled with complete medium. After 24 h, cells at the top side of the filter were removed with a cotton swab. The remaining cells at the bottom side were washed with PBS, fixed with 10% TCA and stained with Amido black. Cells were counted from three randomized fields per well under a Nikon inverted microscope. A cell-invasion assay was performed in similar conditions, except that wells were precoated with matrigel at a 1:3 dilution for 4T1 or a 1:12 dilution for 67NR (BD Biosciences). For wound-healing assays, 2 d after transfection, a wound space of a confluent cell monolayer was produced by scratching the plate with a p200 pipette tip. The percentage of migration was defined at different times (8, 16, or 24 h) by measuring the lengthwise migration three times with the program ImageJ. Mitomycin C was added 1 h before wounding and maintained during migration. Recombinant SOD protein (100 units; S9697, Sigma) were added after cells were plated in the upper chamber.

Affymetrix exon array. One microgram of total RNA purified with TRIzol was labeled with Ambion reagents and hybridized to Affymetrix GeneChip Mouse Exon 1.0 ST arrays. Affymetrix exon-array data were normalized with quantile normalization. The background correction was performed by using antigenomic probes. Only probes targeting exons annotated from full-length cDNA were used for analysis. Among these preselected probes, poor-quality probes (for example, probes labeled as 'cross-hybridizing' probes by Affymetrix) and probes with intensity signals that were too low when compared to antigenomic background probes with the same GC content were removed from the analysis. Only probes with a DABG *P* value of ≤ 0.05 in at least half of the chips were considered for further statistical analysis. Paired statistical analyses were performed by using the Student's paired *t*-test on the splicing index to analyze the exon-array data. The splicing index corresponds to a comparison of gene-normalized exon intensity values between the two analyzed experimental conditions.

Clinical samples, quantitative PCR and statistical analysis. Samples of 443 breast cancer tumors excised from women at the Institut Curie/Hôpital René Huguenin (Saint-Cloud, France) from 1978 to 2008 were analyzed. This study was approved by the local ethical committee (Breast Group of Hôpital René Huguenin), which provided informed consent. Standard prognostic factors are reported in **Supplementary Figure 4**. Immediately after surgery, the tumor samples were flash frozen and stored in liquid nitrogen until RNA extraction. The samples were examined histologically for the presence of at least 60% tumor cells. The patients (mean age, 61.7 yrs; range, 35–91 yrs) all met the criteria of having primary unilateral breast carcinoma for which complete clinical, histological and biological data were available; 378 patients received adjuvant therapy, consisting of chemotherapy alone in 90 cases, hormone therapy alone in 175 cases and both treatments in 93 cases. The median follow-up was 8.9 years (range 0.5–29.0). A total of 168 patients relapsed at distant sites.

All RT-qPCR reactions were performed by using an ABI Prism 7700 Sequence Detection System and the SYBR Green PCR Core Reagents kit (PerkinElmer Applied Biosystems). TATA-box-binding protein (TBP) transcripts were used as an endogenous RNA control, and each sample was normalized on the basis of its TBP content. To determine whether the mH2A1 splicing-variant ratio was associated with patient clinical outcome, metastasis-free survival distribution was estimated by the Kaplan-Meier method. To select cutoff expression levels to classify each patient in one of two risk groups, sensitivity and specificity was explored by using a receiver-operating curve (ROC) analysis. Briefly, the area under the ROC curve (with 95% confidence interval) was calculated, and a test for the null hypothesis that the area under the curve was 50% was performed. The ROC analysis provided the threshold expression value to balance sensitivity and specificity for the detection of life-threatening cancer, and this cut point was used in the Kaplan-Meier analysis. Kaplan-Meier curves estimate metastasis-free survival from 0 to 180 months after breast cancer diagnosis. The Spearman rank correlation test provided correlation between continuous variables.

59. Bittencourt, D. *et al.* Cotranscriptional splicing potentiates the mRNA production from a subset of estradiol-stimulated genes. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 5811–5824 (2008).



Supplementary Figure 1: Effect of ddx5 and ddx17 in cell migration and proliferation in the 4T1 mouse model of mammary tumor progression.

(a) ddx17, but not ddx5, was overexpressed in the metastatic 4T1 cells, both at the RNA (left panel) and at the protein level (right panel), as compared to non-metastatic 67NR cells.

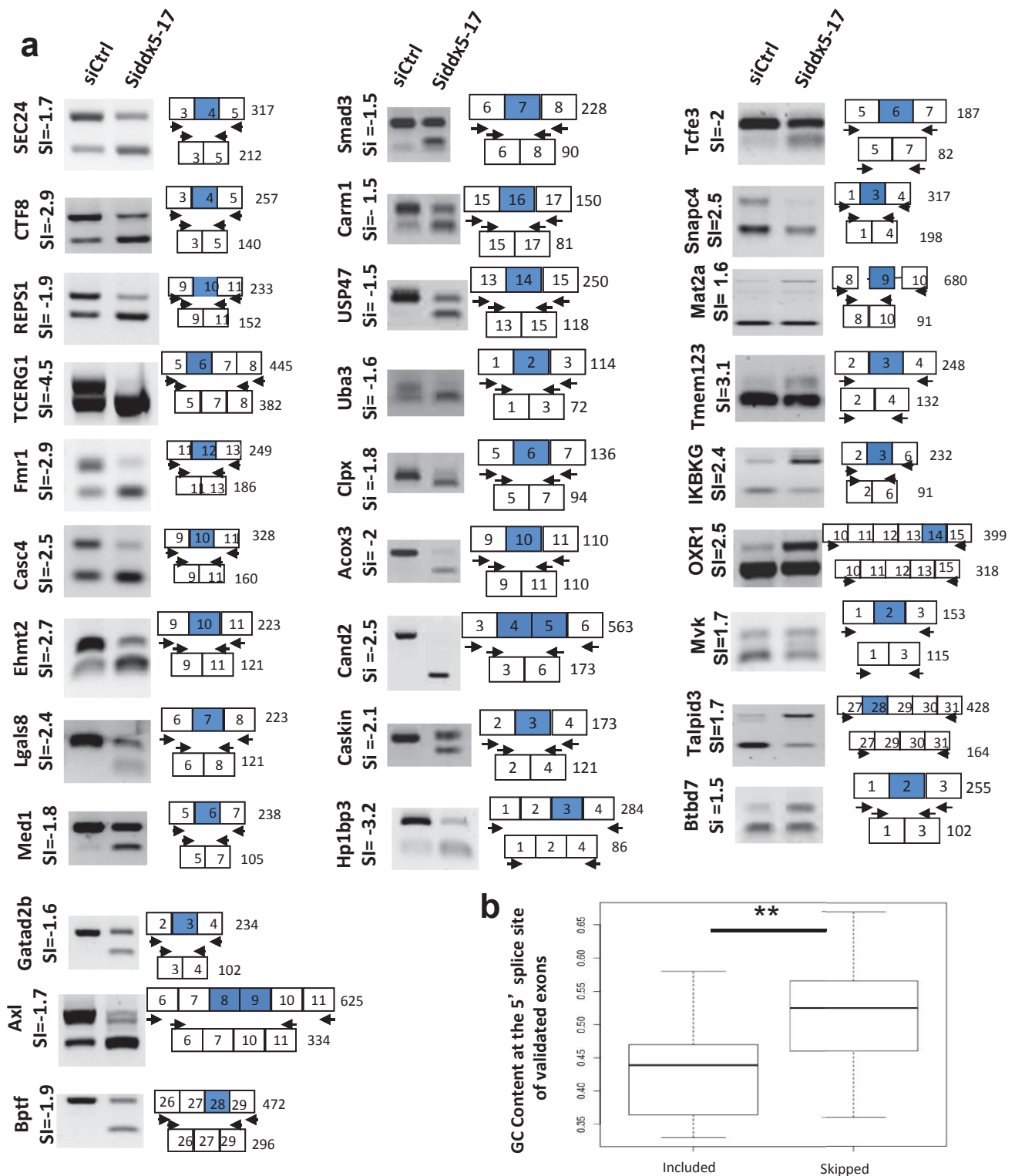
(b) The siRNA siddx5-17 corresponds to a conserved sequence that allows ddx5 and ddx17 to be targeted simultaneously. Using siddx5-17 had similar effects on cell migration as did a mixture of siddx5 and siddx17 (siddx5 + siddx17).

(c) ddx5 and ddx17 depletion (using siddx5-17) did not affect cell migration of the 67NR non-invasive cells.

(d) Under the tested conditions, ddx5 and/or ddx17 depletion in 4T1 cells did not affect subG1 cell proportion, indicating that it did not affect cell apoptosis. In addition, ddx5 and/or ddx17 depletion in 4T1 cells did not increase the G1- to S-phase ratio, indicating that it did not decrease cell proliferation; this was substantiated by DNA flow cytometry analysis.

(e) Depletion of ddx5 and ddx17 did not affect 4T1 cell proliferation, as assessed by the sulforhodamine B growth assay at 24 h or 48 h after siddx5-17 transfection.

(f) Depletion of mH2A1.1 or mH2A1.2 isoforms did not affect 4T1 cell proliferation, as assessed by the sulforhodamine B growth assay at 24 h or 48 h after si1.1 or si1.2 transfection.

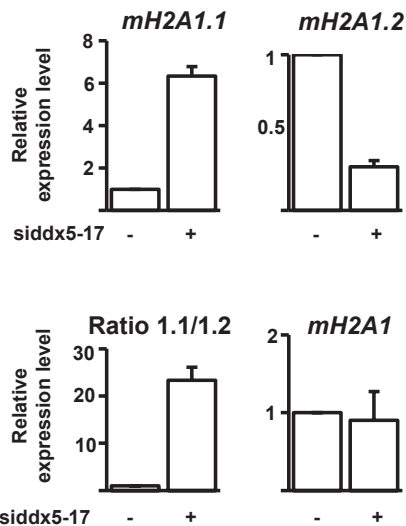


Supplementary Figure 2: Validation of splicing events regulated by ddx5 and ddx17

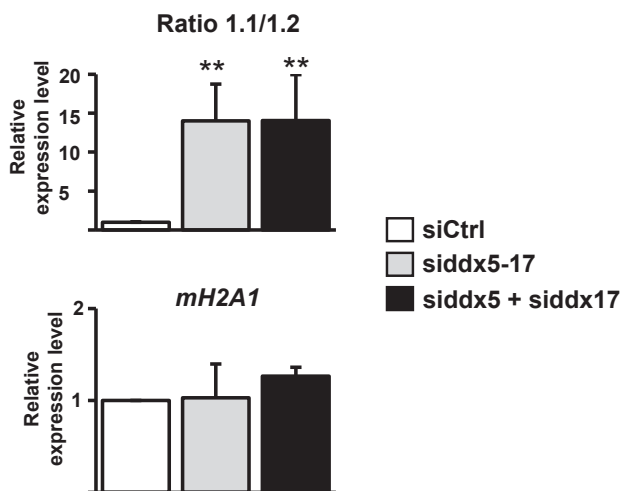
(a) Validation by RT-PCR of the splicing events predicted by exon array analysis to be regulated by ddx5 and ddx17. 4T1 cells were transfected for 48 h with a control siRNA (siCtrl) or an siRNA targeting both ddx5 and ddx17 (siddx5-17). Depletion of ddx5 and ddx17 induced both exon inclusion and exon skipping. SI: Splicing Index calculated from the exon array dataset.

(b) Comparison of GC content at the 5' splicing site of included or skipped exons upon ddx5-17 depletion.

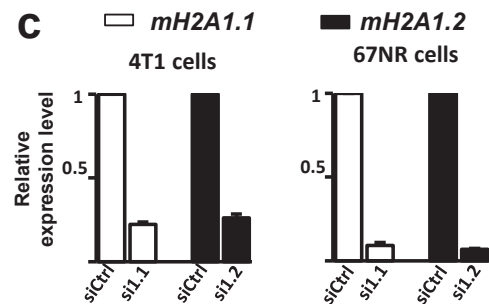
a 4T1



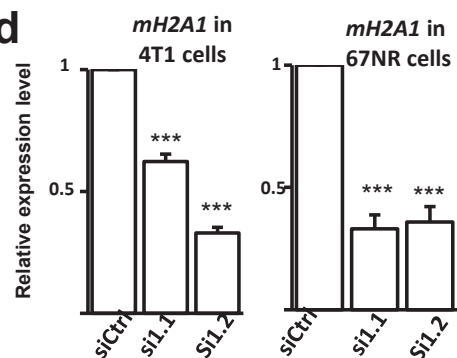
b 4T1



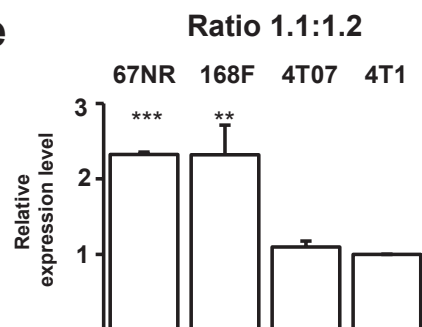
c



d



e



Supplementary Figure 3: Regulation of the expression of the mH2A1.1 and mH2A1.2 isoforms in the 4T1 mouse model of tumor progression.

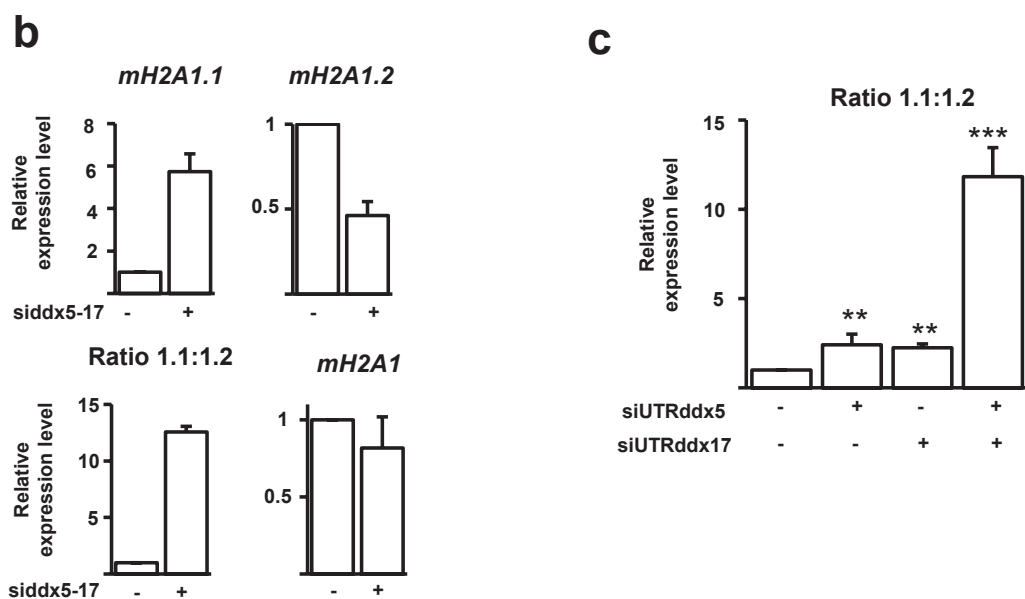
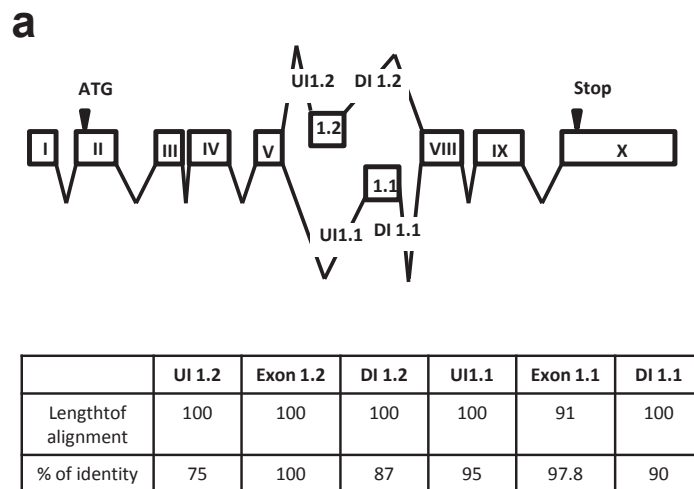
(a) Depletion of *ddx5* and *ddx17* in mouse 4T1 cells increased the mH2A1.1 isoform level and decreased mH2A1.2 isoform level, which resulted in the increase in the mH2A1.1 to mH2A1.2 ratio without affecting the global expression level of the mH2A1 gene.

(b) *Siddx5-17*, which targets *ddx5* and *ddx17* simultaneously, had similar effect on mH2A1 splicing as a mixture of *siddx5* and *siddx17* (*siddx5* + *siddx17*).

(c) Validation of si1.1 and si1.2 in 4T1 and 67NR cells, by measuring mH2A.1 and mH2A1.2 splicing variants by RT-qPCR.

(d) RT-qPCR analyses of the mH2A1 total mRNA levels after transfection with siCtrl, si1.1, or si1.2 in 4T1 cells or 67NR cells.

(e) Relative expression levels of mH2A1.1 and mH2A1.2 mRNAs, as measured by RT-qPCR, in mouse primary tumors with different metastatic capability. Histograms represent the average of three independent experiments corresponding to the fold change of the mH2A1.1 to mH2A1.2 ratio.

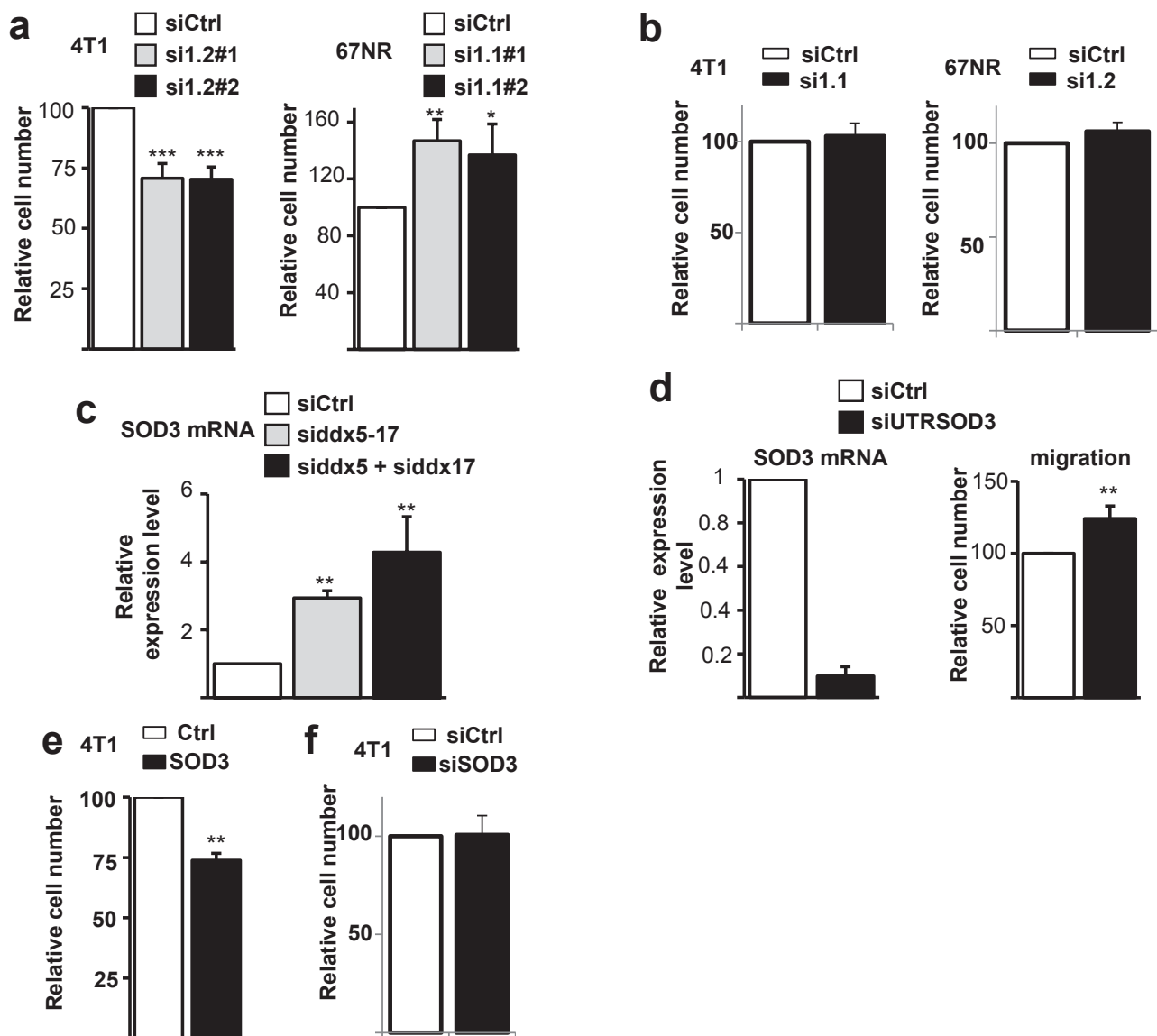


Supplementary Figure 4: Regulation of the expression of the mH2A1.1 and mH2A1.2 isoforms in HeLa cells.

(a) The mH2A1 gene is highly conserved during evolution. Alignment of human and mouse sequences of exon 1.1, exon 1.2, and 100 nucleotides of the surrounding introns revealed 75% to 100% conservation. UI: upstream intron; DI: downstream intron.

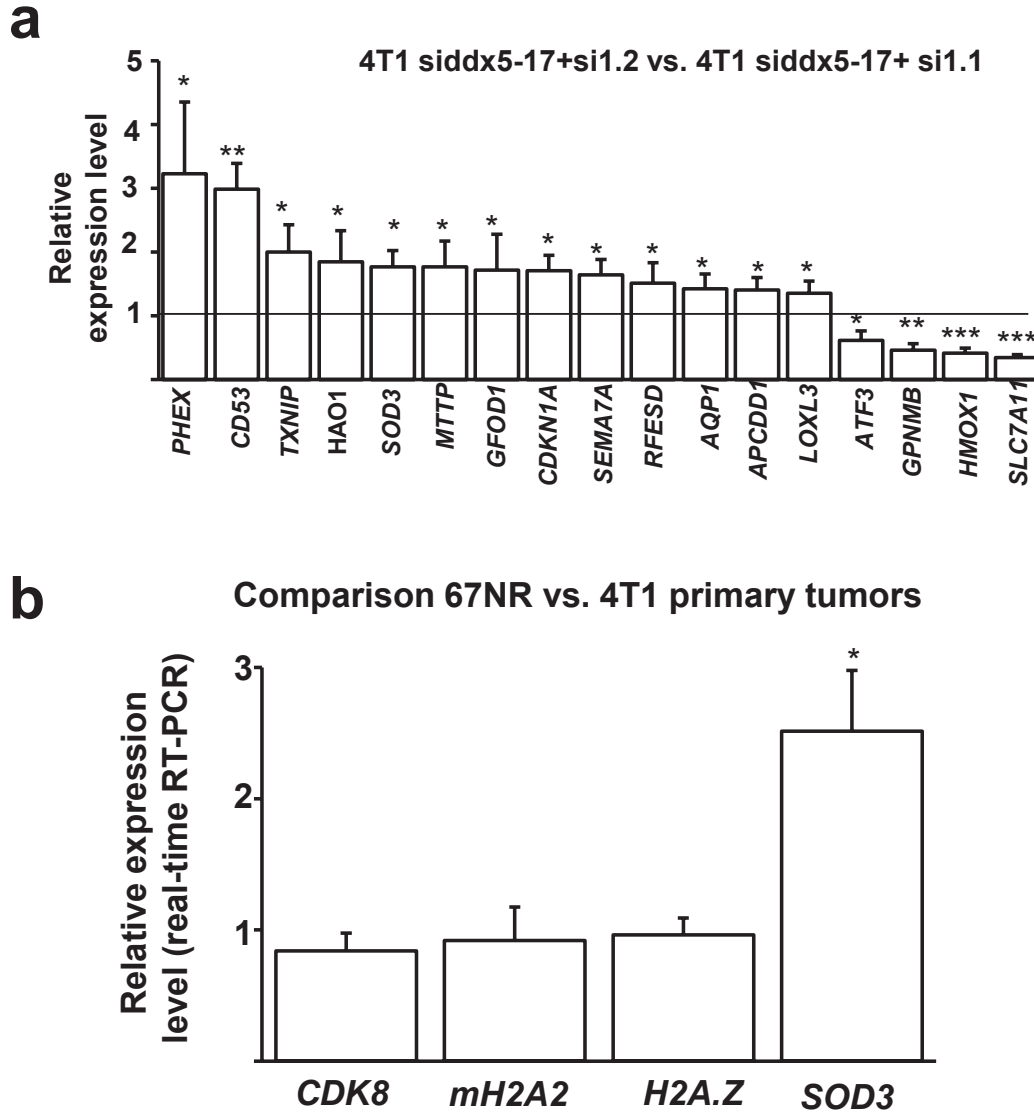
(b) Depletion of ddx5 and ddx17 in human HeLa cells increased the mH2A1.1 isoform level and decreased mH2A1.2 isoform level, resulting in increase in the mH2A1.1 to mH2A1.2 ratio without affecting the global expression level of the mH2A1 gene.

(c) Depletion of ddx5 (siUTRddx5) or ddx17 (siUTRddx17) in human HeLa cells increased the mH2A1.1 to mH2A1.2 ratio, and depletion of both ddx5 and ddx17 worked synergistically to further increase this ratio.



Supplementary Figure 5: Effect of mH2A1 splicing isoforms and SOD3 on 67NR and 4T1 cell migration

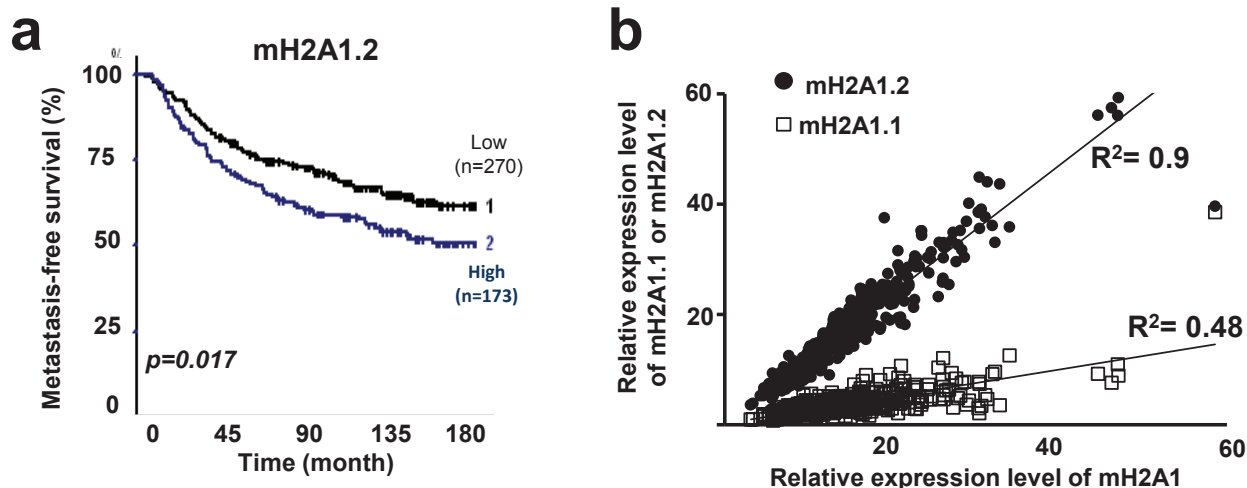
(a) Two different siRNAs targeting the mH2A1.2 isoform inhibited 4T1 cell migration (left panel), two different siRNAs targeting the mH2A1.1 isoform increased 67NR cell migration (right panel).
 (b) Depletion of the mH2A1.1 isoform in 4T1 cells, and of mH2A1.2 in 67NR cells, had no effect on cell migration.
 (c) siddx5-17 targeting simultaneously ddx5 and ddx17 had similar effects on SOD3 expression as a mixture of siddx5 and siddx17 (siddx5 + siddx17).
 (d) siRNAs targeting SOD3 mRNA UTR (siUTRSOD3; left panel) increased 67NR cell migration (right panel).
 (e) Addition of SOD3 protein in culture media inhibited 4T1 cell migration.
 (f) SOD3 depletion had no effect on 4T1 cell migration, as expected considering the low expression of SOD3 in these cells.



Supplementary Figure 6: Gene expression regulation by mH2A1 splicing isoforms.

(a) Validation by RT-qPCR of the expression level of genes predicted by the microarray analysis to be differentially expressed when 4T1 cells transfected with siddx5-17 and si1.2 were compared to 4T1 cells transfected with siddx5-17 and si1.1. Histograms represent the average of at least three independent experiments. Error bars represent S.E.M. (* P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (t-test)).

(b) Relative expression levels measured by RT-qPCR of CDK8, mH2A2, H2A.Z, and SOD3 RNAs, when comparing non-metastatic 67NR to metastatic 4T1 primary tumors. Only SOD3 mRNA was more highly expressed in non-metastatic 67NR as compared to the metastatic 4T1 primary tumors.



C

Variables	Metastasis-free survival	
	HR (95% CI) ^a	p-value
<i>Lymph node status</i>		
0	1	0.00014
1-3	1.57 (1.24-1.98)	
>3	2.46 (1.55-3.90)	
<i>SBR histological grade</i>		
1	1	0.0011
2	1.52 (1.18-1.95)	
3	2.31 (1.40-3.80)	
<i>Macroscopic tumor size</i>		
≤ 25mm	1	0.015
>25 mm	1.56 (1.08-2.09)	
<i>mH2A1.2 expression</i>		
low expression	1	0.043
high expression	1.37 (1.01-1.87)	

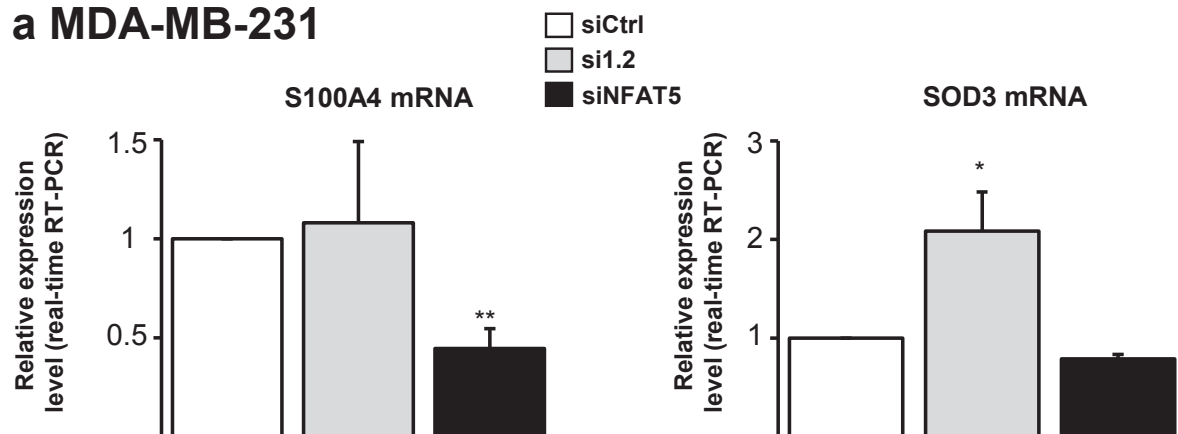
Supplementary Figure S7: Expression of mH2A1 splicing isoforms in breast cancer patients.

(a) Kaplan-Meier curves for 180-month outcome in breast cancer patients (n = 443), based on the mH2A1.2 expression level.

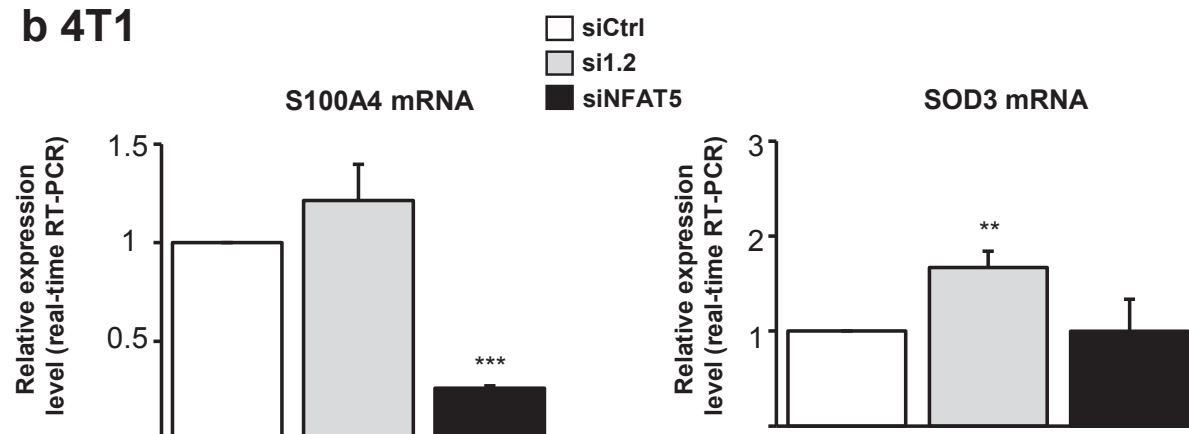
(b) The global expression level of mH2A1 histone correlates with the expression level of the mH2A1.2 splicing isoform in human breast tumors.

(c) A high expression level of the mH2A1.2 isoform correlates with the prognostic value, independently of other known markers of disease severity, including lymph node status, Scarff Bloom Richardson (SBR) histological grade, and macroscopic tumor size, as demonstrated by multivariable Cox regression analysis of metastasis-free survival in breast cancer patients. The significance of differences between survival rates was ascertained using the log-rank test. Cox proportional hazards regression model was used to assess prognostic significance. a: hazard ratio and 95% confidence interval.

a MDA-MB-231



b 4T1



Supplementary Figure 8: SOD3 and S100A4 gene expression regulation by NFAT5 and mH2A1.2 in 4T1 and MDA-MB-231 breast cancer cells.

NFAT5, whose transcriptional activity depends on ddx5-ddx17, controls the expression of different set of genes as the mH2A1.2 isoform, whose splicing is regulated by ddx5-ddx17. Indeed, NFAT5 depletion inhibited S100A4 expression (which favors cell migration) but had no effect on SOD3 expression, while depletion of mH2A1.2 increased SOD3 expression but had no effect on S100A4 expression, in both MDA-MB-231 cells (a) and 4T1 cells (b).

	Number of Patients N= 443	Number (%) of metastases N=168 (37.9)	p-value ^a
<i>Age</i>			
≤50	92	38 (41.3)	NS
>50	351	130 (37.3)	
<i>SBR histological grade^{b,c}</i>			0.000051
I	54	7 (13)	
II	226	84 (37.2)	
III	154	73 (47.4)	
<i>Lymph node status^d</i>			0.00000044
0	114	34 (29.8)	
1-3	231	76 (32.9)	
>3	97	58 (59.8)	
<i>Macroscopic tumor size^e</i>			0.000015
≤25mm	214	61 (28.5)	
>25mm	222	106 (47.7)	
<i>RE (estrogen receptor) status</i>			0.0054
Negative	114	51 (44.7)	
Positive	329	117 (34.6)	
<i>RP (progesteron receptor) status</i>			0.00094
Negative	191	85 (44.5)	
Positive	252	83 (32.9)	
<i>ERBB2</i>			NS
Negative	346	127 (36.7)	
Positive	97	41 (42.3)	

Supplementary Table 5: Characteristics of the 443 primary breast tumors

a Log-rank test. NS : not significant,

b Scarff Bloom Richardson classification.

c Available information about 434 patients.

d Available information about 442 patients.

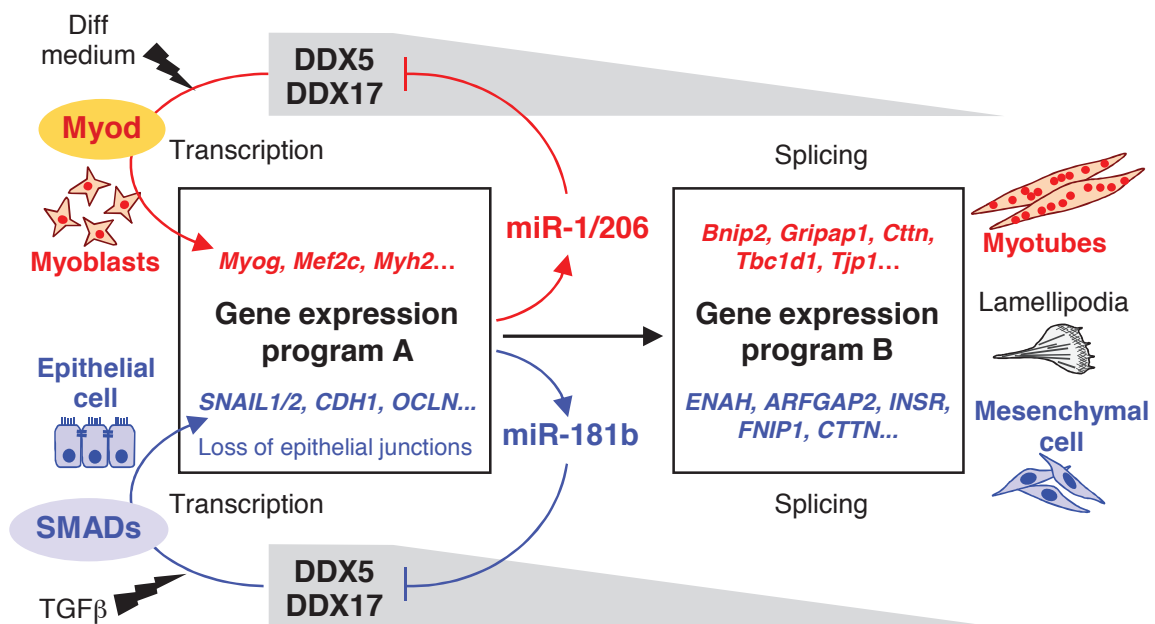
e Available information about 436 patients.

Article N°2

RNA helicases dynamically orchestrate transcription, microRNA and splicing programs in cell differentiation

Les références citées dans cet article sont répertoriées à la fin de l'article.

Dans cet article, je me suis intéressé au rôle de DDX5 et DDX17 dans la transition épithélio-mésenchymateuse. Tout d'abord j'ai démontré que les ARN hélicases DDX5 et DDX17 contrôlent un programme transcriptionnel avec les protéines Smads pour contrôler l'expression des facteurs SNAILs, des régulateurs majeurs de l'EMT, ainsi que l'expression de microARNs spécifique de la différenciation. Lors du processus de différenciation, ces microARNs régulent l'expression de DDX5 et DDX17 dans une boucle de régulation négative. Enfin la baisse d'expression de DDX5 et DDX17 contrôle un programme d'épissage qui contribue à l'acquisition de phénotypes morphologiques spécifiques de la transition épithélio-mésenchymateuse. Ces différents résultats ont également été retrouvés dans la différenciation myogénique. Ils suggèrent que les ARN hélicases DDX5 et DDX17 sont des orchestrateurs de la différenciation en contrôlant de manière dynamique différents niveaux de l'expression des gènes. Mon travail c'est focalisé essentiellement sur le modèle de la transition Epithélio-mésenchymateuse et sur les régulations au niveau de l'épissage dans les différents modèles.



Orchestration dynamique des différents niveaux de régulation des gènes par les ARN hélicases DDX5 et DDX17 au cours de l'EMT et la différenciation myogénique.

Title: RNA helicases dynamically orchestrate transcription, microRNA and splicing programs in cell differentiation

Authors: Etienne Dardenne^{1-4,†}, Micaela Polay Espinoza^{1-4,†}, Laurent Fattet^{1-4,†,‡}, Lise Gratadou¹⁻⁴, Helen Neil¹⁻⁴, Mathieu Deygas¹⁻⁴, Eleonora Zonta¹⁻⁴, Samaan Samaan¹⁻⁴, Sophie Germann¹⁻⁴, Fatima Zahra Chakrama¹⁻⁴, Martin Dutertre¹⁻⁴, Ruth Rimokh¹⁻⁴, Cyril F. Bourgeois^{1-4*} and Didier Auboeuf^{1-4*}

Affiliations:

¹INSERM U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69008 Lyon, France ;

²CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69008 Lyon, France ;

³Université Lyon 1, F-69000 Lyon, France ;

⁴Centre Léon Bérard, F-69008 Lyon, France

*Correspondence to: didier.auboeuf@inserm.fr and cyril.bourgeois@inserm.fr

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Centre Léon Bérard, 28 Rue Laënnec, 69008 Lyon, France.

Phone: +33.4.26.55.67.46

† These authors contributed equally to this work

‡ Current address : Department of Pharmacology, University of California, San Diego (USA)

Abstract: Gene expression programs, regulated at multiple levels by transcription, alternative splicing, and microRNAs, define the nature and functions of any given cell and are deeply modified during cell differentiation. How the multiple layers of gene expression are coordinated is poorly understood. Here we show in two distinct species and differentiation processes that the highly conserved DEAD box RNA helicases DDX5 and DDX17, first mediate differentiation-specific transcription programs and directly control the expression of key differentiation miRNAs. Second, during the ensuing differentiation process, these miRNAs downregulate DDX5 and DDX17 in a negative feedback loop. Third, the resulting downregulation of DDX5 and DDX17 directly elicits differentiation-specific splicing programs that further contribute to the acquisition of morphological phenotypes. Therefore, we identified a new type of differentiation factors, coined “master orchestrators”, that are not themselves cell type-specific but directly control several differentiation-specific master regulators, and orchestrate genetic circuitries characterized by a cascade of transcription, miRNA and splicing programs.

Main text:

Transcriptome reprogramming during cell differentiation involves multiple layers of regulation of gene expression including transcription, alternative splicing that expands the gene message, and miRNA which regulate messenger RNA stability and translation (1, 2), yet how these different layers are coordinated is still poorly understood. Several DEAD box RNA helicases like DDX5 and its paralog DDX17 are highly conserved proteins that function in most steps of the gene expression process, even though their targets and activities in complex biological processes are not well characterized (3-5). Both proteins are coregulators of several transcription factors, including, the master regulator of muscle differentiation

MYOD (6), and SMAD proteins (7), which mediate TGFb-induced epithelial to mesenchymal transition (EMT), *i.e.* the transdifferentiation of epithelial cells to fibroblasts (8). DDX5 and DDX17 are also components of the spliceosome and regulate alternative splicing (9-11). Finally, DDX5 and DDX17 control the biogenesis of specific miRNAs, in part via their interaction with the Drosha/DGCR8 complex (12, 13). In this report we tested the hypothesis that DDX5 and DDX17 actively coordinate these steps of gene expression during cell differentiation.

DDX5 and DDX17 mediate cell differentiation-specific transcriptional programs

To address the function of DDX5/DDX17 in EMT, we silenced their expression in MCF10a epithelial cells, using an siRNA targeting a conserved sequence in both *DDX5* and *DDX17* transcripts and which did not affect SMAD protein expression (fig. S1A). DDX5/DDX17 knockdown prior to TGFb treatment inhibited, at both RNA and protein levels, the TGFb-induced and SMAD2/3-dependent expression of *SNAI1* and *SNAI2*, two master regulators of EMT (8) (Fig. 1A and fig. S1B). DDX5 and DDX17 interacted with SMAD proteins and DDX5 was recruited on *SNAI1* and *SNAI2* promoters in response to TGFb (fig. S1, C,D). Microarray analysis revealed that a large number of TGFb-regulated genes were dependent on DDX5/DDX17 expression (Fig. 1, B,C, Tables S1 and S2). Among the genes that were not properly regulated by TGFb in DDX5/DDX17-depleted cells, several are involved in epithelial cell junctions (*e.g.*, Occludin and E-Cadherin, Fig. 1C and fig. S2A). Consistently, the SNAIL-dependent loss of epithelial cell junctions induced by TGFb (14) was compromised in DDX5/DDX17-depleted cells (Fig. 1D and fig. S2B). Thus, DDX5 and DDX17 are key transcriptional coregulators of SMADs mediating the induction of EMT by TGFb.

Likewise, we addressed the MYOD-related function of DDX5 and DDX17 in skeletal myoblast differentiation using the mouse pluripotent C2C12 cell line. Extending previous observations (6), Ddx5 interacted with Myod in nuclei (fig. S3A). and, Although it did not affect Myod expression (fig. S3B), the knockdown of *Ddx5/Ddx17* inhibited the Myod-dependent expression of *Myog* and *Mef2c* genes, two master regulators of myogenesis (15) (Fig. 1E and fig. S3C). Microarray analysis and immunolabeling assays respectively revealed that Ddx5/Ddx17 depletion impaired the expression of a large subset of genes regulated during myoblast differentiation (Fig. 1, F,G) and compromised myotube formation (Fig. 1H), confirming their key function in myogenesis (6).

A feedback regulatory loop involving microRNAs and DDX5/DDX17

Even though DDX5 and DDX17 were required for cell differentiation (Fig. 1), their protein levels decreased during both C2C12 and MCF10a differentiation (Fig. 2A). Phylogenetically conserved binding sites for two miRNAs known to be upregulated during myogenesis, miR-1 and miR-206 (16), are predicted within the 3' untranslated region (3' UTR) of both human and mouse *DDX5* and *DDX17* mRNAs (fig. S4, A,B). Strikingly, overexpression of pre-miR-1 or pre-miR-206 in C2C12 cells reduced Ddx5 and Ddx17 protein levels (Fig. 2B, left panel). Luciferase assays confirmed that this effect was dependent on direct binding of miR-1/206 onto predicted sites (right panel of Fig. 2B and fig. S4C). Remarkably, the induction of mature miR-1 and miR-206 and of their precursors pri-miR-1a1 and pri-miR-206 during C2C12 cell differentiation (17) was prevented by Ddx5/Ddx17 depletion (Fig. 2C), indicating that the primary effect was a transcriptional inhibition of these miRNA genes. The partial effect on pri-miR-206 suggested that Ddx5/Ddx17 could also control the processing of miR-206 precursors, in agreement with previous reports (12, 13).

Strikingly, the decreased expression of DDX5/DDX17 during TGFb-induced MCF10a transdifferentiation (Fig. 2A) is mediated by a similar feedback regulation loop. Indeed, miR-181b, that is involved in TGFb signaling (18), downregulated DDX5 protein expression (Fig. 2D) via a direct binding to *DDX5* 3'UTR (Fig. 2D and fig S4A). MiR-181b also repressed endogenous *DDX17* expression (Fig. 2D), even though no miR-181b binding site was predicted within *DDX17* 3' UTR (fig. S4B), suggesting either a non-canonical interaction or an indirect regulation by miR-181b. Moreover, TGFb-induced (18), SMAD2/3-dependent miR-181b expression in MCF10a cells (Fig. 2E and fig. S4D) was prevented by DDX5/DDX17 depletion (Fig. 2E and fig. S4E). Both DDX5 and the co-SMAD (SMAD4) were recruited on the promoter of the miR-181b-1 gene promoter (Fig. 2F), further demonstrating a direct role of DDX5 in miR-181b induction.

Altogether, our results revealed a negative feedback loop of regulation during both myoblast differentiation and TGFb-induced EMT: DDX5/DDX17 promote the expression of specific miRNAs, which in turn directly downregulate DDX5/DDX17 expression. In addition, these miRNAs may have a broader impact on differentiation, as shown for miR-1/206 in myoblasts (19). Accordingly, the transcripts downregulated in a Ddx5/Ddx17-dependent manner during C2C12 cell differentiation are enriched in predicted miR-1/206 binding sites (fig. S4F). The direct regulation of both coding (Fig. 1) and non-coding (Fig. 2) master genes of differentiation by DDX5/DDX17 emphasizes their key coordinating role in the complex cellular process.

Downregulation of DDX5/DDX17 drives cell differentiation-specific splicing programs

Since DDX5 and DDX17 are also involved in splicing, we tested whether their downregulation could affect alternative splicing in C2C12 and MCF10a cells. Splicing of

several hundreds of cassette exons was altered upon DDX5/DDX17 knockdown in undifferentiated C2C12 or MCF10a cells (Fig. 3A and fig. S5, Tables S3 and S4), including a subgroup of orthologous exons regulated similarly in both cell types (Fig. 3B).

To demonstrate the direct involvement of DDX5 and DDX17 in the splicing of exons regulated in both C2C12 and MCF10a cells, rescue experiments were performed using siRNAs targeting the 3' UTR of endogenous *DDX5* and *DDX17* transcripts in stable MCF7 cell lines (11, 20). The splicing alteration induced by DDX5/DDX17 depletion was rescued upon expression of wild-type, but not helicase-mutated DDX5 or DDX17 (Fig. 3C and fig. S6A). Next, transfected minigenes containing the human *REPS1* or *CHTF8* cassette exons recapitulated the endogenous splicing pattern and were similarly regulated by DDX5/DDX17 (fig. S6B). Third, HA-tagged (Fig. 3D) or endogenous DDX5 (fig. S6C) could be immunoprecipitated together with its target RNAs, preferentially at the level of regulated exons.

Interestingly, a subset of the exons regulated during myogenesis in our study (Fig. 3A) and in a previous study (21), were regulated similarly by *Ddx5/Ddx17* silencing in undifferentiated C2C12 cells (Fig. 3E and fig. S7A). Likewise, a subset of the exons regulated during TGFb-induced EMT (Fig. 3A) (22, 23) were regulated similarly by DDX5/DDX17 depletion in untreated MCF10A cells (Fig. 3F and fig. S7D). Other differentiation-specific variants were unaffected by *DDX5/DDX17* knockdown (Fig. 3 E,F and fig. S7 C,F). Supporting a model where miRNA-induced DDX5/DDX17 downregulation drives a specific splicing program in differentiating cells, ectopic overexpression of miR-1 or miR-206 in C2C12 cells (Fig. 3E and fig. S7B), or miR-181b in MCF10a cells (Fig. 3F and fig. S7E), induced a similar splicing pattern than cell differentiation and DDX5/DDX17 depletion.

Interestingly, a subset of genes whose splicing was similarly regulated upon DDX5/DDX17 downregulation or cell differentiation, are involved in actin cytoskeleton dynamics (fig. S8). Remarkably, DDX5/DDX17 depletion in both C2C12 and MCF10a cells induced the formation of lamellipodia, cellular projections that require a profound remodeling of the cytoskeleton dynamics (Fig. 3G and Movies S1-S5). Lamellipodia are involved in the migration and fusion of myoblasts (24), and are also essential for EMT and mesenchymal cell motility (25). In spite of our efforts, we did not succeed in eliciting the formation of lamellipodia by manipulating single splicing events. Rather, our data suggest that DDX5/DDX17 downregulation contributes to lamellipodia formation owing in part to the concerted regulation of a network of alternative exons (fig. S8), although it is likely that transcription- and miRNA-mediated effects are also involved.

Altogether, our results unravel a dynamic orchestration of different gene expression layers by the RNA helicases DDX5 and DDX17 during cell differentiation. The DDX5/DDX17-dependent genetic circuitries that we characterized in two different biological processes and in 2 different species are remarkably similar (Fig. 4) and we propose to define such factors as master orchestrators of differentiation. Other RNA helicases such as DDX3X, DDX4/VASA and DHX9/RHA that are also involved at multiple levels of gene expression and contribute to a variety of biological processes (3, 26, 27), may also have a broad function in coordinating the genetic programs that unfold during biological transitions or cell differentiation processes.

Figure captions

Fig. 1. Coregulation of transcription programs by DDX5 and DDX17 during differentiation.

(A) Expression of *SNAI1* and *SNAI2* mRNAs in human MCF10a cells after silencing of *SMAD2* and *SMAD3* (si*SMAD2/3*) or *DDX5* and *DDX17* (si*DDX5/17*), followed or not by a 24 h

treatment with TGFb. “si ctrl”: control siRNA. **(B)** Number of genes regulated during TGFb-induced EMT at the global expression level. **(C)** Validation of microarray data. **(D)** Immunolabelling of MCF10a cell junctions with an anti-E-cadherin antibody. Scale bar : 20 μ m. **(E)** Expression of *Myog* and *Mef2c* mRNAs in C2C12 mouse myoblast cells after silencing of *Myod* (si*Myod*) or *Ddx5* and *Ddx17* (si*Ddx5/17*), followed by incubation in growth (- Diff) or differentiation (Diff) medium. “si ctrl”: control siRNA. **(F)** Number of genes regulated during myoblast differentiation at the global expression level. **(G)** Validation of microarray data. **(H)** Immunolabelling of C2C12 cells with an anti-myosin heavy chain (MHC) antibody. Scale bar : 20 μ m. Histograms in **A**, **C**, **E** and **G** represent mean values of at least three independent experiments ($n \geq 3$) normalized to the control sample \pm SD (paired Student’s *t*-test : * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

Fig.2. A negative feedback loop involving miRNAs regulates DDX5/DDX17 expression during differentiation.

(A) Expression of DDX5 and DDX17 during a differentiation time-course of C2C12 cells (left panel) and TGFb-induced EMT of MCF10a cells (right panel). Actin: loading control. **(B)** Left panel: expression of *Ddx5* and *Ddx17* in C2C12 cells overexpressing pre-miR-1, pre-miR-206 or a control pre-miR. Right panel: luciferase assays measuring the effect of miR-1 and miR-206 on wild-type and mutated mouse *Ddx5* 3’ UTR. Histograms represent a mean of at least 3 independent experiments \pm SD (unpaired Student’s *t*-test : * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). **(C)** Expression of miR-1 and miR-206 in C2C12 cells. Mature miRNA (yellow) or pre-miRNA (orange) were quantified 24 h after differentiation of cells pre-treated with control or *Ddx5/17* siRNA. Values were normalized to undifferentiated cells. $N=3 \pm$ SD ; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (paired *t*-test). **(D)** Left panel: expression of DDX5 and DDX17 in TGFb-treated MCF10a

cells overexpressing pre-miR-181b or a control pre-miRNA. Right panel: luciferase assays measuring the effect of miR-181b on wild-type and mutated human *DDX5* 3' UTR in TGFb-treated HMEC cells. Details are as in B. **(E)** Expression of mature miR-181b (light blue) and pri-microR-181b (dark blue) in MCF10a cells treated or not with TGFb for 24 h. Details are as in C. **(F)** Chromatin immunoprecipitation experiment showing SMAD4 and DDX5 binding to the miR-181b promoter. The tested region encompasses a predicted SMAD binding site within the miR-181b1-encoding gene promoter (left diagram). Results are expressed as the mean percentage of input DNA ($n=3 \pm SD$) normalized to the control sample.

Fig. 3. DDX5/DDX17 control differentiation-specific splicing programs.

(A) Venn diagram showing the number of alternative exons regulated by DDX5 and DDX17 in C2C12 cells (yellow and red) and/or in MCF10a cells (light and dark blue). Full lists of exons are given in Tables S3 and S4. **(B)** Validation of microarray data. Only exons regulated in the same manner in both cell lines are shown. For each event, the exon number is shown in red for the mouse gene (left) and in blue for the human gene (right). **(C)** Splicing rescue experiments. Stable MCF7 cells were transfected with si*DDX5/DDX17* (3' UTR) and treated with doxycyclin to induce the expression of wild-type or RNA helicase mutant DDX5-HA (lanes 1-6) or HA-DDX17 (lanes 7-12). Only one representative experiment is shown ($n=3$). Quantification is shown as a percentage of alternative sequence inclusion (psi). **(D)** RNA immunoprecipitation experiment showing the relative binding of HA-DDX5 to various exons in stable MCF7 cells. -DOX : uninduced ; +DOX : doxycyclin-treated. The region analyzed overlaps the splicing donor site of each tested exon. Blue exons correspond to DDX5/DDX17-regulated exons, while black exons are unregulated exons from the same gene. The results (technical replicates, $n=3 \pm SD$) are expressed as a percentage of RNA input. **(E)** Alternative

splicing of exons upon Ddx5/Ddx17 downregulation during differentiation of C2C12 cells. Left: cells induced to differentiate or treated with si*DDX5/17*. Right: cells ectopically expressing miR-1 or miR-206 as described in Figure 2B. Quantification is shown as the fold change of psi relative to the control sample. **(F)** Alternative splicing of exons upon *DDX5/DDX17* downregulation during EMT of MCF10a cells. Left: cells treated with TGFb or with si*DDX5/17*. Right: cells ectopically expressing miR-181b as described in Figure 2D. Details are as in E. **(G)** Formation of lamellipodia in *DDX5/DDX17*-depleted cells. Top: Phase-contrast images of MCF10a cells transfected with control or *DDX5/17* siRNA and treated or not with TGFb. Bottom: C2C12 cells transfected with control or *DDX5/17* siRNA. Scale bar : 50 μ m. Inset: magnified view of lamellipodia (white arrows) in TGFb-treated MCF10a cells and in both *DDX5/DDX17*-depleted cell lines (scale bar : 25 μ m).

Fig. 4. Orchestrated regulation of gene expression by *DDX5* and *DDX17* during cell differentiation.

The top (red) and bottom (blue) schemes represent the differentiation of mouse myoblasts (C2C12) into myotubes and the TGFb-induced EMT of MCF10a cells, respectively. Upon induction of differentiation, *DDX5* and *DDX17* coregulate MYOD- or SMAD-dependent transcriptional programs controlling key effectors of differentiation (examples are in italics). Specific upregulated miRNAs directly repress the expression of *DDX5* and *DDX17*, which contributes to the establishment of a cell-specific alternative splicing program in both cell types (examples are in italics). One shared characteristic of both *DDX5/DDX17*-depleted cell lines is the formation of lamellipodia, which could result from the combined regulation of several splicing events in genes involved in cytoskeleton dynamics.

References and Notes:

1. M. S. Ebert, P. A. Sharp. *Cell* **149**, 515-524 (2012).
2. A. Kalsotra, T. A. Cooper. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 715-729 (2011).
3. P. Linder, E. Jankowsky. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **12**, 505-516 (2011).
4. R. Janknecht. *Am. J. Transl. Res.* **2**, 223-234 (2010).
5. F. V. Fuller-Pace, H. C. Moore. *Future Oncol.* **7**, 239-251 (2011).
6. G. Caretti *et al.* *Dev. Cell* **11**, 547-560 (2006).
7. D. R. Warner *et al.* *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**, 70-76 (2004).
8. J. P. Thiery, H. Acloque, R. Y. Huang, M. A. Nieto. *Cell* **139**, 871-890 (2009).
9. C. Lin, L. Yang, J. J. Yang, Y. Huang, Z. R. Liu. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 7484-7493 (2005).
10. E. Dardenne *et al.* *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 1139-1146 (2012).
11. S. Germann *et al.* *Oncogene* **31**, 4536-4549 (2012).
12. T. Fukuda *et al.* *Nat. Cell Biol.* **9**, 604-611 (2007).
13. B. N. Davis, A. C. Hilyard, G. Lagna, A. Hata. *Nature* **454**, 56-61 (2008).
14. A. Cano *et al.* *Nat. Cell Biol.* **2**, 76-83 (2000).
15. T. Braun, M. Gautel. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **12**, 349-361 (2011).
16. A. H. Williams, N. Liu, E. van Rooij, E. N. Olson. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 461-469 (2009).
17. N. S. Sokol. *Curr. Top. Dev. Biol.* **99**, 59-78 (2012).

18. B. Wang *et al.* *Oncogene* **29**, 1787-1797 (2010).
19. K. Goljanek-Whysall *et al.* *J. Cell Sci.* **125**, 3590-3600 (2012).
20. E. Zonta *et al.* *Nucleic Acids Res.* **41**, 554-564 (2013).
21. C. S. Bland *et al.* *Nucleic Acids Res.* **38**, 7651-7664 (2010).
22. C. C. Warzecha *et al.* *EMBO J.* **29**, 3286-3300 (2010).
23. I. M. Shapiro *et al.* *PLoS Genet.* **7**, e1002218 (2011).
24. K. Rochlin, S. Yu, S. Roy, M. K. Baylies. *Dev. Biol.* **341**, 66-83 (2010).
25. M. Yilmaz, G. Christofori. *Cancer Metastasis Rev.* **28**, 15-33 (2009).
26. M. Abdelhaleem. *Clin. Biochem.* **38**, 499-503 (2005).
27. P. Lasko. *Biochim. Biophys. Acta* **1829**, 810-816 (2013).
28. L. Fattet *et al.* *J. Cell Sci.* **126**, 3713-3723 (2013).

Acknowledgments

We are grateful to D. Furling and J. Marie for their comments on the manuscript, and to all our colleagues for inspiring discussions. We thank C. Vanbelle and C. Bouchardon (CeCILE - SFR Santé Lyon-Est) and Dr Joël Lachuer (ProfileXpert-LCMT facility, Lyon, France) for their assistance with imaging and microarray analyses, respectively. The data reported in this article are tabulated in the main paper and in the Supplementary online Materials. This work was supported by grants from Inserm, INCa, ANR, and FRM and LNCC, from doctoral fellowships from LNCC (E.D. and S.S.), AFM (M.P.E.), the french Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (L.F.) and FRM (E.Z.), and from post-doctoral fellowships from the Centre Léon Bérard (H.N.B.) and Fondation ARC (S.G. and F.Z.C.).

Supplementary Materials

Materials and Methods

Cell culture

C2C12 cells (ATCC) were cultured in either growth medium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% antibiotics) or differentiation medium (DMEM supplemented with 2% horse serum, 1% antibiotics). The MCF10a mammary epithelial cell line was obtained from the American Type Culture Collection. MCF10a cells were cultured in 1:1 (DMEM)/HAM-F12 medium (Life Technologies) supplemented with 5% horse serum (Cambrex), 10 ng/ml human epidermal growth factor (PromoCell), 0.5 µg/ml hydrocortisone (Sigma), 10 µg/ml insulin (Sigma) and 100 ng/ml cholera toxin (Sigma). HMEC cells were cultured in 1:1 DMEM/HAM-F12 medium (Life Technologies) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), 10 ng/ml human epidermal growth factor (PromoCell), 0.5 µg/ml hydrocortisone (Sigma) and 10 µg/ml insulin (Sigma). Recombinant TGFb-1 (Peprotech) was used at 2,5 ng/ml. To block any signaling arising from autocrine production of TGFβ, experiments without TGFb-1 were performed in the presence of 10 µM TβRI kinase inhibitor SB-431542 (Sigma) for the indicated times. HeLa and MCF7 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS at 37 °C. DDX5-HA, DDX5K144A-HA, HA-DDX17 and HA-DDX17K142R were cloned into the pTRE2hyg vector (Clontech) to generate inducible MCF-7/Tet-On stable cell lines (Clontech). Resistant clones were selected with hygromycin (300 µg/ml, Clontech) and protein expression was checked after doxycycline (DOX) treatment (1 µg/ml) for 48 h.

Transfection and rescue experiment

Transient transfection of siRNAs or pre-miRNAs (Pre-miR miRNA Precursors, reference #AM17100 or Pre-miR negative control #1, Reference #AM17110, Life Technologies) was performed at a final concentration of 10 nM using lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) as described previously(11, 20). Sequences of siRNA sequences are provided in Supplementary Table 5). The *DDX5/17* siRNA targets a sequence conserved in the 2 genes *DDX5* and *DDX17*.

For rescue experiments, MCF-7/Tet-On MCF7 cells were transfected for 24 h with 10 nM siRNA targeting *DDX5* or *DDX17* 5' or 3' UTR (Supplementary Table 5) using Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies). The next day, cells were treated with doxycyclin for 48 h in order to induce the expression of epitope-tagged *DDX5* and *DDX17*.

Immunofluorescence

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min. After 3 washes in 1x PBS, cells were permeabilized in 0.2% Triton X-100 for 30 min and left for 1 h in blocking solution (1x PBS, 15% serum, 0.1% Triton X-100). Primary antibodies : MHC (MY-32, Sigma), OCLN (71-1500, Life Technologies), E-cadherin (610181, BD) and b-catenin (Santa cruz). Proteins were revealed using a FITC-conjugated anti-mouse IgG (Sigma).

Image acquisition was performed using a Zeiss LSM780 or a Leica SP5 confocal microscope (63x objective) and images were processed with the ImageJ program.

***In situ* proximity ligation assay**

C2C12 cells were transfected for 48 h with either control or *DDX5/17* siRNA. After transfection, growth medium was replaced by differentiation medium for 24 h. The *in situ*

proximity ligation assay (PLA) was conducted using the Duolink II Kit (Olink Bioscience) as described previously(20).

Videomicroscopy

MCF10a or C2C12 cells were transfected with control or *DDX5/17* siRNA (for 15 and 24 h, respectively). When indicated, MCF10a were also treated for 33 h with TGFb. Culture plates were then placed in the incubation chamber (37°C and 5% CO₂) of an AXIOVERT 200M microscope. Pictures were taken every 5 min for 24 h (MCF10a) or 9 h (C2C12) for each field and final stacked pictures were processed using ImageJ.

Protein and RNA Analysis

Protocols for protein extraction, RNA extraction, RT-PCR and quantitative RT-PCR were described previously (11, 20). Primer sequences for PCR and qPCR are provided in Supplementary Table S5. Primary antibodies used for western-blotting: DDX5 (ab10261, Abcam), DDX17 (ab24601, Abcam), SMAD3 (sc-9513, Santa Cruz), SMAD2 (sc-3122, Santa Cruz), SNAIL1 (sc-28199, Santa Cruz), SNAIL2/SLUG (sc-9585, Santa Cruz), E-cadherin (610181, BD), OCLN (71-1500, Life Technologies), MYOD (M3512, Dako), MYOG (M3559, Dako), GAPDH (50150, Covalab) or actin (I-19 sc1616, Santa Cruz).

For analyzing mature miRNAs, 20 ng of total RNA was reverse-transcribed and quantified using the miRCURY LNATM Universal cDNA synthesis and SYBR[®] Green PCR kit (Exiqon), using the specific LNATM primers sets for hsa-miR-1, hsa-miR-206 and hsa-miR-181b-5p, following manufacturer's instructions. RT-qPCR values were normalized relative to U6 snRNA (also measured using LNATM primers set, Exiqon).

Chromatin and RNA Immunoprecipitation

Chromatin and RNA chromatin immunoprecipitation (ChIP and RIP) were performed essentially as previously described (20, 28) using antibodies against DDX5 (4 µg, A300-523A, Bethyl), SMAD4 (sc-7154, Santa Cruz) or control IgG (Santa Cruz). Primers used for DNA and RNA immunoprecipitation are described in Supplementary Table 5.

Co-immunoprecipitation

HMEC cells were transfected with expression vectors encoding Flag-SMAD3 and Flag-SMAD4 (a kind gift of P. Ten Dijke, Leiden, Netherlands) for 48 h. Cells were treated with TGFb-1 or not (SB-431542 treatment) for 2 h before lysis in a buffer containing 50 mM Tris–HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1 mM PMSF, protease and phosphatase inhibitors (Sigma). Cleared cell extracts were incubated overnight with 4 µg of antibodies bound to protein G magnetic beads (Life Technologies). The protein-bound magnetic beads were washed three times with 1x PBS, resuspended in SDS loading buffer for western-blotting. Input corresponds to 5% of the volume of cleared cell lysates.

Luciferase assays

The following 3' UTR fragments were PCR-amplified from cDNA or genomic DNA and cloned in the psiCHECK-2 plasmid (Promega) downstream of the renilla luciferase gene : *mDdx5* UTR (Fig. 2b), fragment 9-311 (NM_007840) ; *mDdx17* UTR (Fig. 2b) : fragment 1327-2222 (NM_152806) ; *hDDX5* UTR (Fig. 2d) : fragment 852-1667 plus 37 additional nucleotides downstream of the end of 3' UTR (NM_004396) ; *hDDX17* UTR (Fig. 2d) 1492-2436 (NM_1098504). Mutant derivatives were obtained by deletion of 4 nucleotides within miR-1/206 and miR-181b binding sites as indicated in Supplementary Figs S4a and S4b by

directed mutagenesis. The same plasmid also contains the firefly luciferase gene used for internal normalization of the data.

For the analysis of miR-1/206 effect, HeLa cells were seeded in 24-well plates and transfected for 24 h with 50 ng of luciferase reporter along with 10 nM pre-miR precursor (control or pre-miR-1 or pre-miR-206, Life Technologies), using Lipofectamine 2000 (Life Technologies) following manufacturer's instructions. For miR-181b, the protocol was the same except that HMEC cells were used and pre-treated for 24 h with TGFb prior to transfection. 24 h after transfection, cells were lysed and luciferase assays were carried out using the Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega), as recommended by the manufacturer. Data were expressed as the ratio of renilla (test) to firefly (internal control) luminescence, and normalized to the ratio obtained with the control pre-miR (arbitrarily adjusted to 1).

Microarray analysis

Samples used for microarray analyses were collected after 57 h of TGFb or SB-431542 treatment (for MCF10a cells), or after 72 h in growth or differentiation medium (for C2C12 cells). One µg of total RNA purified with TRIzol were labeled with Ambion reagents and hybridized to Affymetrix GeneChip Mouse (for C2C12 cells) or Human (MCF10a cells) Exon 1.0 ST arrays. Affymetrix exon array data were normalized using quantile normalization. The background correction was performed using antigenomic probes. Only probes targeting exons annotated from full-length cDNA sequences were used for analysis. Among these preselected probes, poor quality probes (e.g., probes labeled as "cross-hybridizing" probes by Affymetrix), and probes with intensity signals that were too low when compared to antigenomic background probes with the same GC content, were removed from the analysis.

Only probes with a DABG p -value ≤ 0.05 in at least half of the chips were considered for further statistical analysis. Paired statistical analyses were performed using the Student's paired t -test on the splicing index to analyze the exon array data. The splicing index (SI) corresponds to a comparison of gene-normalized exon intensity values between the two analyzed experimental conditions.

Bioinformatics and statistical analyses

Exon-intron structures of mouse and human genes were obtained using the FasterDB server (<http://fasterdb.lyon.unicancer.fr/index.php>). To identify DDX5/DDX17-dependent-genes shown in Figure 1, the differentiation vs undifferentiated fold change (FC) was computed either in the presence or in absence of DDX5/DDX17. Differentiation-regulated genes were considered as dependent on DDX5/DDX17 when the FC was significantly reduced, with a threshold ≥ 1.3 and with a p -value ≤ 0.05 .

To identify DDX5/DDX17-dependent-exons shown in Figure 3, the SI (Splicing Index) of each exon was computed in absence of differentiation. A SI ≥ 1.5 with a p -value ≤ 0.05 was considered as significant. To identify common human and mouse DDX5/DDX17-dependent-exons, orthologs of exons significantly regulated in one cell line were first identified in the organism corresponding to the other cell line using the LiftOver tool (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgLiftOver>), and *vice versa*. The variation of inclusion/exclusion of those exons was then computed in the second cellular model as the % difference of gene-normalized exon intensity in the two conditions. A variation of inclusion/exclusion $\geq 10\%$ with a p -value ≤ 0.05 was considered as significant.

The Targetscan software (<http://www.targetscan.org/>) was used to identify predicted miR-1/206 targets in mouse 3' UTRs. The number of predicted sites within DDX5/DDX17-

dependent genes (up- or downregulated during differentiation of C2C12 cells) was compared to the number of predicted sites in all UTRs available in the Targetscan database. Predicted sites were counted as 1 single site when their number was ≥ 1 within the same transcript. Enrichment analyses were performed with R software (<http://cran.r-project.org/>) using a binomial test.

Supplementary figures

Fig. S1. DDX5/DDX17 are SMAD3 co-regulators and regulate the expression of SNAIL1/2. **(A)** Validation by western-blotting of the effect of siRNAs against *DDX5/17* (one single siRNA targeting a conserved region between the 2 genes). and *SMAD2/3* (a mixture of 2 siRNAs, see Methods for the sequence of siRNAs). The expression of *SMAD2/3/4* proteins was not affected by the *siDDX5/17* treatment. GAPDH and vinculin were used as loading controls. **(B)** Western-blot analysis of SNAIL1 and SNAIL2 (SLUG) expression after 48 h of DDX5/DDX17 depletion and 33 h of TGFb treatment. **(C)** Coimmunoprecipitation assays. HMEC cells were transfected with Flag-SMAD3 or Flag-SMAD4 plasmids and treated or not for 2 h with TGFb. 10% of input were used as control and 100% of immunoprecipitation was loaded. Both DDX5 and DDX17 proteins were detected after Flag (SMAD3 or SMAD4) immunoprecipitation. **(D)** Chromatin immunoprecipitation showing the binding of DDX5 and SMAD4 to *SNAI1* and *SNAI2* promoter regions. Immunoprecipitation of DDX5 or SMAD4 proteins was performed after 2 h of TGFb treatment. The amplicons analyzed by RT-qPCR correspond to a region of *SNAI1* and *SNAI2* promoters containing a SMAD binding element. Results correspond to a mean of 3 independent experiments and represent the percentage of recovered DNA after IP relative to input chromatin ($n=3 \pm SD$).

Fig. S2. Regulation of epithelial junctions by DDX5/DDX17. **(A)** Western blot analysis of E-Cadherin and Occludin expression. As expected TGF β treatment induced a dramatic decrease of the expression of both proteins, but pre-treatment with *DDX5/17* siRNA compromised this decrease. **(B)** MCF10a immunostaining of epithelial junctions using Occludin and β -catenin antibodies following DDX5/DDX17 depletion and TGF β treatment. Nuclei were stained with Hoescht.

Fig. S3. Ddx5/Ddx17 function as Myod transcriptional coregulators. **(A)** Detection of endogenous Ddx5-Myod complexes by in situ Proximity Ligation Assays (PLA). Fixed C2C12 cells were incubated with antibodies against Ddx5 and Myod. Interactions were revealed using secondary antibodies coupled to specific PLA DNA probes that hybridized and were enzymatically joined when located in close proximity. After rolling circle amplification, each interaction generated a fluorescent spot that was analyzed by confocal microscopy. As negative controls, PLA experiments were performed in C2C12 cells transfected with *Ddx5/17* or *Myod* siRNAs. **(B)** Western blot analysis showing the expression of Ddx5, Ddx17 and Myod from C2C12 cells transfected with control *Ddx5/17* or *Myod* siRNAs. Actin was used as a loading control. **(C)** Western blot analysis of Myog and Actin C2C12 cells after transfection with control *Ddx5/17* or *Myod* siRNA followed or not by the induction of differentiation for 48 h.

Fig. S4. Regulation of DDX5 and DDX17 expression by miRNAs. **(A)** Predicted miRNA binding sites in the *DDX5* 3' UTR. Top panel : screen capture from the TargetScan website showing the predicted sites for miR-1, miR-206 and miR-181b in the *DDX5* 3' UTR. Note that these

sites were predicted by other freely accessible softwares such as miRanda or PicTar (data not shown). Below are shown details about the predicted base-pairing between the different miRNAs and their respective target sites. As the effects of miR-1/206 and miR-181b were studied respectively in mouse C2C12 cells and human MCF10a cells, their base-pairing with the *DDX5* 3' UTR was shown within their respective species context. The identical nucleotides between highly related miR-1 and miR-206 are boxed in blue, indicating the perfect conservation at the level of the 5' end-located seed region, which is critical for the base-pairing with its mRNA target (boxed in green). Two binding sites for miR-181b were predicted within the 3' UTR of human *DDX5* transcripts, but the second site is less evolutionarily conserved and was not tested in our experiments. The 4-nucleotide deletions that were made within the *DDX5* UTR luciferase constructs to destroy the predicted miR-1/206 and miR-181b target sites in luciferase assays are shown at the bottom of each box.

(B) Predicted miRNA binding sites in the *DDX17* 3' UTR. Details are as in a. Note that there may be a second uncharacterized miR-1/206 binding site in the *DDX17* UTR, as miR-1 and miR-206 slightly decreased the luciferase activity from the mutant *DDX17* reporter (Fig. 2B, right panel). No binding site was predicted for the miR-181 family. **(C)** Luciferase assay measuring the effect of miR-1 and miR-206 on wild-type and mutated mouse *Ddx17* 3' UTR. As in Figure 2B. **(D)** Expression of mature miR-181b was measured 24 h after the induction by TGFb in MCF10a cells pre-treated with control or *SMAD2/3* siRNA. **(E)** Quantification of pri-miR-181b-2, the precursor expressed from the second miR-181b-coding gene, 24 h after the induction by TGFb in MCF10a cells pre-treated with control or *DDX5/DDX17* siRNA. **(F)** Enrichment of miR-1/206 binding sites in genes downregulated in a *DDX5/DDX17*-dependent manner during differentiation of C2C12 cells. The control includes all the 3' UTRs available from the Targetscan website. The genes upregulated in a *DDX5/DDX17*-dependent manner

during differentiation contain less predicted miR-1/206 binding sites but the result was not statistically significant.

Fig. S5. Splicing regulation by DDX5/DDX17. **(A)** RT-PCR analysis of alternative exons (in red) after *Ddx5/17* silencing in C2C12 cells. For each event, the gene is shown on the left. **(B)** RT-PCR analysis of alternative exons (in blue) after *DDX5/17* silencing in MCF10a cells. For each event, the gene is shown on the left.

Fig. S6. Direct regulation of splicing by DDX5/DDX17. **(A)** Rescue experiments of DDX5/DDX17-dependent splicing events. As in Figure 3C. **(B)** Conservation of splicing regulation in various cellular contexts. Upper panel : schematic representation of the minigenes used to study the splicing of DDX5/DDX17-dependent exons. The *REPS1* exon 10 and *CHTF8* exon 4 were inserted along with about 200 bp of their respective surrounding intronic sequences in an intron from the fibronectin gene. Primers used for the minigene assay were indicated by arrows (sequences are given in Table S5). Lower panel: endogenous splicing regulation of these two exons was tested by RT-PCR in C2C12, MCF10a, MCF7 and HeLa cells 48 h after depletion of DDX5/DDX17. The right PCR panel shows that after transfection of *REPS1* and *CHTF8* minigenes in HeLa cells, their respective exons were regulated as the corresponding endogenous exons by DDX5/DDX17. **(C)** RNA immunoprecipitation experiment showing the relative binding of endogenous DDX5 to DDX5/DDX17-regulated exons in MCF7 cells. Immunoprecipitation was carried out after cell cross-link using an anti-DDX5 antibody or with control IgG and was quantified by RT-qPCR using primers that amplified a region overlapping the splicing donor site of the corresponding exon. Exons indicated in blue correspond to DDX5/DDX17-regulated exons,

while exons in black correspond to unregulated exons from the same gene. The results ($n=3 \pm \text{SD}$) are expressed as a percentage of RNA input. *P*-values were calculated between the DDX5 IP and the IgG IP (paired *t*-test : * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; NS : non specific, value as indicated).

Fig. S7. Alternative splicing regulation by DDX5/DDX17 during differentiation. **(A)** Splicing of exons regulated in the same manner during differentiation of C2C12 cells and upon *Ddx5/17* silencing. **(B)** Splicing of exons regulated in the same manner during TGFb-induced EMT of MCF10a cells and upon *DDX5/17* silencing. **(C)** Splicing of exons regulated during C2C12 cell differentiation but not upon *Ddx5/17* silencing. **(D)** Splicing of exons regulated in TGFb-treated cells but not upon *DDX5/17* silencing. **(E)** Splicing of exons regulated in the same manner during C2C12 cell differentiation, upon *Ddx5/17* silencing and upon ectopic overexpression of miR-1 or miR-206. **(F)** Splicing of exons regulated in the same manner during TGFb-induced EMT of MCF10a cells, upon *DDX5/17* silencing and upon ectopic overexpression of miR-181b. Details are as in Figures 3e-3f.

Fig. S8. Scheme of regulation of cytoskeleton organization by DDX5 and DDX17. The scheme represents the KEGG pathway map entitled “Regulation of actin cytoskeleton”, downloaded from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes website (<http://www.genome.jp/kegg/>). Genes that were regulated at the splicing level by DDX5/DDX17 during differentiation of C2C12 cells (red boxes), during TGFb-induced EMT of MCF10a cells (blue boxes) or in both processes (green boxes) were added to the scheme. Arrows indicate direct interactions or functional links between DDX5/DDX17-regulated

genes and elements of the pathway. Details about the functional links between the genes and cytoskeleton remodelling and/or lamellipodia formation are given in the table below.

Table S1. Genes affected at the global level by DDX5 and DDX17 depletion in MCF10a cells treated or not with TGFb.

Table S2. Genes affected at the global level by Ddx5 and Ddx17 depletion in C2C12 cells treated or not with differentiation medium.

Table S3. Cassette exons affected by Ddx5 and Ddx17 depletion in C2C12 cells.

Table S4. Cassette exons affected by DDX5 and DDX17 depletion in MCF10a cells.

Table S5. List of siRNAs and PCR primers used in this study.

Movie S1. Time-lapse videomicroscopy of MCF10a cells treated with control siRNA in the absence of TGFb.

Movie S2 : Time-lapse videomicroscopy of MCF10a cells treated with control siRNA and with TGFb.

Movie S3 : Time-lapse videomicroscopy of MCF10a cells treated with *DDX5/17* siRNA in the absence of TGFb.

Movie S4 : Time-lapse videomicroscopy of C2C12 cells treated with control siRNA.

Movie S5 : Time-lapse videomicroscopy of MCF10a cells treated with *Ddx5/17* siRNA.

Additional author notes

Author contribution

E.D. and L.F. performed experiments in MCF10a cells with input from M.D. M.P.E. performed all bioinformatic analyses and some experiments in C2C12 cells. E.D. and M.P.E. performed some of RT-PCR and RT-qPCR analyses in other cell lines. L.G. generated the microarray data and performed some of C2C12 experiments. E.Z. performed the RNA immunoprecipitation experiments of Fig. 3d and cloned the minigenes of Supplementary Fig. S6b. H.N.B. performed the RNA immunoprecipitation and RT-qPCR of Supplementary Fig. S6c. S.G. and

S.S. made the inducible cell lines and performed splicing rescue experiments. F.Z.C. performed the PLA assay. C.F.B performed luciferase assays, miRNA quantification and some RT-PCR analyses, with input from E.D. and M.P.E. R.R., C.F.B. and D.A. designed the study and interpreted the results with input from all the authors. C.F.B. and D.A. wrote the manuscript, with input from all the authors.

Data will be deposited in the Gene Expression Omnibus upon acceptance of the manuscript, but are available on request.

The authors declare no competing financial interests.

Figure 1

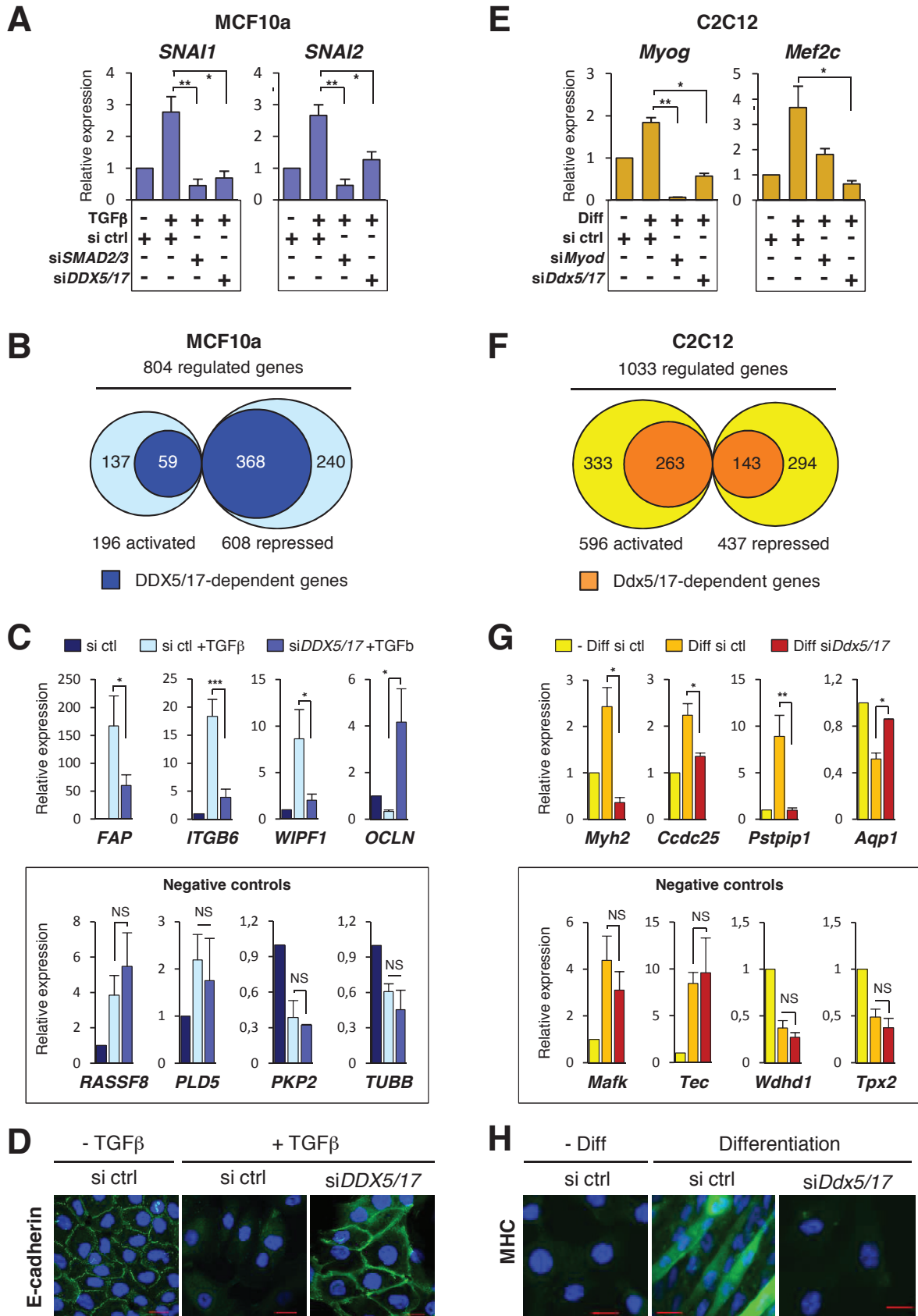


Figure 2

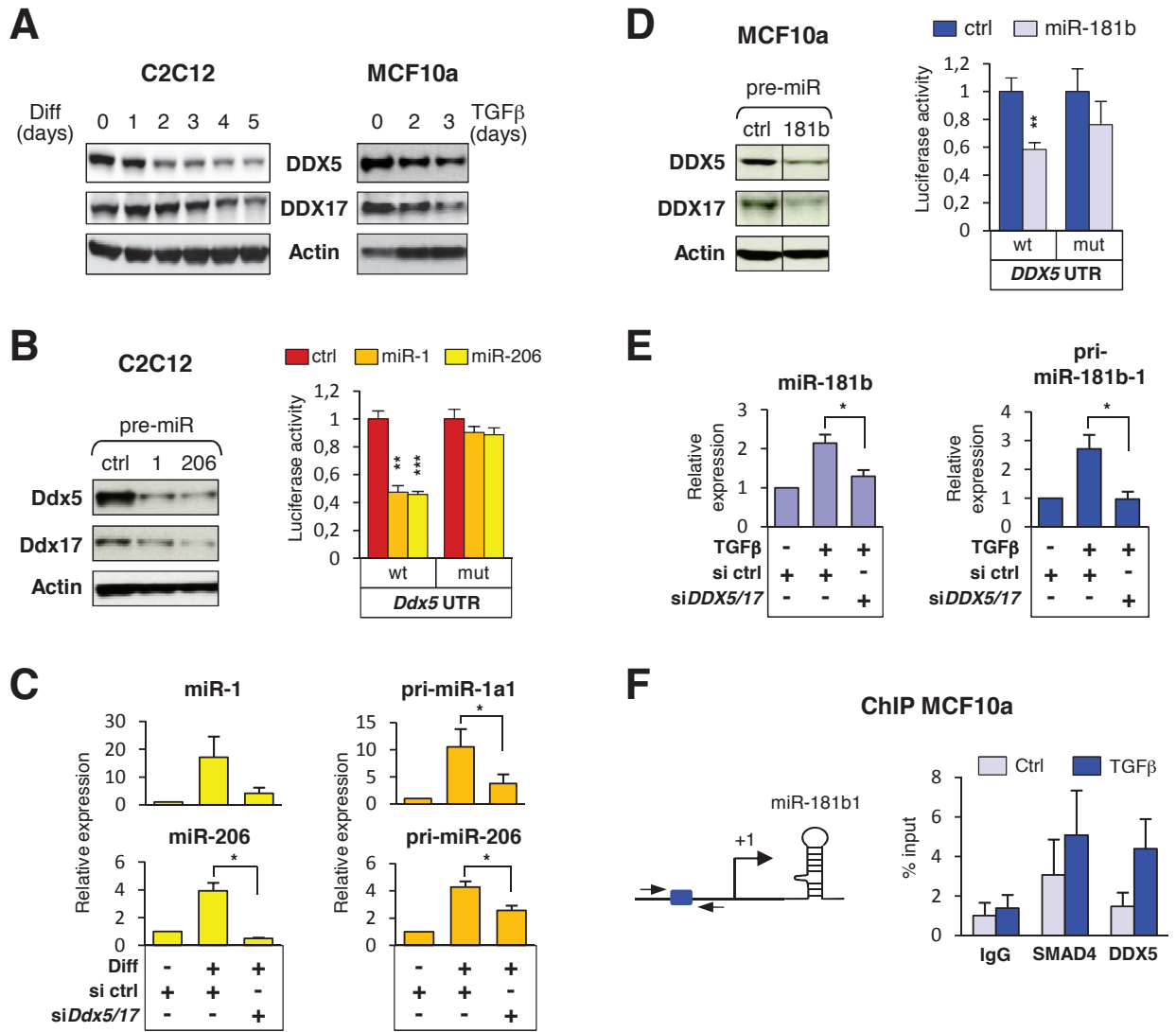


Figure 3

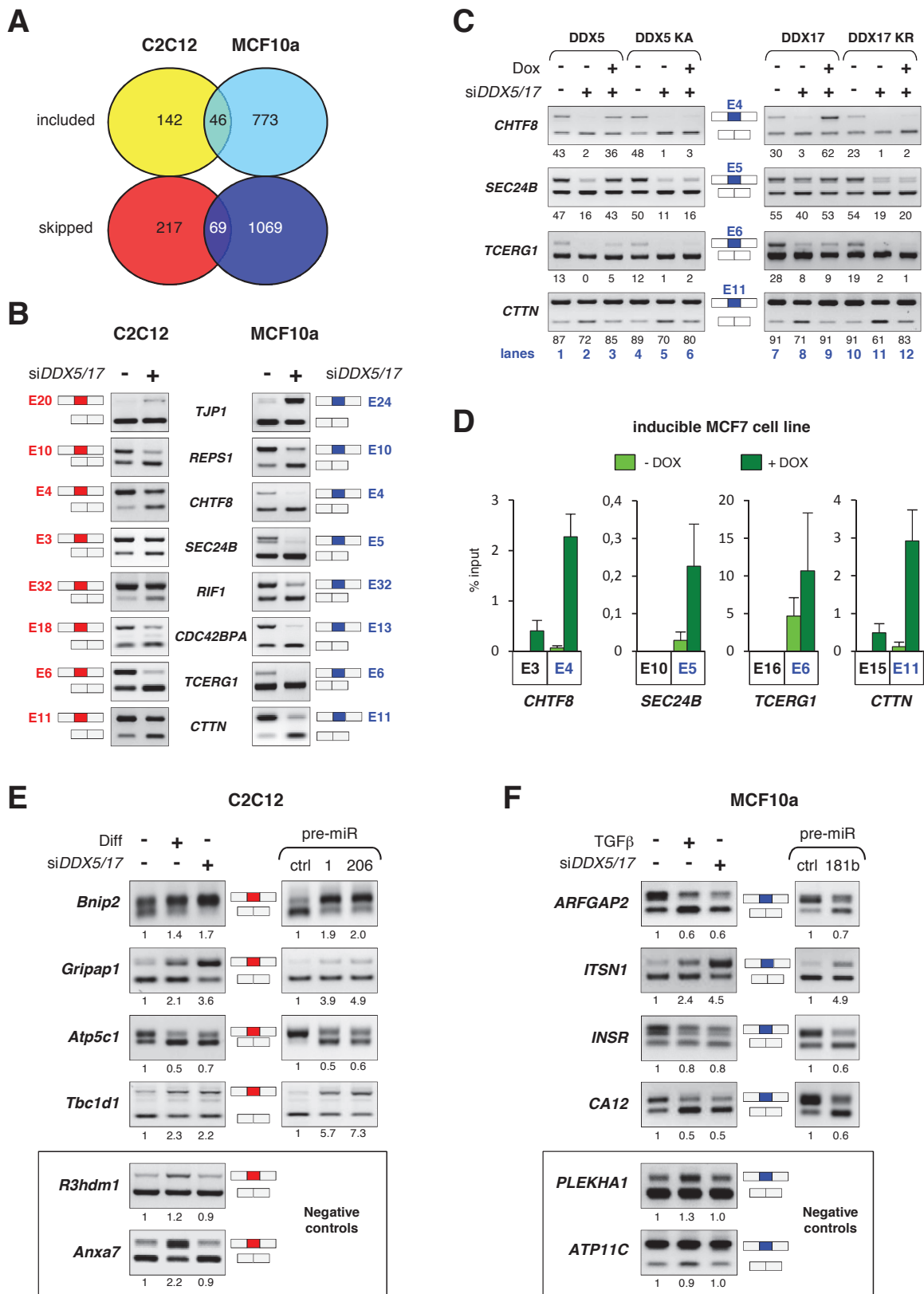
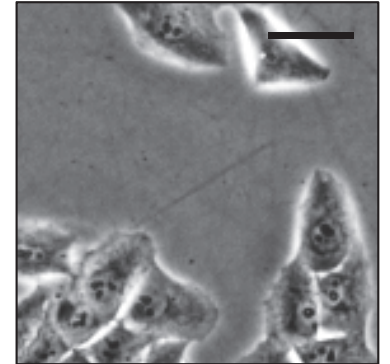
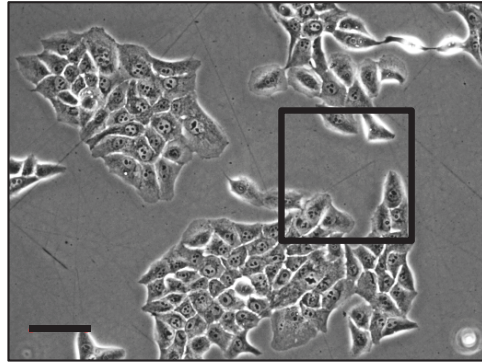


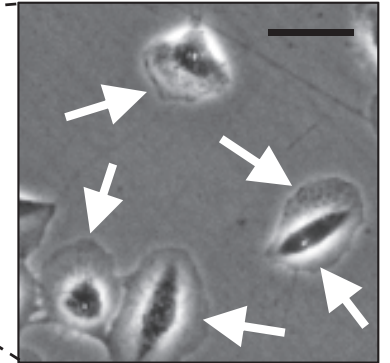
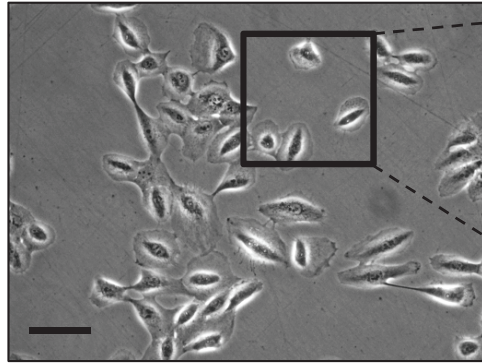
Figure 3G

MCF10a

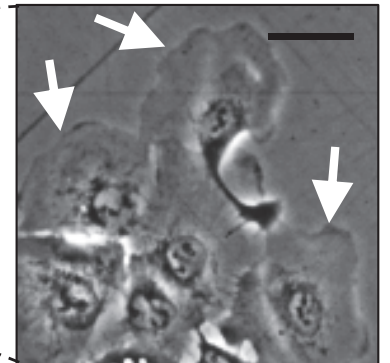
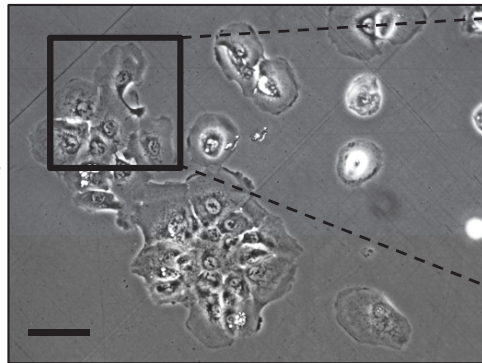
si ctrl



**si ctrl
+ TGFβ**

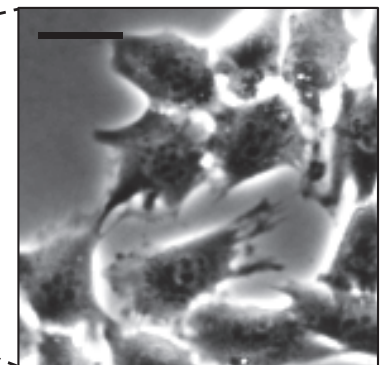
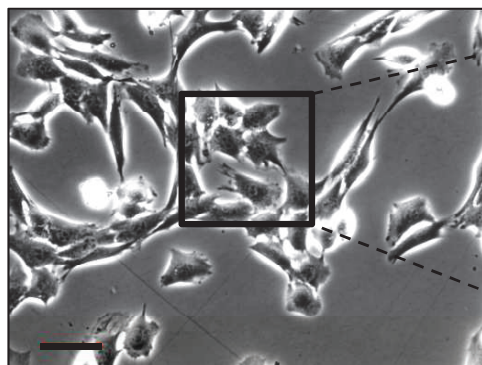


siDDX5/17



C2C12

si ctrl



siDDX5/17

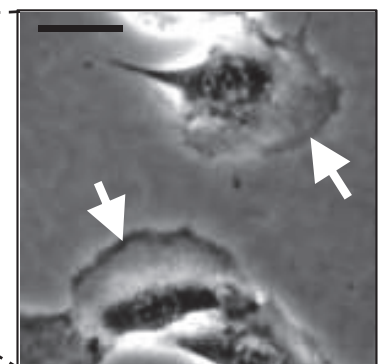
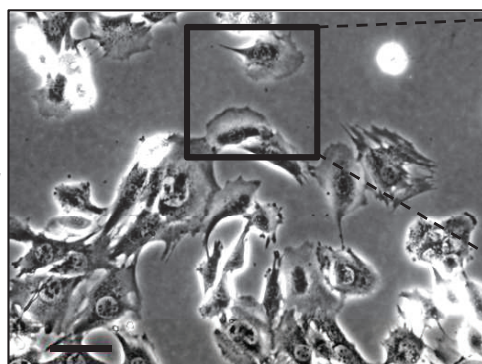


Figure 4

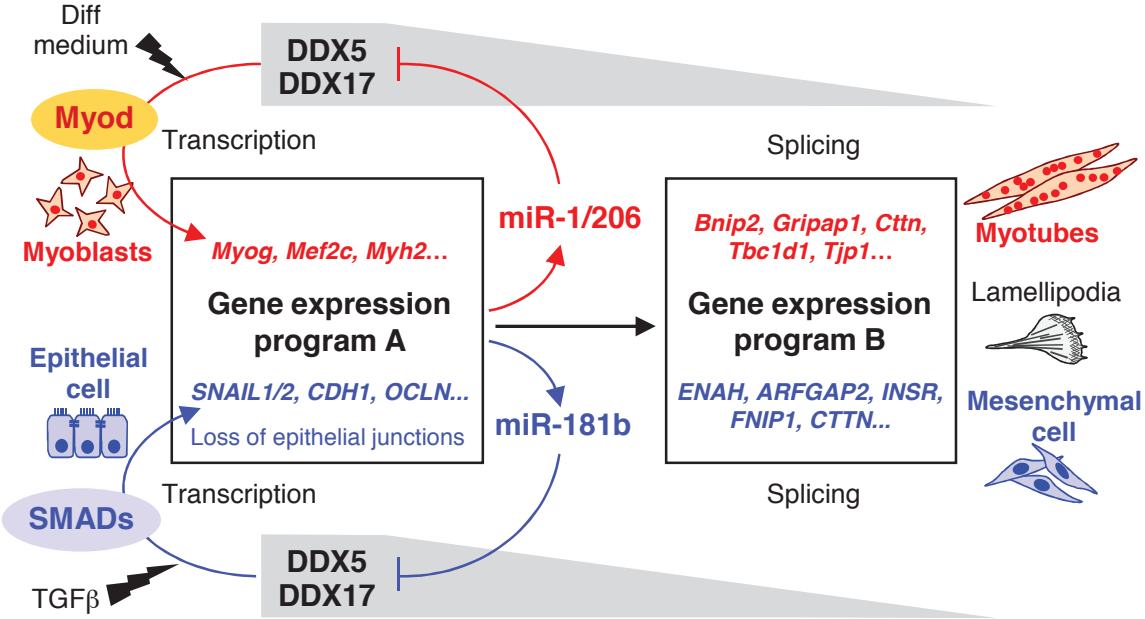


Figure S1

MCF10a cells

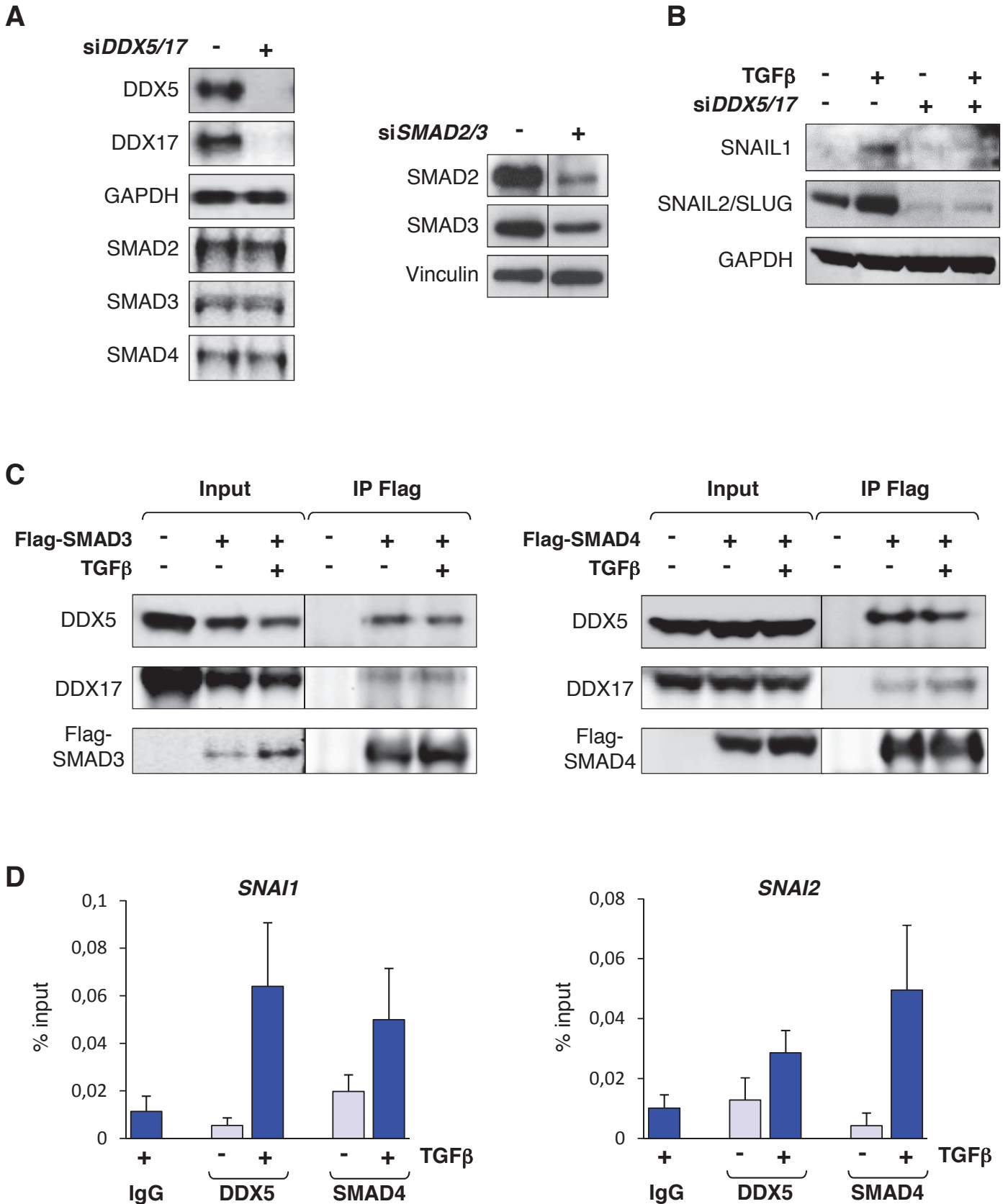
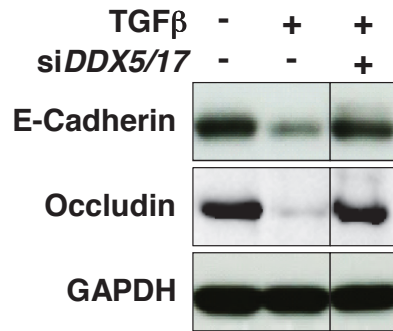


Figure S2

MCF10a cells

A



B

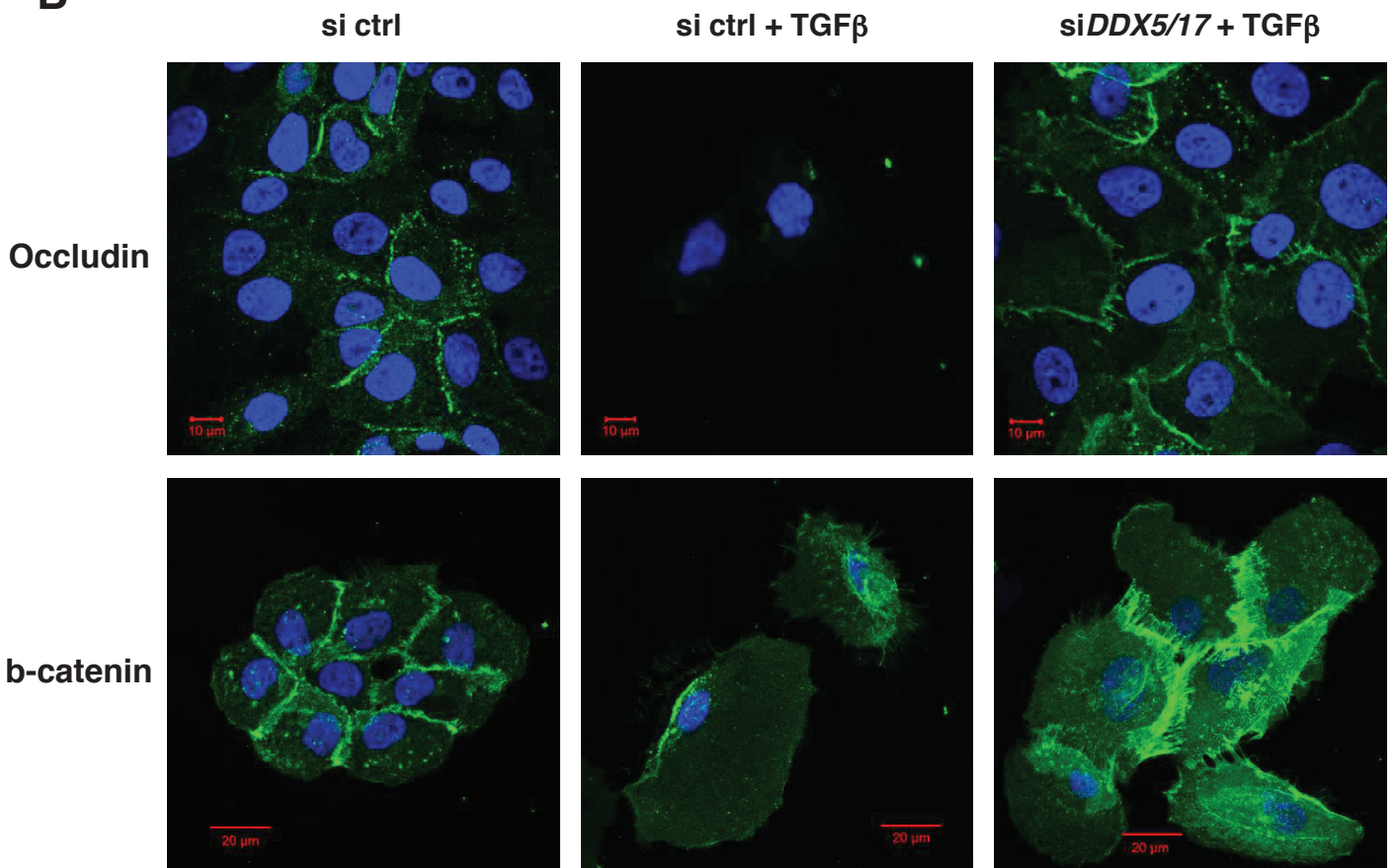


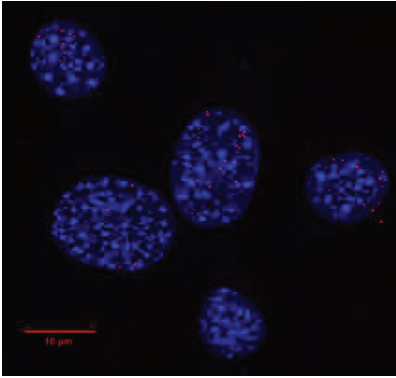
Figure S3

C2C12
cells

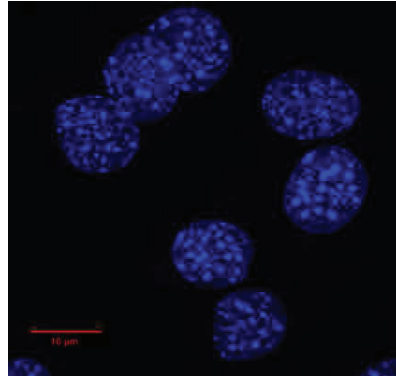
A

Proximity Ligation Assay Ddx5-Myod

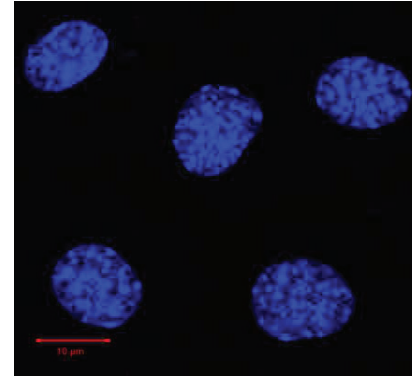
si ctrl



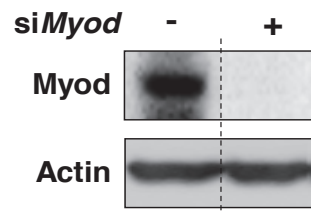
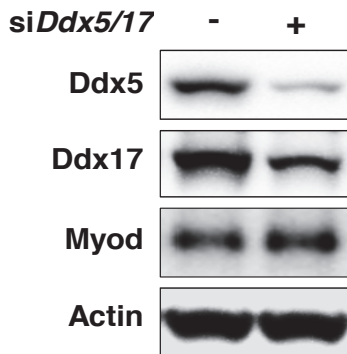
siMyod



siDdx5/17



B



C

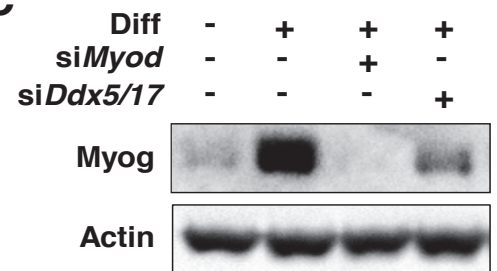


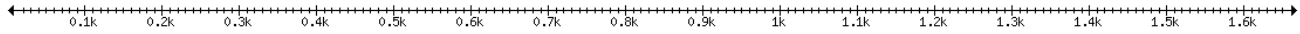
Figure S4

A

TargetScan

<http://www.targetscan.org>

Predictions of miRNA binding in the *DDX5* 3' UTR



Gene
Human DDX5 NM_004396 3' UTR length:1667

Conserved sites for miRNA families broadly conserved among vertebrates

	predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	seed match	site.type contribution	3' pairing contribution	local AU contribution	position contribution	TA contribution	SPS contribution	context+ score	context+ score percentile	conserved branch length	P _{cr}
Position 163-169 of DDX5 3' UTR	5' ...GUUGGAUUAUUUCUCUACAUCCUGAA 3'	7mer-m8	-0.120	-0.016	-0.076	-0.039	0.005	0.014	-0.23	91	4.045	0.83
hsa-miR-1	3' UAUGUAUGAAGAAAUGUAAGGU 5'											
Position 163-169 of DDX5 3' UTR	5' ...GUUGGAUUAUUUCUCUACAUCCUGAA 3'	7mer-m8	-0.120	-0.007	-0.076	-0.039	0.005	0.014	-0.22	90	4.045	0.83
hsa-miR-206	3' GGUGUGUGAAGGAAUGUAAGGU 5'											
Position 924-930 of DDX5 3' UTR	5' ...UCACACUGGGAGUCAUGAAUGUC 3'	7mer-m8	-0.120	0.003	-0.020	0.043	0.020	0.049	-0.03	41	1.457	0.42
hsa-miR-181b	3' UGGGUGGCUGUCGUUACUUACAA 5'											
Position 1187-1193 of DDX5 3' UTR	5' ...ASCUGAAGUGGGUCUGAAUGUUU 3'	7mer-m8	-0.120	0.003	0.003	0.005	0.020	0.049	-0.04	47	1.118	0.129
hsa-miR-181b	3' UGGGUGGCUGUCGUUACUUACAA 5'											

seed

mmu-miR-206 3' GGUGUGUGAAGGAAUGUAAGGU 5'

mmu-miR-1 3' UAUGUAUGAAGAAAUGUAAGGU 5'

Human 5' AAGUUGGAUUAUUUCUCUACAUCCUGAA 3'

Rhesus 5' AAGUUGGAUUAUUUCUCUACAUCCUGAA 3'

Mouse 5' AAGUUGGAUUAUUUCUCUACAUCCUGAA 3'

Chicken 5' AAGUUGaUAUUUCUCUACAUCCUGAA 3'

Xenopus 5' AAGUUGacUgU--aUCUACAUCCUGAg 3'

Zebrafish 5' cAccUuuuUgUUUaguUguAUUuuUuuA 3'

miR-1/206 site

mmu-miR-1 3' UAUGUAUGAAGAAAUGUAAGGU 5'

mutant UTR 5' AAGUUGGAUUAUUUCUCUAC----CUGAA 3'

seed

hsa-miR-181b 3' UGGGUGGCUGUCGUUACUUACAA 5'

Human 5' GUCACA-CUGGGAGUCAUGAAUGUCUU 3'

Rhesus 5' GUCACA-CUGGGAGUCAUGAAUGUCUU 3'

Mouse 5' GcCACAcCUGGaAGUCAUGAAUGUCUU 3'

miR-181b site 1

hsa-miR-181b 3' UGGGUGGCUGUCGUUACUUACAA 5'

mutant UTR 5' GUCACA-CUGGGAGUCAUG----UCUU 3'

seed

hsa-miR-181b 3' UGGGUGGCUGUCGUUACUUACAA 5'

Human 5' UAGCUAGAAGUGGGUCUGAAUGUUUU 3'

Rhesus 5' UAGCUAGAAGUGGGUCUGAAUGUUUU 3'

Mouse 5' UgGCUAuAAGUaGGUCUaAAUGUcUU 3'

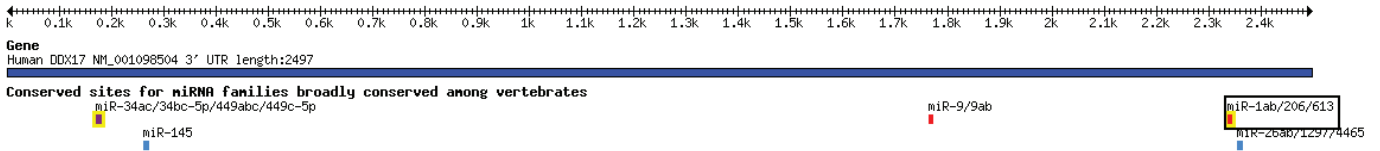
miR-181b site 2

Figure S4

B

TargetScan
http://www.targetscan.org

Predictions of miRNA binding in the *DDX17* 3' UTR



	predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	seed match	site-type contribution	3' pairing contribution	local AU contribution	position contribution	TA contribution	SPS contribution	context+ score	context+ score percentile	conserved branch length	P _{CT}
Position 2337-2343 of DDX17 3' UTR	5' ...UGCUGGUCUCCAGACACAUUCCU... 3' GGUGUGUGAAGGAAUGUAAGGU	7mer-m8	-0.120	0.003	0.014	-0.040	0.005	0.014	-0.12	73	2.477	0.80
hsa-miR-206												
Position 2337-2343 of DDX17 3' UTR	5' ...UGCUGGUCUCCAGACACAUUCCU... 3' UAUGUAUGAAGGAAUGUAAGGU	7mer-m8	-0.120	0.003	0.014	-0.040	0.005	0.014	-0.12	73	2.477	0.80
hsa-miR-1												

seed

mmu-miR-206 3' GGUGUGUGAAGGAAUGUAAGGU 5'

mmu-miR-1 3' UAUGUAUGAAGAAAUGUAAGGU 5'

| | | | | | |

Human 5' CUUGCUGGUCUCCAGACACAUUCCUGUU 3'

Rhesus 5' CUUGCUGGUCUCCAaACA--UCCUGUU 3'

Mouse 5' CUUGCUGGUCUCuccACACAUUCCUGUc 3'

Chicken 5' uUUGCUGGUCUCugaACACAUUCCUGUU 3'

| | | | |

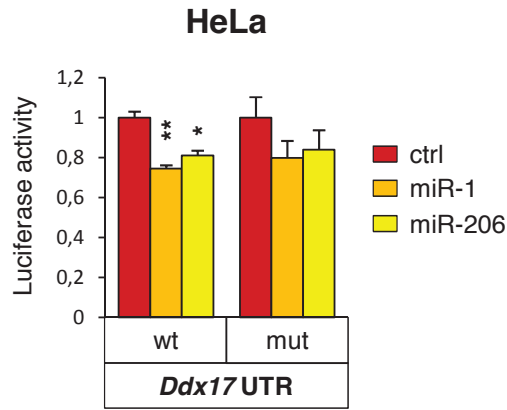
mmu-miR-1 3' UAUGUAUGAAGAAAUGUAAGGU 5'

mutant UTR 5' CUUGCUGGUCUCCAGACAC----CUGUU 3'

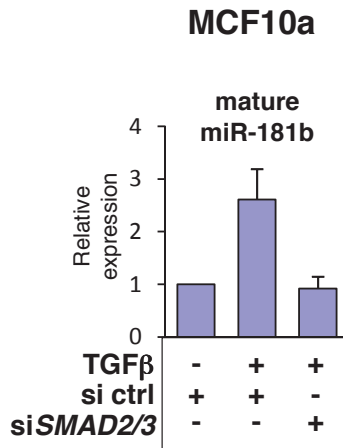
miR-1/206 site

Figure S4

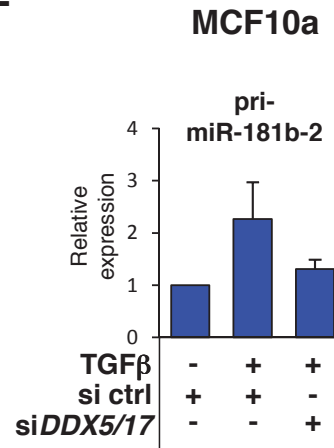
C



D



E



F

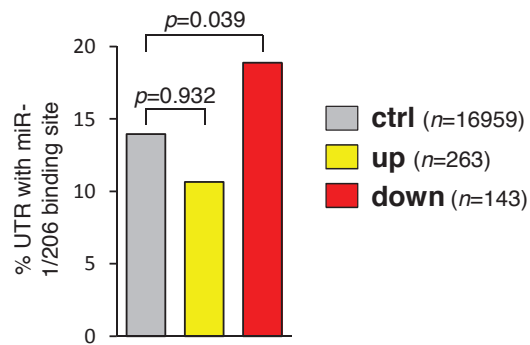
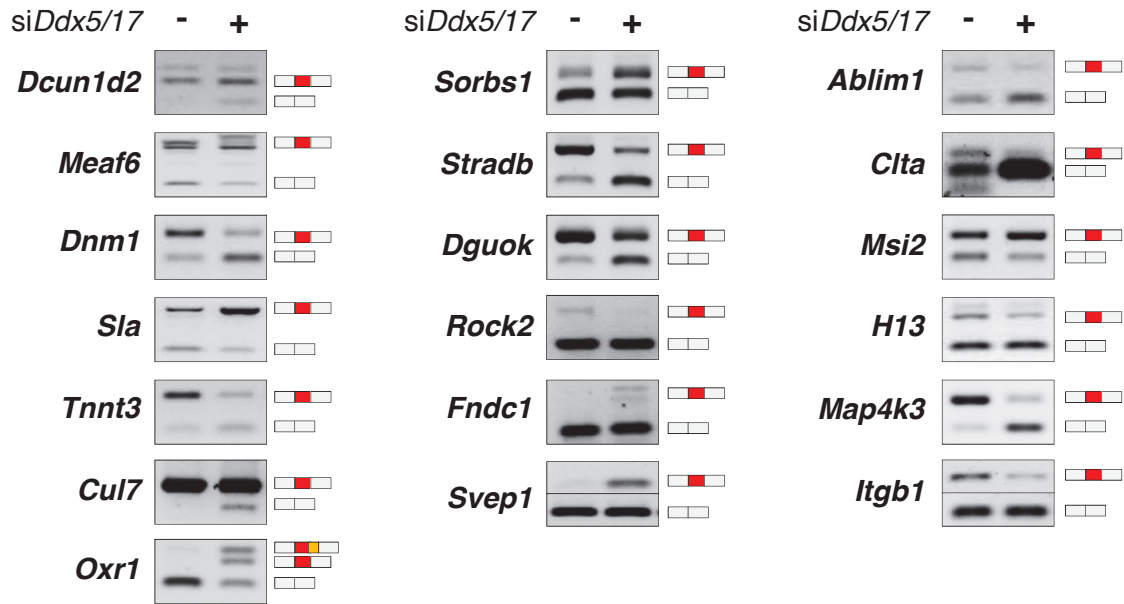


Figure S5

A

C2C12



B

MCF10a

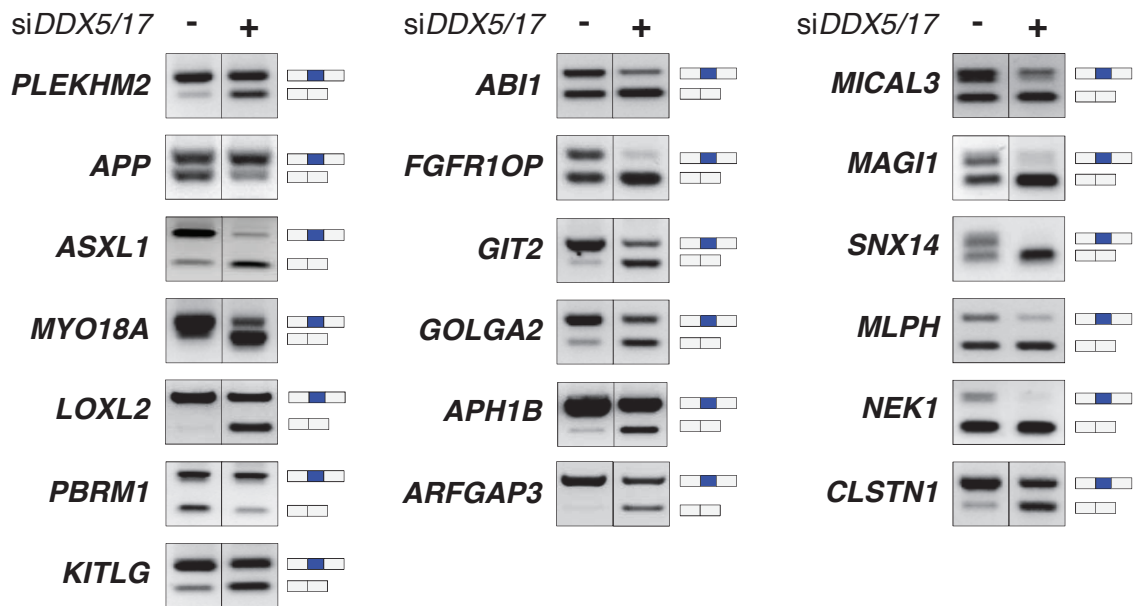
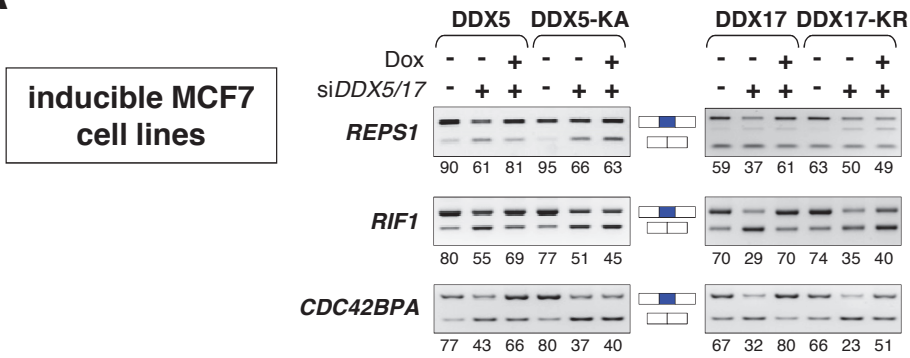


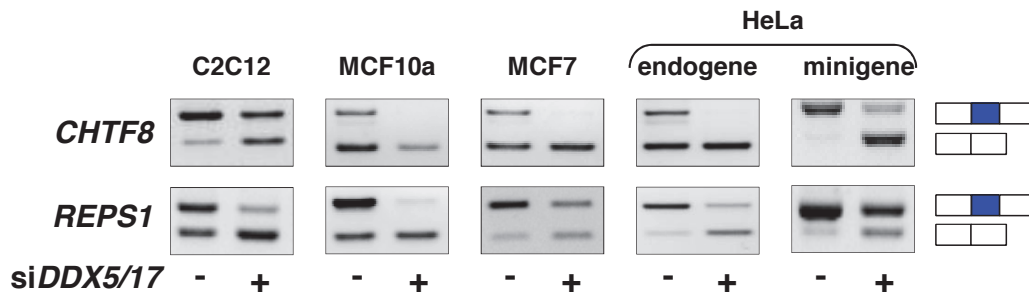
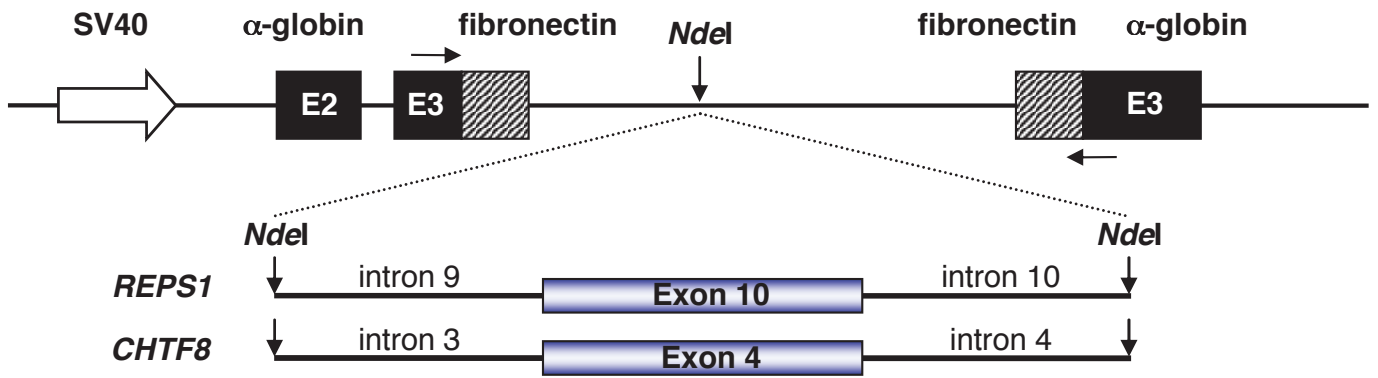
Figure S6

A



B

pTB plasmid (6003 bp)



C

RNA-IP MCF7
endogenous DDX5

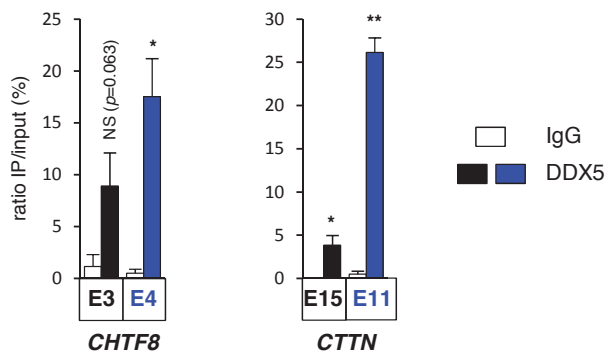
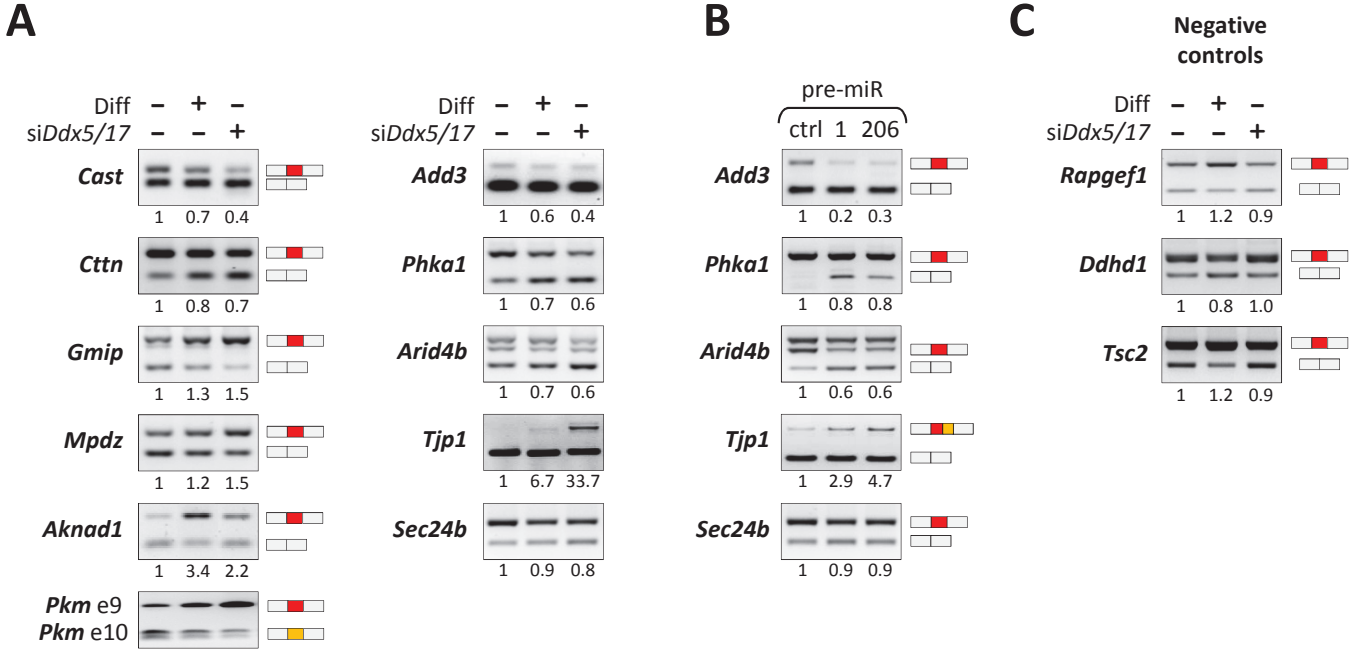


Figure S7

C2C12



MCF10a

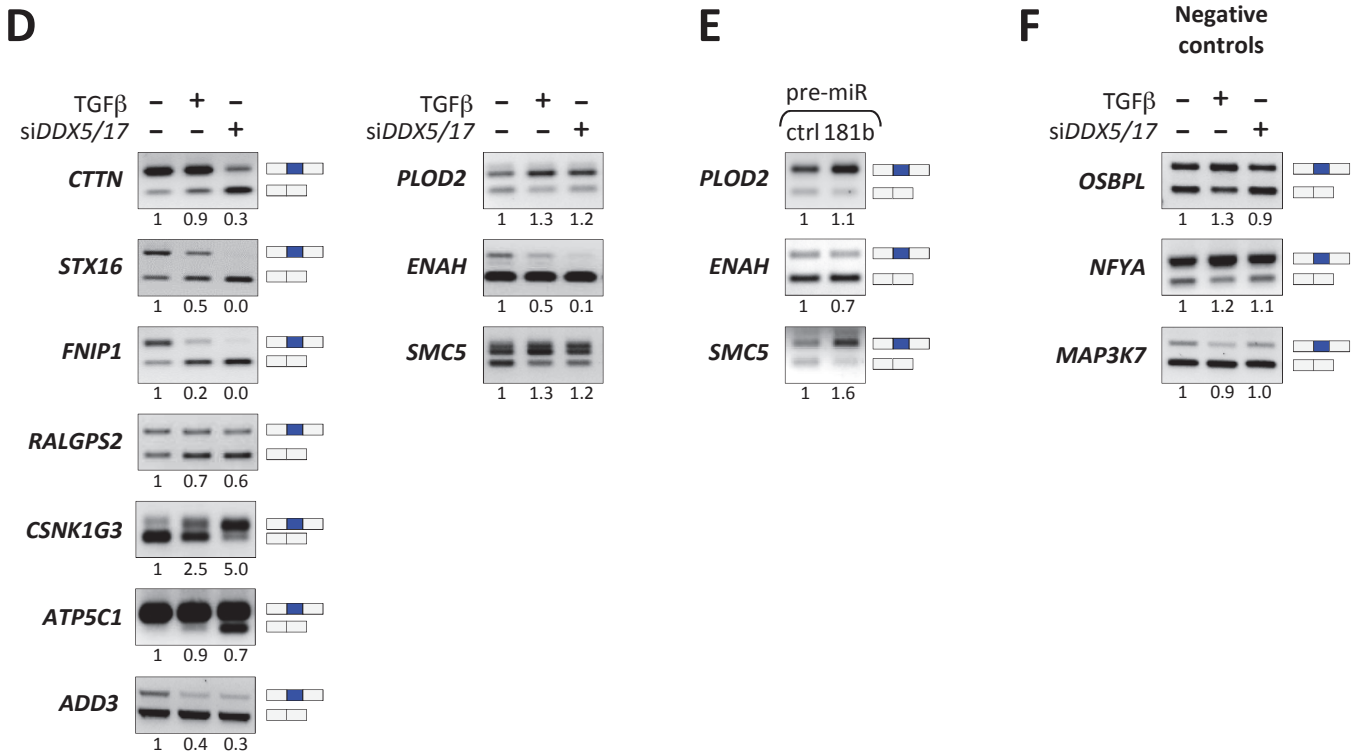
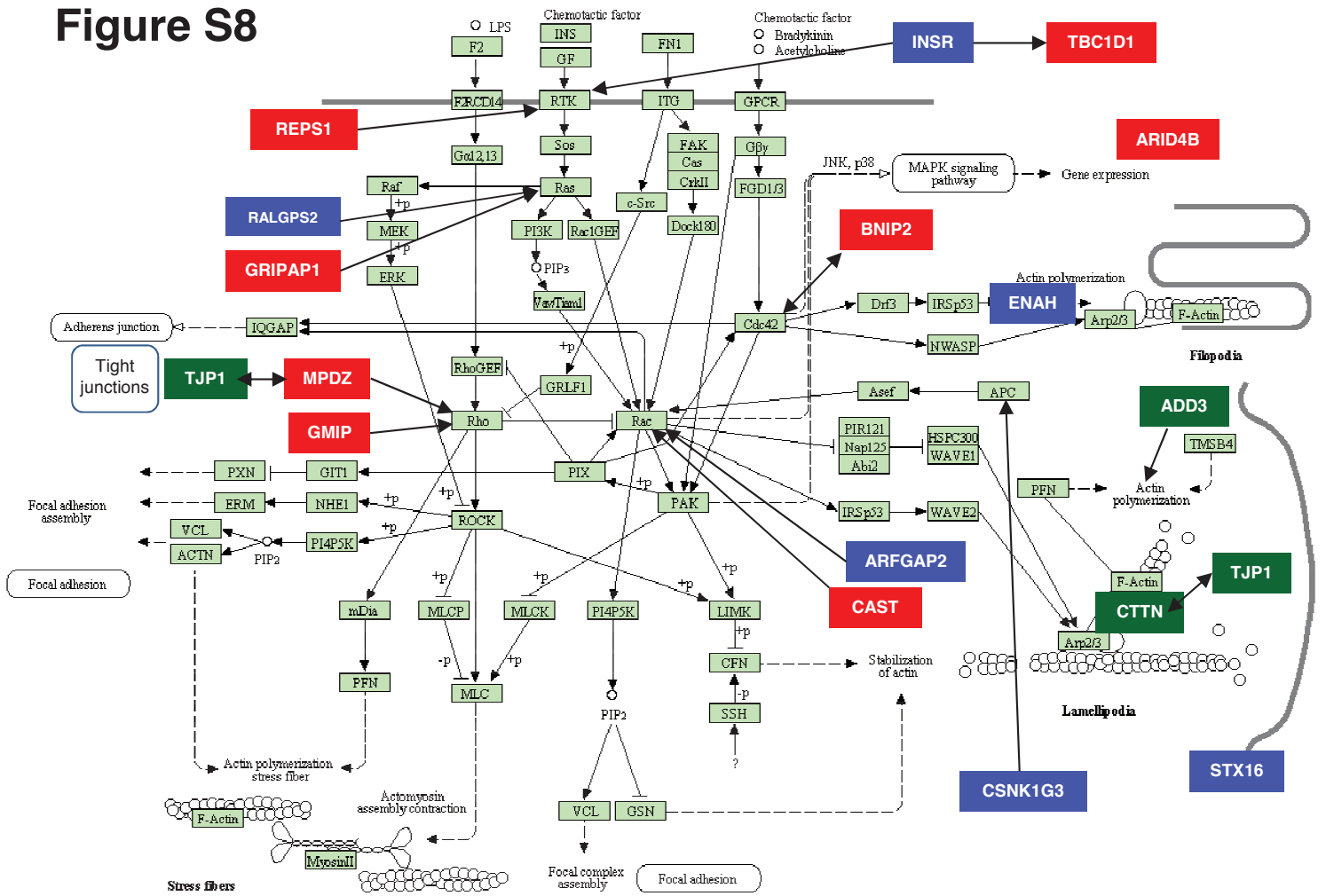


Figure S8



Protein	Description	Functions
ADD3	Adducin 3	Membrane-cytoskeleton-associated protein involved in the assembly of the spectrin-actin network ; crucial role in cell motility
ARFGAP2	GTPase activating protein for ARF1	ARF1 controls Rac1 signaling to regulate cell migration
ARID4B	Subunit of the Sin3A transcriptional corepressor	Sin3a has a causative role in metastatic progression of breast cancer, it interacts with Snail2 to prevent EMT
BNIP2	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 2	Involved in cell elongation ; interacts with CDC42, GEFs and GAPs
CAST	Calpastatin, calpain inhibitor	Role in myoblast fusion ; calpains are involved in cell spreading, lamellipodia formatio (Rac1 signaling)
CSNK1G3	Casein kinase 1, gamma 3	Casein Kinase 1 proteins phosphorylate APC and β -catenin
CTTN	Cortactin	Contributes to the organization of the actin cytoskeleton and cell structure ; plays a role in the regulation of cell migration and in the invasiveness of cancer cells
ENAH	Enabled Homolog (Drosophila)	Actin-associated protein involved in several processes dependent on cytoskeleton remodeling and cell polarity such as lamellipodial and filopodial dynamics in migrating cells
GMIP	GEM-interacting protein	RhoA-GTPase activating Gem-interacting protein
GRIPAP1	Ras-GTPase guanine exchange factor (RasGEF)	Modulates Ras-GTPase activity
INSR	Insulin receptor	Receptor tyrosine kinase that activates several signaling pathways
MPDZ	Multiple PDZ domain protein	Localized in tight junctions ; interacts with RhoA-GEF
RALGPS2	Ral GEF with PH domain and SH3 binding motif 2	Modulates Ral GTPase function. RalA is an effector of Ras signaling and a mediator or membrane trafficking
REPS1	RalBP1-associated Eps domain-containing 1	May coordinate the actions of activated EGF receptors and Ral-GTPases
STX16	Syntaxin 16	Membrane trafficking
TBC1D1	Rab GTPase-activating protein (Rab-GAP)	Involved in the trafficking and translocation of GLUT4-containing vesicles and insulin-stimulated glucose uptake
TJP1	Tight Junction Protein 1 (ZO-1)	Regulation of cell migration by targeting CDC42BPB to the leading edge of migrating cells ; localized in lamellipodia in a corneal fibroblast wound model

Discussion

Rôle des ARN hélicases DDX5 et DDX17 dans la progression tumorale.

Les ARN hélicases DDX5 et DDX17 sont des protéines multifonctionnelles qui, comme d'autres ARN hélicases, sont impliquées dans de nombreuses étapes de la maturation des ARNs. Ces deux ARN hélicases sont sur-exprimées dans différents cancers notamment le cancer du sein et du colon (Fuller-Pace & Ali, 2008; Janknecht, 2010; Shin et al., 2007). Dans le cancer du colon, l'expression de DDX5 et DDX17 augmente fortement au cours de la progression tumorale du stade de polype au stade d'adénome et d'adénocarcinome (Shin et al., 2007). De plus, dans un modèle murin du cancer du sein, j'ai décrit la sur-expression de DDX17 dans les cellules 4T1, des cellules métastatiques du cancer du sein, par rapport aux cellules 67NR, une lignée syngénique non métastatique. La fonction de ces deux ARN hélicases en tant que co-régulateurs transcriptionnels a été bien décrite, notamment pour le récepteur aux oestrogènes dans le cancer du sein (Watanabe et al., 2001) et de la β -caténine dans le cancer du colon (Shin et al., 2007). Dans le cancer du sein, nous avons aussi montré que DDX5 et DDX17 sont des co-régulateurs transcriptionnels du facteur pro-migratoire NFAT5 (Germann et al., 2012) (voir annexe).

Dans ce contexte, DDX5 et DDX17 co-activent les gènes cibles de NFAT5 impliqués dans la migration et l'invasion comme S100A4 ou LCN2 (Germann et al., 2012). Au cours de ma thèse, il a également été publié que DDX5 régule l'expression de microARNs (miR-21 et miR-182) qui contrôlent à leur tour l'expression de gènes impliqués dans le remodelage du cytosquelette d'actine, comme la cofiline et la profiline, ce qui pourrait avoir un impact sur le phénotype migratoire et invasif des cellules du cancer du sein (D. Wang et al., 2012). Les ARNs hélicases DDX5 et DDX17 ont été rapportées comme contrôlant l'épissage alternatif de quelques gènes comme Tau, CD44 ou H-ras (Guil et al., 2003; Honing et al., 2002; Kar et al., 2011) mais avant ma thèse, l'impact, à large échelle, de DDX5 et DDX17 sur l'épissage alternatif n'avait pas été étudié. De plus, le rôle fonctionnel des variants d'épissage contrôlés

par DDX5 et DDX17 n'était pas connu. L'étude menée dans le modèle 4T1 montre que ces ARNs hélicases contrôlent un jeu défini d'exons alternatifs. Parmi les exons régulés par Ddx5 et Ddx17, on trouve les exons mutuellement exclusifs 6 et 7 de l'histone macroH2A1 qui codent respectivement pour la forme macroH2A1.2 et macroH2A1.1. Ces deux isoformes ont des effets opposés sur le phénotype migratoire et invasif des cellules 4T1. J'ai démontré que ces variants ont un rôle opposé et contrôlent positivement ou négativement des gènes comme SOD3, qui sont impliqués dans la migration et l'invasion via le contrôle des espèces réactives de l'oxygène.

Ce travail montre que la régulation de l'épissage alternatif par DDX5 et DDX17 contribue à la progression tumorale. Ce mécanisme moléculaire s'ajoute à la régulation transcriptionnelle et à la maturation de microARNs comme étant contrôlé par DDX5 et DDX17 et jouant un rôle au cours de la progression tumorale. Cela renforce également le rôle majeur de ces ARNs hélicases dans la progression tumorale car elle affecte des phénotypes cellulaires de la transformation, comme la prolifération (notamment via leur fonction de co-activateurs de récepteurs nucléaires) ou la migration (notamment via leur contrôle de l'épissage de macroH2A1 ou de co-activateur de NFAT5). Il est intéressant de noter que DDX5 et DDX17 régulent l'expression des gènes en fonction du contexte cellulaire. En effet, les gènes dépendants de ces ARNs hélicases dans le contexte de la régulation oestrogénique ne sont pas similaires aux gènes qui dépendent de DDX5 et DDX17 dans le contexte de co-régulation par NFAT5 ou à ceux régulés par les variants de l'histone macroH2A1. Cette observation s'explique en partie par le fait que les protéines co-régulées par DDX5 et DDX17 sont exprimées en fonction du contexte cellulaire.

Ces différentes données démontrent que ces deux hélicases d'ARN régulent l'expression génique à différents niveaux ; grâce à leurs fonctions dans la corégulation de la transcription et de l'épissage ainsi que la maturation des miARN, DDX5 et DDX17 contrôlent plusieurs programmes cellulaires contribuant ainsi à la progression tumorale.

Mes travaux de thèse portant sur l'étude de l'impact de Ddx5 et Ddx17 sur la régulation de l'épissage alternatif dans des modèles tumoraux murins renforcent la compréhension du rôle majeur de ces hélicases à ARNs dans la progression tumorale et cela fait de ces protéines des cibles thérapeutiques potentielles. En effet, leurs fonctions dans la

co-régulation transcriptionnelle reposent sur des interactions physiques avec divers facteurs de transcription pour lesquels l'activité hélicase ATP dépendante de DDX5 et DDX17 n'est pas requise (Caretta et al., 2006; Watanabe et al., 2001). A l'inverse, le rôle de DDX5 et DDX17 dans la régulation de l'épissage est largement dépendante de leur activité hélicase (Lin et al., 2005). Ce détail est important puisque le domaine de liaison à l'ATP est une poche hydrophobe, qui constitue une cible pharmaceutique souvent plus efficace que la modulation des interactions du type protéine-protéine. Dans ce contexte, un criblage d'aptamères nucléiques dans des tumeurs du colon chez la souris a permis d'identifier une molécule ciblant spécifiquement DDX5 et diminuant son activité ATPase (Mi et al., 2010). Cette découverte a permis l'ouverture de nouvelles perspectives ; il serait maintenant intéressant d'étudier l'épissage des gènes cibles de DDX5 et DDX17 dans des cellules ou des tumeurs « transfectées » avec cet aptamère, puis d'étudier le phénotype et en particulier la migration, l'invasion ou la formation de métastases.

Au-delà de l'intérêt propre au ciblage pharmaceutique de DDX5 et DDX17 comme une potentielle thérapie anti-tumorale, l'ensemble de ces données met en avant le rôle de la dérégulation de l'épissage alternatif en tant que programme, ainsi que les aberrations des facteurs régulant l'épissage alternatif au cours de la progression tumorale. Dans ce contexte, il est intéressant de mentionner que le facteur d'épissage SF3b apparaît fréquemment muté chez des patients atteints de leucémie chronique lymphocytaire, qui présentent des altérations d'épissage (Hegele et al., 2012; Quesada et al., 2012). Ainsi le ciblage de facteurs d'épissage apparaît comme une approche thérapeutique anti-cancéreuse originale.

Les rôles de DDX5 et DDX17 dans la transcription, la maturation des microARNs et l'épissage alternatif sont importants pour la progression tumorale. Ces différentes étapes de l'expression des gènes sont primordiales pour la plasticité cellulaire. Chacun de ces programmes cellulaires a fait l'objet de nombreuses études qui ont décrit leur rôle à la fois dans des systèmes de différenciation physiologique et dans des situations de plasticité cellulaire liées à la progression tumorale. En revanche, la coordination de ces différents processus dans un même système cellulaire est très peu connue.

Au cours de ma thèse, je me suis focalisé sur l'étude de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) un processus physiologique qui s'observe lors du développement embryonnaire et qui notamment se réactive au cours de la progression tumorale. J'ai ainsi

pu démontrer que les ARNs hélicases DDX5 et DDX17 sont nécessaires à l'induction de la différenciation en étant co-activateurs des facteurs de transcription SMADs. De manière surprenante, nous avons observé une diminution de l'expression de DDX5 et DDX17 au cours de la TEM et nous avons proposé un modèle pour expliquer cette diminution par l'induction d'un microARN spécifique de la transition qui cible ces protéines, et dont l'expression dépend de DDX5 et DDX17. L'expression de ces protéines est donc dépendante d'une boucle de rétro-contrôle. La diminution de DDX5 et DDX17 entraîne l'expression d'un programme d'épissage spécifique permettant de compléter la transition épithélio-mésenchymateuse. En effet, les cibles d'épissage de DDX5 et DDX17 qui sont également régulées au cours de la différenciation sont des gènes notamment impliqués dans le remodelage du cytosquelette d'actine et la formation de lamellipodes.

Ces résultats montrent que les ARN hélicases DDX5 et DDX17 coordonnent de façon dynamique différents niveaux de régulation de l'expression des gènes au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse. Il est intéressant de noter que des observations identiques ont été également réalisées au cours d'un autre processus physiologique : la différenciation myoblastique, ce qui renforce le rôle de chef d'orchestre joué par ces deux ARN à différents niveaux du réseau complexe de régulation de l'expression génique.

Dans la littérature, la sur-expression des protéines DDX5 et DDX17 a été reportée au cours de la progression tumorale, notamment dans le cancer du sein. Par exemple, l'analyse au niveau protéique de l'expression de DDX5 dans différentes lignées de cancer du sein montre une nette augmentation du taux protéique de DDX5 dans les cellules basales comparées aux cellules luminales. Les cellules basales, plus agressives, présentent un phénotype mésenchymateux contrairement aux cellules luminales qui présentent un phénotype épithélial. Comme je l'ai décrit dans la partie 3, le niveau d'expression ne reflète pas toujours l'activité de DDX5 et DDX17, ces deux protéines pouvant être modifiées post-traductionnellement.

Les deux modèles de progression tumorale que j'ai étudiés au cours de ma thèse sont assez différents et posent la question de l'impact des variations d'expression des protéines DDX5 et DDX17 au cours de la progression tumorale. En effet, j'observe une sur-expression de Ddx17 au cours de la progression tumorale dans le modèle 4T1 et une diminution de DDX5 et DDX17 au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse. Pour bien comprendre

cette différence, l'expression de DDX5 et DDX17 devrait être étudiée à des temps très tardifs de différenciation, après plusieurs jours, pour savoir si la diminution de DDX5 et DDX17 est transitoire ou permanente.

Cependant, dans les deux modèles d'étude, j'ai relié le niveau d'expression de DDX5 ou DDX17 à des altérations moléculaires ou phénotypiques. Dans le modèle 4T1, la surexpression de Ddx17 dans les cellules 4T1 est liée à la fois à la régulation de l'épissage de l'histone macroH2A1 et à la migration et l'invasion de ces cellules. De même dans le modèle MCF10a, la diminution de DDX5 et DDX17 entraîne un changement d'épissage de gènes impliqués dans le remodelage du cytosquelette d'actine notamment. De plus, si la diminution de DDX5 et DDX17 dans la TEM semble importante pour contrôler un programme d'épissage, l'abolition totale de DDX5 et DDX17 ne permet pas de réaliser la TEM. La variation du niveau d'expression de DDX5 et DDX17 semble donc très importante pour la TEM.

Dans les deux modèles d'études, Ddx5 et Ddx17 régulent des centaines de gènes aussi bien au niveau de l'expression globale, qu'au niveau de l'épissage alternatif. Les fonctions de Ddx5 et Ddx17 dans la transcription et l'épissage suggèrent une régulation directe de ces ARN hélicases sur ces cibles. Cependant, certains de ces gènes peuvent être régulés de manière indirecte, notamment dans le modèle de TEM où je montre que Ddx5 et Ddx17 régulent SNAIL1 et SNAIL2, deux facteurs de transcription qui, à leur tour, régulent un programme transcriptionnel. La première partie de mon travail de recherche s'est focalisée sur l'épissage de la macroH2A1 et d'une de ses cibles, SOD3. La modulation de l'épissage de macroH2A1 et de l'expression de SOD3 permet de récapituler une partie du phénotype de la déplétion de DDX5 et DDX17. Cependant, les effets bien que significatifs, sont relativement modestes. Ces résultats sont attendus dans la mesure où DDX5 et DDX17 régulent des centaines de gènes et l'hypothèse est qu'un certain nombre d'entre-eux participe au phénotype observé. Il n'est néanmoins pas étonnant qu'un seul événement d'épissage ait un effet phénotypique. Par exemple, un des événements d'épissage retrouvé régulé dans la TEM et par DDX5 et DDX17 est l'exon 12 de ENAH. Les deux variants produits par ce gène influencent différemment la migration cellulaire (Roussos, Balsamo, et al., 2011b; Roussos, Goswami, et al., 2011).

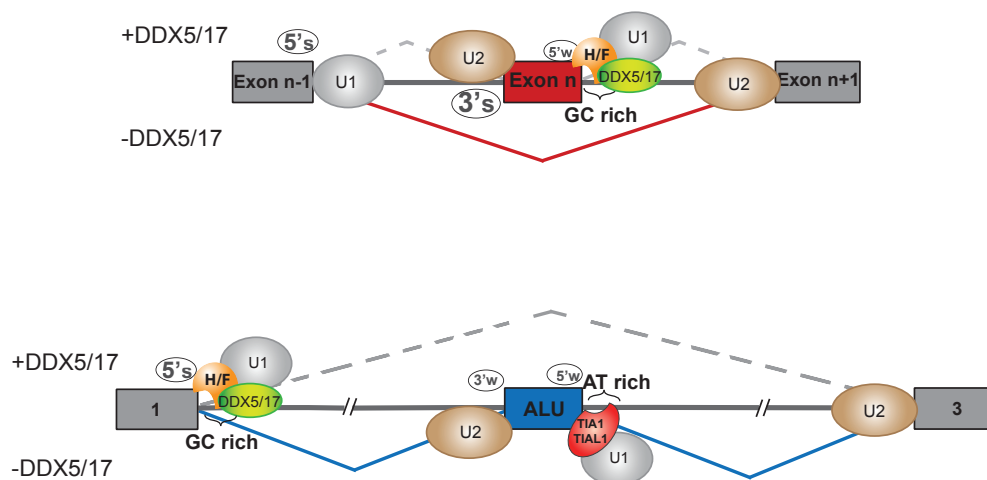
Mécanisme de régulation de l'épissage par les ARN hélicases DDX5 et DDX17.

Le rôle de DDX5 dans l'épissage est relié, dans la littérature, à son interaction au niveau du site 5' d'épissage avec le complexe ribonucléoprotéique U1 permettant la dissociation du snARN U1 de l'ARN pré-messager. DDX5 et DDX17 sont aussi impliquées dans l'épissage alternatif de quelques exons. Dans la majorité des cas décrits dans la littérature, DDX5 coopère avec d'autres facteurs d'épissage pour réguler l'épissage alternatif. DDX5 interagit ou permet la fixation de différents facteurs comme HnRNPA1, RBM4 ou Mbnl1 au niveau du site 5' d'épissage. Dans les deux derniers cas, la régulation de l'épissage est dépendante du remodelage de structures secondaires par DDX5. La prédiction et la validation de structures secondaires sont très complexes et les connaissances des mécanismes de régulation de l'épissage alternatif par DDX5 et DDX17 sont très incomplètes. Cela est notamment dû au fait que ces études sont réalisées seulement sur quelques exons modèles.

L'approche à large échelle utilisée dans l'équipe, dans différents modèles cellulaires (4T1, MCF10A et MCF-7), à la suite de la déplétion de DDX5 et DDX17, a permis d'identifier de nombreux exons alternatifs régulés par ces protéines. Ces différentes études ont permis de définir des caractéristiques communes aux exons régulés par DDX5 et DDX17. Environ deux tiers des exons sont exclus et un tiers est inclus après la déplétion de DDX5 et DDX17. Tous ces exons apparaissent dépendants de l'activité hélicase de DDX5 ou de DDX17. Ces exons ont également comme caractéristique commune d'avoir une région 5' d'épissage faible par rapport à d'autres exons alternatifs. Nous proposons un modèle différent pour les exons inclus ou exclus par la déplétion de DDX5 et DDX17. Les exons exclus ont un site 5' d'épissage très riche en GC. Ces séquences forment plus facilement des structures secondaires stables. De plus des prédictions bio-informatiques ont montré un enrichissement en G-quadruplexes. Ces structures sont formées par des plateaux de 4 guanines (G), aussi appelés « quartet ». L'empilement parallèle et ininterrompu d'au moins 2 quartets, intercalés par un cation monovalent (sodium ou potassium) stabilisant la structure constitue le G-quadruplexe. Ces structures ont été mises en évidence au niveau du site 5' de certains exons régulés par DDX5 et DDX17. Les exons exclus par la déplétion de DDX5 et

DDX17 sont aussi régulés par HnRNP H/F, des facteurs d'épissage qui se fixent sur des régions riches en GC. DDX5 et DDX17 interagissent avec HnRNP H et la déplétion de DDX5 et DDX17 diminue le recrutement de HnRNP H sur les sites 5' d'épissage des exons régulés par DDX5 et DDX17. Ainsi dans ce modèle, DDX5 et DDX17 coopéreraient avec le facteur d'épissage HnRNP H/F en déroulant des structures secondaires d'ARN favorisant ainsi son recrutement.

Les exons inclus, suite à la déplétion de DDX5 et DDX17, présentent des caractéristiques différentes. Ces exons ont des séquences AT riches au niveau de leurs sites 5' d'épissage. En revanche, l'exon n-1 a une région 5' d'épissage riche en GC. Nous avons également observé une coopération au niveau de la région 5' d'épissage de l'exon n-1 entre DDX5 et HnRNP H. L'hypothèse est que la déplétion de l'un de ces facteurs diminue la cinétique d'épissage et laisse le temps à d'autres facteurs d'épissage, comme Tia1 qui se fixe sur des séquences riches en AT, d'inclure l'exon n possédant des sites faibles. Ce modèle cinétique repose également sur le fait que ces exons sont au niveau de base très peu inclus et leur taux d'inclusion augmente lorsque l'on ralentit la vitesse d'élongation de la transcription.



Modèle de régulation de l'épissage alternatif par les ARNs hélicases DDX5 et DDX17

Cette étude a donc permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme de régulation de l'épissage alternatif par les ARN hélicases DDX5 et DDX17. J'ai pour ma part contribué à valider les exons exclus par la déplétion de DDX5 et DDX17 et HnRNP H/F et à valider l'interaction entre DDX5, DDX17 et HnRNP H. J'ai également validé la présence de G-

quadruplexes en utilisant des drogues stabilisant ces structures et en étudiant l'effet de ces drogues sur les événements d'épissage dépendant de DDX5 et DDX17.

Programmes d'épissage régulés par DDX5 et DDX17.

De nombreuses puces exons ont été réalisées dans l'équipe à la suite de la déplétion de DDX5 et DDX17. Ces études, à large échelle, ont été menées dans différents modèles cellulaires comme les cellules 4T1, MCF-7, Lncap, MCF10a et C2C12. Ces lignées ont des origines très différentes. Les cellules Lncap sont des lignées humaines de la prostate. Les C2C12 sont des myoblastes murins. Les 4T1, MCF-7 et MCF-10 sont des lignées originaires du sein. Ces différentes études ont permis de déterminer un mécanisme de régulation de l'épissage alternatif par les ARN hélicases DDX5 et DDX17 et notamment de mettre en évidence la coopération avec le facteur HnrnpH dans le modèle décrit ci-dessus. Cependant il est intéressant de comparer les exons régulés par DDX5 et DDX17 dans ces différents modèles. On peut séparer les exons régulés par DDX5 et DDX17 en deux catégories. D'une part, il existe un certain nombre d'exons régulés par DDX5 et DDX17 quel que soit le contexte cellulaire. D'autre part, certains exons sont régulés par DDX5 et Ddx17 de manière dépendante du contexte cellulaire. Par exemple, les exons régulés au cours de la TEM dans les cellules MCF10a de manière dépendante de DDX5 et DDX17 ne sont pas régulés par ces protéines au cours de la différenciation des C2C12 ou dans les cellules 4T1 ou MCF-7. De plus, ces exons sont impliqués dans le même processus, la régulation du cytosquelette d'actine.

DDX5 et DDX17 contrôlent donc un sous-ensemble d'exons qui sont impliqués dans l'établissement d'un phénotype particulier. Ces protéines contrôlent des programmes d'épissage qui sont dépendants du contexte cellulaire. Dans les cellules C2C12, Ddx5 et Ddx17 régulent des exons impliqués dans la différenciation musculaire qui ne sont pas retrouvés dans les autres modèles cellulaires. Dans les cellules MCF-7 et LnCap, ces protéines régulent des exons de gènes impliqués dans la régulation des voies de signalisation des hormones stéroïdiennes. Cette régulation dépendante du contexte peut s'expliquer en partie par le fait que les gènes contrôlés au niveau de l'épissage par DDX5 et DDX17 sont exprimés spécifiquement dans ces modèles.

Nous montrons un modèle d'épissage de coopération entre DDX5/DDX17 et HnrnpH/F au niveau du site 5' d'épissage qui est riche en GC. Cependant, en fonction du contexte cellulaire, d'autres facteurs d'épissage ayant une affinité pour des sites de fixation riches en GC pourraient coopérer avec les ARN hélicases. Dans le modèle MCF10a nous avons des résultats préliminaires qui montrent que certains exons régulés par DDX5 et DDX17 au cours de la TEM sont également dépendants de HnrnpH/F et leurs régulations pourraient correspondre au modèle que j'ai déjà décrit. D'autres exons ne sont cependant pas dépendants de HnrnpH/F. Pour ces exons, nous avons des résultats préliminaires qui montrent qu'ils sont dépendants des facteurs Esrp1 et Esrp2, des facteurs d'épissage bien caractérisés au cours de la TEM. De plus, j'ai montré que Esrp1 et DDX5 interagissent dans les cellules MCF10a. Ainsi, DDX5 et DDX17 pourraient réguler des exons alternatifs également en fonction de l'expression de facteurs d'épissage exprimés dans les modèles étudiés.

Tables Supplémentaires

	Nom	Autres Noms	Domaines Protéiques	Sites de liaison	Gènes cibles
Protéines SRS	SRSF1	Sfrs1, ASF, SF2	RRM, RS	RGAAGAAC	HipK3, CaMKII δ , HIV RNAs
	SRSF2	Sfrs2, SC35	RRM, RS	UGCUGUU	AChE
	SRSF3	Sfrs3, X16, SRp20	RRM, RS	GCUCCUCUUC	SRp20, CT/CGRP
	SRSF4	Sfrs4, SRp75	RRM, RS	GAAGGA	FN1, E1A, CD45
	SRSF5	Sfrs5, HRS, SRp40	RRM, RS	AGGAGAAGGGA	HipK3, PKC β -II, Fibronectin
	SRSF6	Sfrs6, SRp55	RRM, RS	GGCAGCACCUG	cTnT, CD44
	SRSF7	Sfrs7, 9G8	RRM, RS, C2HC Znf	(GAC)n	Tau, GnRH, 9G8
	SRSF8	Sfrs8, SWAP	RS, SWAP	ND	SWAP, CD45, Tau
	SRSF9	Sfrs9, SRp30c	RRM, RS	CUGGAUU	Glucocorticoid receptor
Protéines hnRNPs	hnRNP A1	Hnrnpa1	RRM, RGG	UAGGGA/U	HipK3, SMN2, c-H-ras
	hnRNP A2/B1	Hnrnpa2b1, Hnrnpa2	RRM, RGG	(UUAGGG)n	4.1R, HIV Tat, IKBKAP
	hnRNP C	Hnrnpc, Hnrnpc1/c2	RRM	U-rich	β -amyloid receptor
	hnRNP F	Hnrpf	RRM, RGG, GY	GGGA, G-rich	PLP, c-SRC, Bcl-x
	hnRNP G	Rbmxt, Hnrnpg	RRM, RGG, SRGY	AAGU	SMN2, α -tropomyosin
	hnRNP H	Hnrph1	RRM, RGG, GYR, GY	GGGA, G-rich	PLP, HIV tat, Bcl-x
	hnRNP L	Hnrnpl	RRM	C/A-rich	eNOS, CD45
	PTB	Ptbp1, Hnrpi	RRM	UCUU, CUCUCU	nPTB, c-SRC, Fas, cTNT, CGRP, NMDA, CLBC, hnRNP
	nPTB	Ptbp2, brPTB	RRM	CUCUCU	c-SRC, GlyR α 2

	Nom	Autres Noms	Domaines Protéiques	Sites de liaison	Gènes cibles
Autres facteurs	RBFOX1	A2bp1, Fox1	RRM	(U)GCAUG	NMHC-B, CGRP, F1 γ
	RBFOX2	Rbm9, Fox2	RRM	(U)GCAUG	NMHC-B, 4.1R, FGFR2
	CELF1	Cugbp1, Brunol2	RRM	U/G-rich	cTNT, Insulin Receptor
	CUGBP2	ETR-3, Brunol3	RRM	U/G-rich	cTnT, Tau, Cox-2
	CELF4	Brunol4	RRM	U/G-rich	Mtmt1, cTnT
	ELAVL4	HuD	RRM	U-rich	Ikaros, CGRP, AChE
	NOVA1	Nova-1	KH	YCAY	GlyR α 2, GABAa
	NOVA2	Nova-2	KH	YCAY	JNK, GIRK, neogenin
	TIA1	mTia1	RRM	U-rich	MYPT1, Fas, CGRP, FGFR2, TIAR, IL-8, VEGF
	TIAL1	TIAR	RRM	U-rich	TIA1, CGRP, TIAR
	MNBL1	Mbnl	C3H1 Znf	YGCU(U/G)Y	cTnT, Insulin receptor, Clcn1, Tnnt3
	KHDRBS3	T-STAR, SIm-2	KH	UAAA	CD44, VEGF-A
	QKI	Qk, Quaking	KH	ACUAAY[...]UAAY	MAG, PLP
	SFPQ	PSF	RRM	ND	CD45, CoAA
	RBM17	SPF45	RRM, G patch	ND	Sxl, Fas
	RBM4	Rbm4a, Lark	RRM, C2HC Znf	C/U-rich	MAPT, α -tropomyosin, Tau
	SF3B1	SAP155, SF3b155	RRM, HEAT	ND	Bcl-x
	KHDRBS1	Sam68	KH	A/U-rich	Bcl-x

Table Supplémentaire 1 : Liste des principaux facteurs d'épissage des familles SR ou hnRNP ainsi que les facteurs d'épissage exprimés de manière tissus spécifiques.

D'après Chen & Manley 2009. Adapté par M.Polay Espinoza.

Table Supplémentaire 2 : Liste des principaux transcrits régulés par épissage alternatif au cours de la Transition Epithélio-Mésenchymateuse.

Données compilées à partir de Venables & al. MCB 2012, Warzecha & Carsten SCB 2013, Braeutigam & al. Oncogene 2013, Shapiro & al. PLoS genetics 2011 et Biamonti & al. CMLS 2012.

Gene	EMT-relevant gene functional tendency	RNA and/or protein region altered by alternative splicing /functional difference	Alternative splicing regulated by
ADD3	structural constituent of cytoskeleton; actin binding; actin cytoskeleton		
ARHGGEF11 (PDZ-RhoGEF)	RhoA-specific guanine nucleotide exchange factor	C-terminus; may influence homodimerization or interaction with PAK4 and LARG	RRFOX2
CD44	Cell-surface glycoprotein involved in cell adhesion and migration	Extra-cellular membrane proximal region; creates a heavily glycosylated stalk	ESRP
FAT1	enhancement of cell migration and invasion	cytoplasmic domain	ESRP
NF2	tumor suppressor; inhibitor of cell migration	N-terminal intramolecular	
NUMB	Complex protein implicated in many roles including cell migration and adhesion	Phosphotyrosine binding domain; the encoded peptide confers localization to the plasma	ESRP/RRFOX2
PPP1B1	tumor cell motility and migration	phosphorylation motif for AKT1	
SIK	STE20-like kinase with a role in promoting cell motility	Predicted coiled-coil domain; may specify interaction partners	ESRP/RRFOX2
FGFR1	induction of EMT	igli-like domain	
STX2	epithelial cell morphogenesis and activation	C-terminal	RRFOX2
TEAD1	transcriptional activation of mesenchymal targets	internal repeat downstream	
VEGFA	induction of EMT	3'UTR	
APBB2	receptor binding; neurological system process		
CA12	hydro-lyase activity		RRFOX2
EXOC1	synaptic vesicle exocytosis; intracellular protein transport; exocytosis		RRFOX2
MAG1 (Batap1)	Scaffolding protein associated with complexes at the inner plasma membrane	Encodes peptide between the two WW domains	ESRP
PBHM1	establishment or maintenance of chromatin architecture		RRFOX2
SCRIB	Scaffolding protein associated with tight junctions and cell polarity formation and stability of cell junctions	Encodes a peptide proximal to the first PDZ domain; partially affects PKC phosphorylation	ESRP/RRFOX2
ABL2	regulation of actin remodeling	homeo-domain homologous region	
ABL2	regulation of actin remodeling	N-terminal	
ARHGAP17 (Rho11)	GTPase-activating protein involved in maintenance of the tight junction	Part of proline rich domain	ESRP
BNAI2 (Irsps3)	Cdrt2 effector protein involved in lamellipodia and filopodia formation	Penultimate exon with stop codon; differentially phosphorylated in response to GF-1	ESRP
CTNND1 (p120-catenin)	cell adhesion and signal transduction; Delta-catenin; regulator of cell adhesion and signaling	Coiled-coil domain; N-terminal RhoA binding stabilization domain	ESRP
Ctn	structural constituent of cytoskeleton; actin binding; actin cytoskeleton		ESRP/RRFOX2
DIAPH2	structural constituent of cytoskeleton; actin binding; actin cytoskeleton cell motion		RRFOX2
DNM2	GTPase that binds cytoskeletal proteins	Pleckstrin homology domain; affects subcellular localization	ESRP/RRFOX2
Dock9	small GTPase regulator activity; guanyl-nucleotide exchange factor activity; intracellular protein transport; cell motion		RRFOX2
ENAH (Mena)	Regulator of actin dynamics	Eng/Navp homology domain; contains a phosphorylation site that may disrupt actin binding	ESRP/RRFOX2
EPB415 (Ymo3)	A FERM protein that interacts with Crumbs complex to regulate cell architecture	Paxillin-binding domain; enhances focal adhesion complexes	ESRP
FLNB	F-actin cross-linking protein	Contributes to the hinge domain; allows for more rigid actin branching	ESRP
FMN13	structural constituent of cytoskeleton; actin binding; actin cytoskeleton cell motion		RRFOX2
ILK	tumor invasion via inhibition of E-cadherin	SUTR	
ITGA6	Alpha subunit of integrin, a laminin receptor	Light chain and cytoplasmic domain; changes C-terminus sequence	ESRP
MACF1	structural constituent of cytoskeleton; actin binding; actin cytoskeleton cell motion		RRFOX2
MPRIP	structural constituent of cytoskeleton; protein binding; small GTPase regulator activity; actin cytoskeleton		RRFOX2
NPHP3	constituent of cytoskeleton; microtubule cytoskeleton-mediated transport; primary metabolic process		RRFOX2
Pard3	tight junction cell adhesion; tight junction		RRFOX2
PLD2	oxidoreductase activity; cell adhesion		RRFOX2
PTPRF	stabilization of adherens junctions		
RALGAP5	A guanine nucleotide exchange factor involved in cytoskeleton reorganization	FNIII-like domain 5 (LASE-C)	ESRP
SYNE2	structural constituent of cytoskeleton; actin binding; actin cytoskeleton cell motion	Between a PxxP motif and a pleckstrin homology domain; may influence GEF activity	RRFOX2
VCL	stabilization of E-cadherin at adherens junctions		
WASF1	regulation of actin cytoskeleton	SUTR	
CSNK1A1	promotes epithelial cell-cell adhesion	SUTR	
CSNK1G3	Wnt pathway regulation	elongated C-terminus	
DKK3	Wnt signaling antagonist	C-terminal	
FGFR2	Transmembrane receptor tyrosine kinase	SUTR	
FGFR2	Transmembrane receptor tyrosine kinase	Confers ligand binding specificity; igli-like domain	ESRP/RRFOX2
GIT2	G-protein coupled receptor protein signaling pathway		RRFOX2
GPCR126	G-protein coupled receptor protein signaling pathway		RRFOX2
LRRFP2	G-protein coupled receptor protein signaling pathway	Predicted coiled coil domain; encoded peptide may enhance interaction with Dvl3	ESRP
MAP3K7 (Tak1)	involved in activation of Wnt signaling	Peptide encoded by downstream exon is required for interaction with Tab2/3	ESRP/RRFOX2
Ron	Kinase that mediates TGF-beta and BMP signal transduction		SRSF1/hnRNPA1
TCF7L2 (Tcf4)	Tyrosine Kinase Receptor		ESRP
Tsc2	Transcription factor involved in Wnt signaling pathway	Differential activation of Wnt/beta-catenin target genes	ESRP
ATP11C	small GTPase regulator activity; intracellular protein transport; endocytosis		RRFOX2
Evl1	hydrolyase activity; transmembrane transporter activity		RRFOX2
Mbn11	transcription factor activity; receptor binding; transcription factor activity		RRFOX2
Mbn11	double-stranded DNA binding; mesoderm development; muscle organ development		RRFOX2
NFYA	transcription factor activity		RRFOX2
PIERHM2	transcription factor activity		RRFOX2

Cell motility and invasion

Induction of EMT

Others

Polarity

Regulation of actin cytoskeleton and cell adhesion

Signaling pathway

Transcription factor

Annexe : Rôle des variants de l'histone macroH2A1 dans la progression tumorale.

Dans le premier article de ma thèse, j'ai réalisé une étude fonctionnelle sur les variants d'épissage de l'histone macroH2A1. La fonction de cette histone et le rôle de ses deux variants sont peu connus. L'objectif de cette annexe est de décrire la structure de ces deux variants, de discuter de l'implication de cette structure dans la régulation des gènes et de détailler les évidences qui relient ces variants d'épissage à la progression tumorale.

L'histone macroH2A1 est composée de trois domaines distincts. Un domaine N-terminal H2A-like (en bleu sur la figure 1), un domaine linker non structuré (en vert) et un domaine macro en C-terminal (en rouge). Le domaine macro est deux fois plus grand que le domaine H2A-like et n'est pas inclus dans le nucléosome, au contraire il sort de la chromatine (voir figure 2). Deux exons codant une partie du domaine macro sont connus pour être mutuellement exclusif ce qui permet la production des isoformes macroH2A1.1 et macroH2A1.2. Ces deux isoformes diffèrent par une courte séquence d'acides aminés (voir figure 1) qui affecte la taille et l'hydrophobicité d'une poche de liaison. Il a ainsi été démontré que seule l'isoforme macroH2A1.1 est capable de fixer des métabolites dérivés du NAD⁺ (Kustatscher, Hothorn, Pugieux, Scheffzek, & Ladurner, 2005). L'isoforme macroHA1.2 n'étant pas capable de fixer ces métabolites, cette isoforme apparaît dans ce contexte comme un dominant négatif. L'histone macroH2A1 est donc considérée comme un senseur de métabolites au niveau de la chromatine. Plusieurs protéines sont capables de fixer le domaine macro de macroH2A1 et la fixation de métabolite par l'isoforme macroH2A1.1 a pour conséquence de modifier la conformation du domaine, cela a été suggéré comme pouvant modifier des interactions protéine-protéines (Posavec, Timinszky, & Buschbeck, 2013).

L'histone macroH2A1 a d'abord été considérée comme un répresseur de la transcription. Elle a été reliée à l'inactivation du chromosome X chez la femme (Costanzi & Pehrson, 1998). Sur les autosomes, cette histone occupe des régions génomiques associées à la répression transcriptionnelle (Gamble, Frizzell, Yang, Krishnakumar, & Kraus, 2010). Cependant, des études récentes ont suggéré que cette histone est impliquée également dans l'activation de certains gènes (Creppe et al., 2012; Gamble et al., 2010).

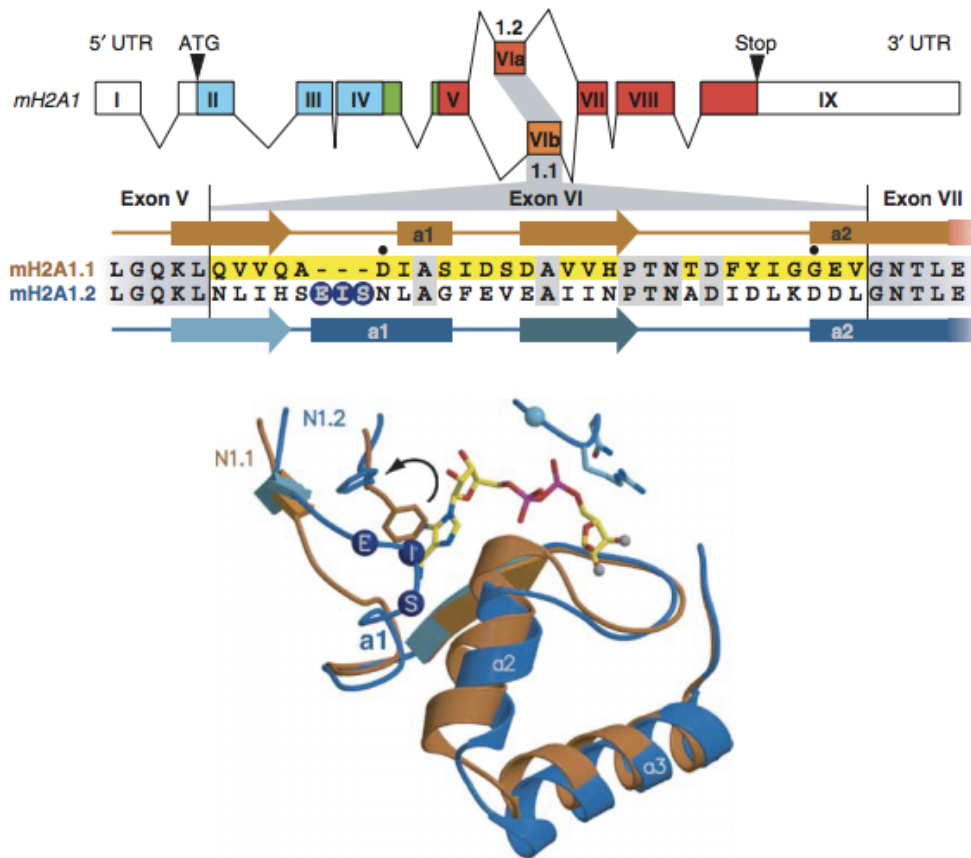


Figure 1 : Différences biochimiques et structurales des deux isoformes de l'histone macroH2A1 ; D'après *Kustatcher et al. NSMB, 2010*.

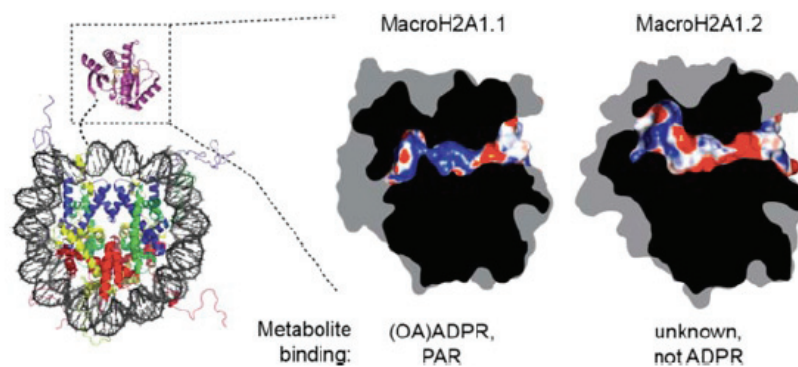


Figure 2 : Différences de structures entre les variants macroH2A1.1 et macroH2A1.2 et conséquences pour la fixation de métabolites. D'après *Posavec et al. Cell. Mol. Life Sci., 2013*.

De nombreuses évidences relient cette histone à la progression tumorale (voir figure 4). Cependant, de nombreuses études ne prennent pas en compte les différentes isoformes de ce gène. Les études qui tiennent compte l'épissage de ce variant révèlent de profondes différences fonctionnelles entre l'isoforme macroH2A1.1 et macroH2A1.2. Le variant d'épissage macroH2A1.1 est associé à un rôle de tumeur suppresseur. L'expression de ce variant corrèle de manière inverse avec la prolifération dans des tumeurs du sein et du poumon (J C Sporn et al., 2009). De manière plus générale, l'expression de macroH2A1.1 est diminué dans des tissus cancéreux de poumon, vessie, testicule, ovaire, colon, sein en comparaison de tissus sains correspondants (Novikov et al., 2011; Judith C Sporn & Jung, 2012). A l'inverse, l'expression et la fonction de macroH2A1.2 semblent dépendantes du contexte et du cancer étudié. Dans le mélanome, macroH2A1.2 réduit le potentiel métastatique des cellules (Kapoor et al., 2010). A l'inverse dans le cancer du sein, en particulier dans des cellules HER-2 positives, macroH2A1.2 interagit et régule HER-2 et favorise la migration et l'invasion des cellules tumorales (Li et al., 2012). Au niveau moléculaire, ces deux variants ont été décrits comme régulant positivement ou négativement la transcription de gènes associés à la progression tumorale.

Interactor	Binding site	Experimental evidence	Suggested function
SPOP ^{19,20,44}	Linker domain (aa 166–179)	Yeast-two-hybrid Coimmunoprecipitation In vitro binding SPOP/Cullin3-mediated polyubiquitination	Loading on the inactive X chromosome
HDAC1 and HDAC2, ¹¹	Macro domain of I.2	Coimmunoprecipitation	Generation of repressive chromatin environment
ATF2	Macro domain of	Nucleosome reconstitution In vitro binding studies	Positioning of a repressive nucleosome
EZH2 and Suz12, ³⁰	Unknown	Coimmunoprecipitation	Co-regulation of developmental genes
PARP1, ^{23,24,26}	Macro domains	Coimmunoprecipitation Inhibition of PARP1 activity	Regulation of heat shock responsive genes
Poly-adp-ribose (PAR), and related metabolites ^{25,26}	Macro domain of I.1 exclusively	Calorimetric analysis In vitro binding Coimmunoprecipitation	Sensing of local PAR concentrations and chromatin reorganization
Centrosomes ^{21,22}	Unknown	Cell fractionation	Storage of non-incorporated macroH2A Protein degradation
Others including RCC1, Ran and DEK ²⁴	Unknown	Coimmunoprecipitation	Unknown

Figure 3 : Liste des interactants connus de l'histone macroH2A D'après *Bushbeck M et Di Croce, 2010*

Cancer type	MacroH2A protein	Observation	Sample type	Species
Breast cancer	MacroH2A1.1, macroH2A2	Downregulation in highly proliferative tumors	Tissue samples	Human
Breast cancer	MacroH2A1.1, macroH2A1.2	Lower macroH2A1.1:macroH2A1.2 ratio favors metastasis and reduces survival	Syngenic cell lines and tissue samples	Mouse, human
Breast cancer	MacroH2A1.2	Increases tumor growth	Xenograft	Human
Colorectal cancer (CRC)	MacroH2A1	Inhibits proliferation	Cell lines	Human
CRC	MacroH2A1.1, macroH2A1.2	Downregulation of macroH2A1.1 in tumors correlating with reduced survival	Tissue samples	Human
Hepatocellular carcinoma (HCC)	MacroH2A1.1, macroH2A1.2	Upregulation in steatosis-associated HCC	Tissue samples	Mouse, human
Melanoma	MacroH2A1, macroH2A2	Downregulation promotes disease progression and increases metastatic potential	Syngenic cell lines and tissue samples	Mouse, human
Non-small cell lung cancer (NSCLC)	MacroH2A1.1	Downregulation correlates with higher risk of tumor recurrence	Tissue samples	Human
Teratoma	MacroH2A1	Depletion of macroH2A1 provokes massive expansion of undifferentiated carcinoma tissue	Xenografted ES cells	Mouse
Testicular, lung, bladder, cervical, breast, colon, ovarian and endometrial cancer	MacroH2A1.1	Downregulation in tumors Inhibition of proliferation	Tissue samples Cell lines	Human

Figure 4 : Observations impliquant l'histone macroH2A dans les cancers ; D'après *Cantarino et al. Cancer Letters, 2013.*

Appendice

Au cours de ma thèse, j'ai également participé à différents travaux de l'équipe. Dans les cellules MDA-MB-231, nous avons montré que DDX5 et DDX17 sont des régulateurs du facteur de transcription NFAT5, un facteur de transcription impliqué dans la migration et l'invasion. En effet, ces ARN hélicases sont des co-régulateurs transcriptionnels de NFAT5 mais sont également responsables de l'inclusion de l'exon 5 de NFAT5 qui induit à la dégradation de l'ARN de NFAT5. Dans ce projet, j'ai réalisé les différentes expériences de migration et d'invasion pour démontrer le rôle de DDX5, DDX17 et NFAT5 dans la migration et l'invasion cellulaire des cellules MDA-MB-231.

Un second projet développé dans l'équipe s'est focalisé sur le rôle de DDX5 et DDX17 dans la régulation des voies des hormones stéroïdiennes. Nous avons utilisé des cellules de cancer du sein MCF-7 qui répondent aux oestrogènes et les cellules du cancer de la prostate LnCap qui répondent à la testostérone. Dans ces deux modèles, nous avons montré que DDX5 et DDX17 sont des régulateurs majeurs des voies oestrogéniques. D'une part ces ARN hélicases régulent au niveau transcriptionnel environ 50% des gènes régulés par les hormones stéroïdiennes. De plus DDX5 et DDX17 régulent au niveau de l'épissage des gènes codant pour des régulateurs du récepteur aux oestrogènes et aux androgènes. Dans ce projet, j'ai réalisé les expériences avec le modèle LnCap.

Ces deux études renforcent le rôle des ARN hélicases DDX5 et DDX17 au cours de la progression tumorale dans des modèles de cancer du sein et soulignent l'importance de leur fonction dans l'épissage dans ce processus.

ORIGINAL ARTICLE

Dual role of the ddx5/ddx17 RNA helicases in the control of the pro-migratory NFAT5 transcription factorS Germann^{1,2,3,4,5}, L Gratadou^{1,2,3,4,5}, E Zonta^{1,2,3,4,5}, E Dardenne^{1,2,3,4,5}, B Gaudineau⁶, M Fougère⁶, S Samaan^{1,2,3,4,5}, M Dutertre^{1,2,3,4,5}, S Jauliac⁶ and D Auboeuf^{1,2,3,4,5}¹Université de Lyon, Lyon, France; ²Inserm U1052, Lyon, France; ³CNRS UMR5286, Lyon, France; ⁴Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France; ⁵Université Lyon 1, Lyon, France and ⁶CNRS UMR7212, INSERM U944, Université Paris Diderot, Institut d'Hématologie, Hôpital Saint-Louis, Paris, France

Ddx5 and ddx17 are two highly related RNA helicases involved in both transcription and splicing. These proteins coactivate transcription factors involved in cancer such as the estrogen receptor alpha, p53 and beta-catenin. Ddx5 and ddx17 are part of the splicing machinery and can modulate alternative splicing, the main mechanism increasing the proteome diversity. Alternative splicing also has a role in gene expression level regulation when it is coupled to the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway. In this work, we report that ddx5 and ddx17 have a dual role in the control of the pro-migratory NFAT5 transcription factor. First, ddx5 and ddx17 act as transcriptional coactivators of NFAT5 and are required for activating NFAT5 target genes involved in tumor cell migration. Second, at the splicing level, ddx5 and ddx17 increase the inclusion of NFAT5 exon 5. As exon 5 contains a pre-mature translation termination codon, its inclusion leads to the regulation of NFAT5 mRNAs by the NMD pathway and to a decrease in NFAT5 protein level. Therefore, we demonstrated for the first time that a transcriptional coregulator can simultaneously regulate the transcriptional activity and alternative splicing of a transcription factor. This dual regulation, where ddx5 and ddx17 enhance the transcriptional activity of NFAT5 although reducing its protein expression level, suggests a critical role for ddx5 and ddx17 in tumor cell migration through the fine regulation of NFAT5 pathway.

Oncogene (2012) 31, 4536–4549; doi:10.1038/onc.2011.618; published online 23 January 2012

Keywords: ddx5; ddx17; NFAT5; cancer; transcriptional coregulator; splicing

Introduction

Breast cancer is a leading cause of morbidity in women worldwide because of metastasis formation, which is

directly linked to the migratory and invasive phenotype of cancer cells (Friedl and Wolf, 2003). Invasion is a complex process relying on the capacity of the cells to migrate and to destroy and reorganize the extracellular matrix. It is now well established that tumor progression relies on the alteration of transcriptional programs controlling specific cellular programs (Hanahan and Weinberg, 2000). In this context, the NFAT family of transcription factors is gaining increasing interest in breast cancer. This family comprises five genes, NFAT1 to NFAT5. NFAT1, NFAT2, NFAT3 and NFAT4 have been first identified as T-cell transcription factors, whereas NFAT5 has been involved in the cellular response to osmotic stress (Macian, 2005; Burg *et al.*, 2007; Mancini and Toker, 2009; Muller and Rao, 2010). It is now well documented that NFAT proteins are also present in non-immune cells and regulate a variety of signaling pathways involved in cell growth and development (Baksh *et al.*, 2002; Chuvpilo *et al.*, 2002; Mancini and Toker, 2009; Muller and Rao, 2010). Importantly, members of the NFAT family, in particular NFAT5, have recently been involved in the migratory capacity of breast cancer cells (Jauliac *et al.*, 2002; Ayers *et al.*, 2004; Yoeli-Lerner *et al.*, 2005; Mancini and Toker, 2009; Fougere *et al.*, 2010; Muller and Rao, 2010).

Increasing evidences indicate that alterations of splicing programs contribute to tumor progression (Blencowe, 2003; David and Manley, 2010; Warzecha *et al.*, 2010; Dutertre *et al.*, 2010b). Indeed, most of the human genes can generate different splicing variants coding for different protein isoforms having slightly different activities or even opposite biological activities (Stamm *et al.*, 2005; David and Manley, 2010; Dutertre *et al.*, 2010b). In addition, alternative splicing can have an important role in the regulation of gene expression level. Indeed, about one third of alternative exons contain a pre-mature translation termination codon resulting in mRNA regulation by the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway. Therefore, the coupling of alternative splicing with NMD may provide a general means of decreasing protein expression level. This mechanism that has been referred to as 'regulated unproductive splicing and translation' or RUST has been involved in the downregulation of several cancer-related proteins (Lewis *et al.*, 2003;

Correspondence: Dr D Auboeuf, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Centre Léon Bérard, 28 Rue Laënnec, Lyon F-69008, France. E-mail: didier.auboeuf@inserm.fr

Received 14 July 2011; revised 1 November 2011; accepted 28 November 2011; published online 23 January 2012

Barbier *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2007; Neu-Yilik and Kulozik, 2008; Gardner, 2010).

Although transcriptional programs are under the control of transcriptional factors and coregulators, splicing programs are under the control of splicing factors (Blencowe, 2003; David and Manley, 2010; Warzecha *et al.*, 2010; Dutertre *et al.*, 2010b). An increasing number of proteins have been involved in both transcription and splicing (Auboeuf *et al.*, 2007; Allemand *et al.*, 2008). This is the case of the highly related *ddx5* and *ddx17* RNA helicases (also known as p68 and p72, respectively) that act both in transcription and splicing. Indeed, *ddx5* and *ddx17* are transcriptional coregulators of the estrogen receptor alpha, p53, beta-catenin and MyoD transcription factors among others (Watanabe *et al.*, 2001; Bates *et al.*, 2005; Caretti *et al.*, 2006; Fuller-Pace and Ali, 2008). It is believed that *ddx5* and *ddx17* are recruited on target gene promoters by these transcriptional factors and in turn recruit the RNA polymerase II or enzymes with histone acetylase or deacetylase activities (Metivier *et al.*, 2003; Rossow and Janknecht, 2003; Wilson *et al.*, 2004; Janknecht, 2010; Dutertre *et al.*, 2010a; Fuller-Pace and Moore, 2011). In addition, *ddx5* and *ddx17* copurify with the splicing machinery or spliceosome and can change alternative splicing-site selection in transcripts produced from the H-ras, CD44 and Tau genes (Auboeuf *et al.*, 2002; Honig *et al.*, 2002; Guil *et al.*, 2003; Camats *et al.*, 2008; Clark *et al.*, 2008; Kar *et al.*, 2011). There are now many reports indicating that these multifunctional proteins have important implications for cancer development, as recently reviewed (Janknecht, 2010; Fuller-Pace and Moore, 2011). For example, on one hand, as transcriptional coactivators of estrogen receptor alpha, they may contribute to the proliferative effect of estradiol on breast cancer cells (Wortham *et al.*, 2009; Dutertre *et al.*, 2010a) and, as coregulators of beta-catenin, they may contribute to the epithelial to mesenchymal transition, which has been associated with breast cancer progression (Yang *et al.*, 2006). On the other hand, as coactivators of p53 and Smad, *ddx5/ddx17* may exert tumor suppressor functions (Warner *et al.*, 2004; Bates *et al.*, 2005). However, oncogenic functions or tumor suppressor roles of *ddx5* and *ddx17* are still a matter of debate and could be context-dependent (Fuller-Pace and Moore, 2011).

In this work, we report that *ddx5* and *ddx17* have a dual role in the control of the pro-migratory NFAT5 transcription factor. First, *ddx5* and *ddx17* act as transcriptional coactivators of NFAT5 and are required for activating NFAT5 target genes involved in tumor cell migration. Second, at the splicing level, *ddx5* and *ddx17* favor the inclusion of the human NFAT5 exon 5 that contains a pre-mature translation termination codon, which then results in the synthesis of the unproductive (that is, not translated) NFAT5 mRNAs and in the reduction of the NFAT5 protein level. This dual activity of *ddx5* and *ddx17* may have a role in the fine regulation of the NFAT5 pathway and may contribute to the context-dependent role of *ddx5* and *ddx17* in cancer.

Results

Ddx5 and ddx17 are required for mediating the pro-migratory effect of NFAT5

Ddx5 and *ddx17* have been reported to be transcriptional coactivators of several key transcriptional factors, including estrogen receptor alpha, p53 and beta-catenin and are likely to have a role in tumor initiation and/or progression (Janknecht, 2010; Fuller-Pace and Moore, 2011). As *ddx17* has been co-purified with NFAT5 (Chen *et al.*, 2007), we tested whether *ddx17* and its paralog, *ddx5*, co-immunoprecipitate with NFAT5 in human MDA-MB-231 breast cancer cells. As shown on Figure 1a (left panel), FLAG-*ddx17* protein was specifically detected after the immunoprecipitation of a Myc-NFAT5 protein. Conversely, Myc-NFAT5 protein was specifically detected after the immunoprecipitation of FLAG-*ddx17* (right panel, Figure 1a). Likewise, Myc-NFAT5 protein was detected after the immunoprecipitation of endogenous *ddx5* protein (left panel, Figure 1b) or after the immunoprecipitation of a HA-*ddx5* protein (right panel, Figure 1b). Finally, immunoprecipitation of the endogenous NFAT5 protein, co-immunoprecipitate the endogenous *ddx5* protein but not when cells were first transfected with a siRNA targeting NFAT5 (Figure 1c).

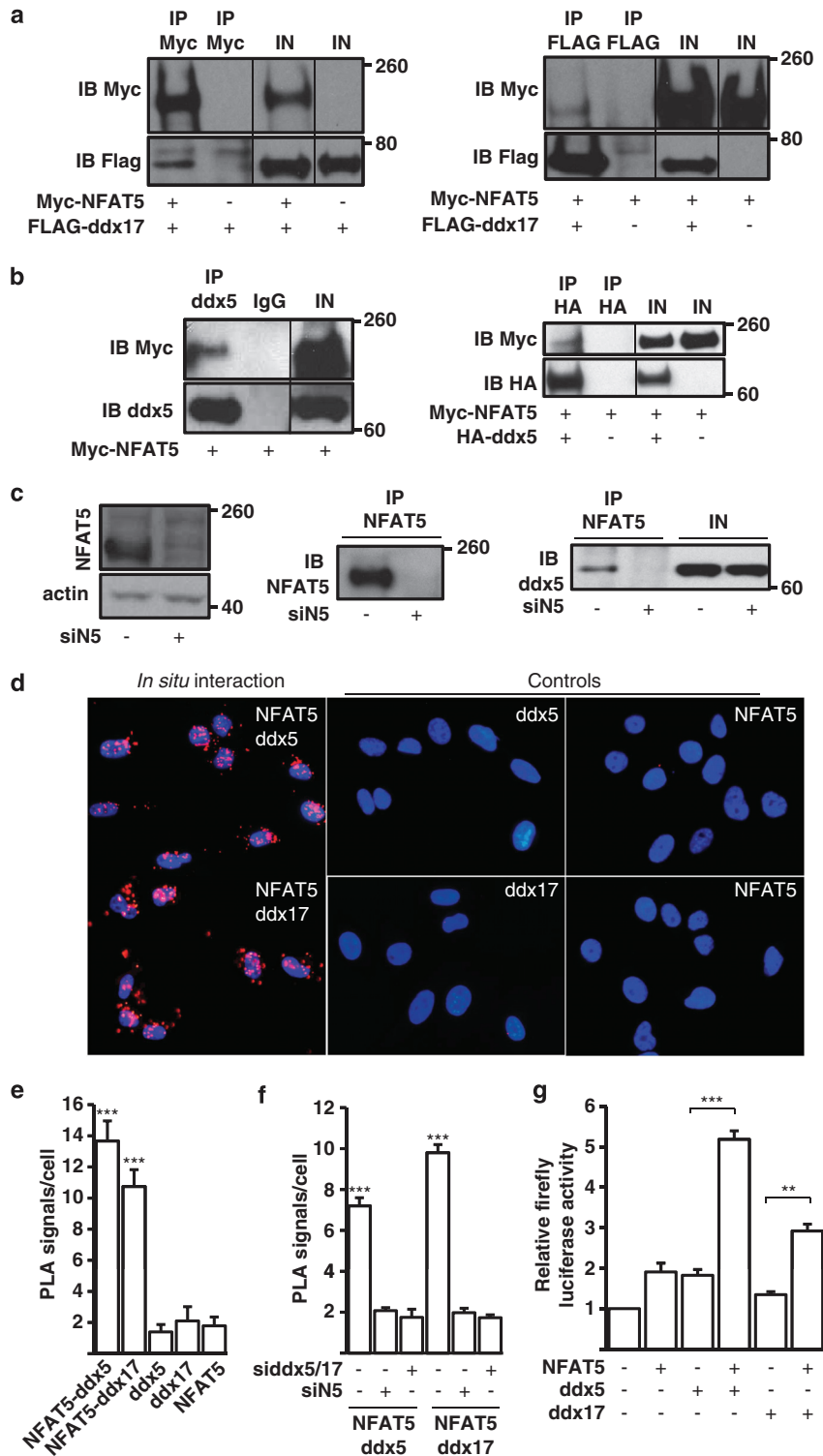
Because we could not immunoprecipitate endogenous *ddx17* with endogenous NFAT5 protein, the ability of endogenous NFAT5 protein to associate with endogenous *ddx17* and *ddx5* proteins was further assessed with the *in situ* proximity ligation assay (PLA), which generates a signal when two proteins are in close proximity (~40 nm) to each other. As shown on Figure 1d, prominent signals were detected in fixed MDA-MB-231 cells between anti-NFAT5 and anti-*ddx5*, and anti-NFAT5 and anti-*ddx17* antibodies but not in control experiments. Numbers of signals were on average of 14 per cells after incubation of anti-NFAT5 and anti-*ddx5* antibodies, and of 11 per cells after incubation of anti-NFAT5 and anti-*ddx17* antibodies (Figure 1e). Moreover, the number of signals markedly decreased in MDA-MB-231 cells after transfection with siRNAs targeting either NFAT5 or both *ddx5* and *ddx17* (Figure 1f).

In addition, the over-expression of *ddx5* and *ddx17* enhanced the transcriptional activity of NFAT5 as measured using a luciferase reporter gene driven by an NFAT5-responsive promoter suggesting that *ddx5* and *ddx17* are NFAT5 transcriptional co-activators (Figure 1g). To test further this hypothesis, we next analyzed the effect of *ddx5* and *ddx17* on NFAT5 pro-migratory function.

Indeed, it has been shown that NFAT5 is a transcriptional factor that stimulates cell migration (Jauliac *et al.*, 2002; O'Connor *et al.*, 2007). As expected, NFAT5 over-expression in MDA-MB-231 cells increased cell migration (Figure 2a), whereas NFAT5 depletion decreased it (Figure 2b). The depletion of either *ddx5* or *ddx17* had almost no effect on cell migration (Figure 2c). However, the depletion of either *ddx5* or *ddx17* further inhibited cell migration mediated by the decrease in NFAT5 expression level (Figure 2d,

Supplementary Figure S1). In addition, the depletion of both ddx5 and ddx17 strongly decreased cell migration (Figure 2e) and, finally, NFAT5 depletion did not inhibit cell migration in the absence of ddx5 and ddx17 (comparing lane 2 to lane 4, Supplementary Figure S2).

Collectively, these results suggest that ddx5 and ddx17 have a role in cell migration by co-activating NFAT5. To further test this hypothesis, the ddx5 and ddx17 effect on NFAT5 endogenous target genes was next investigated.



It has been reported that NFAT5 regulates the transcriptional activity of the S100A4 gene in a direct manner (Chen *et al.*, 2009, 2011). S100A4 or metastasin,

which is a member of the S100 family of calcium-binding proteins, has been shown to have an important role in breast cancer progression (Helfman *et al.*, 2005; Garrett

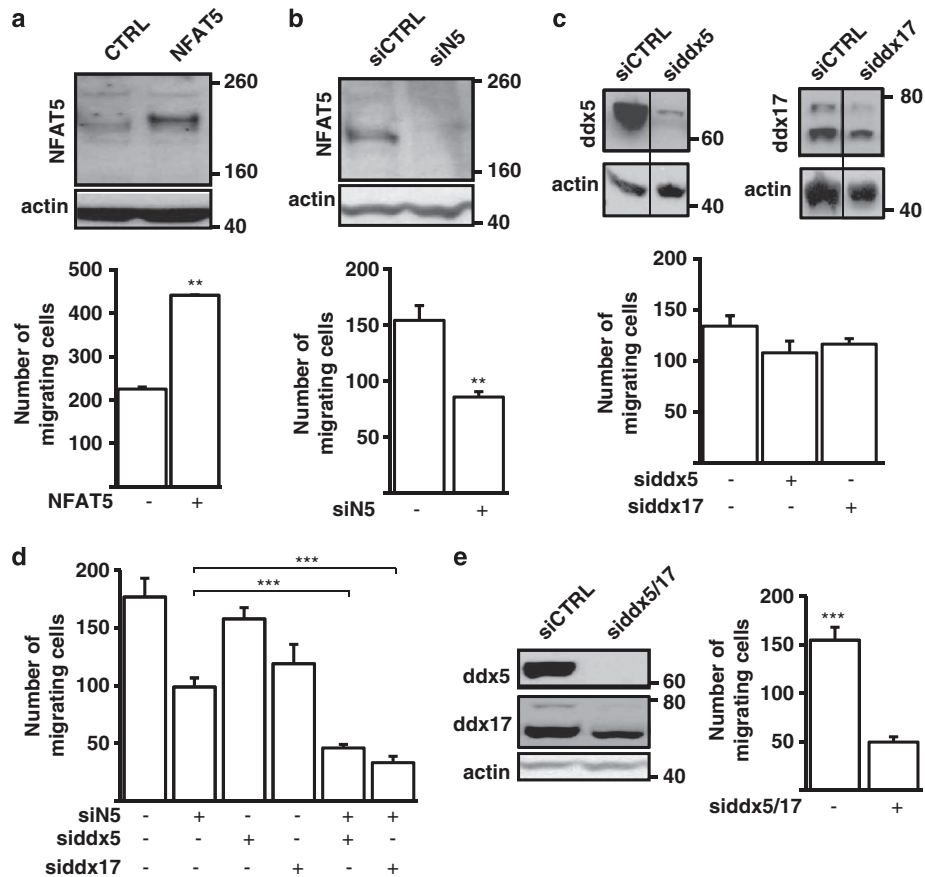


Figure 2 NFAT5 and ddx5/ddx17 have a role in cell migration. (a) WB analysis (upper panel) of NFAT5 and actin, as a control, 48 h after transfection of MDA-MB-231 cells with a control or NFAT5 expression vectors. Number of migrating cells (lower panel). (b) WB analysis (upper panel) of NFAT5 and actin 48 h after transfection of MDA-MB-231 cells with a control (siCTRL) or a siRNA targeting NFAT5 (siN5). Number of migrating cells (lower panel). (c) WB analysis (upper panel) of ddx5, ddx17 and actin, 48 h after transfection of MDA-MB-231 cells with a control siRNA or siRNAs targeting either ddx5 (siDDX5) or ddx17 (siDDX17). Number of migrating cells (lower panel). (d) Number of migrating MDA-MB-231 cells after transfection with a control siRNA, siRNAs targeting either ddx5 (siDDX5) or ddx17 (siDDX17) and/or a siRNA targeting NFAT5 (siN5). (e) WB analysis (left panel) of ddx5, ddx17 and actin, 48 h after transfection of MDA-MB-231 cells with a control siRNA or a single siRNA (siDDX5/17) targeting a conserved region in the ddx5 and ddx17 mRNAs. Number of migrating cells (right panel). Histograms represent the average of at least three independent experiments. Error bars represent s.e.m. (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Figure 1 ddx5 and ddx17 co-immunoprecipitate with NFAT5. (a) Protein immunoblot (IB) analysis of Myc-NFAT5 and FLAG-ddx17 in input (IN) or after immunoprecipitation (IP) with either Myc (left panel) or FLAG (right panel) antibodies. MDA-MB-231 cells were transfected with Myc-NFAT5 and/or FLAG-ddx17 expression vectors, as indicated. (b) Protein immunoblot (IB) analysis of endogenous ddx5 or HA-ddx5 and Myc-NFAT5 after IP with ddx5 and IgG (left panel) or HA (right panel) antibodies. MDA-MB-231 cells were transfected with Myc-NFAT5 expression vector (left panel) or with Myc-NFAT5 and/or HA-ddx5 expression vectors (right panel), as indicated. (c) Protein immunoblot (IB) analysis of endogenous NFAT5 after IP with NFAT5 antibody after transfection of MDA-MB-231 cells either with a control (siCTRL) or a siRNA targeting NFAT5 (siN5). Protein IB of ddx5 in the same conditions (left panel). (d) Detection of endogenous NFAT5-ddx5 and NFAT5-ddx17 complexes by *in situ* PLA. Fixed MDA-MB-231 cells were incubated either with antibodies against NFAT5, ddx5 and/or ddx17 as indicated. (e) Quantification of the number of PLA signals per cell as distinct fluorescent red spots in the experimental conditions described in panel D ($n > 50$ cells). (f) Quantification of the number of PLA signals per cell. After transfection with a control siRNA or siRNAs targeting either NFAT5 (siN5) or both ddx5 and ddx17 (siDDX5/17), fixed MDA-MB-231 cells were incubated either with antibodies against NFAT5 and ddx5 or antibodies against NFAT5 and ddx17 ($n > 50$ cells). (g) NFAT5-luciferase activity assay performed with MDA-MB-231 cells transfected with NFAT5-luc reporter gene, and with NFAT5, ddx5 and/or ddx17 expression vectors. Experiments are representative of at least three independent experiments. Error bars represent s.e.m. (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

et al., 2006). We have recently reported that lipocalin 2 (LCN2), which also plays a role in breast cancer progression (Yang *et al.*, 2009; Leng *et al.*, 2011), is regulated by NFAT transcriptional factors (Fougere *et al.*, 2010). As expected, the depletion of NFAT5 decreased the S100A4 and LCN2 mRNA levels (Figure 3a). In addition, chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay using NFAT5 antibody indicated that NFAT5 was bound to the S100A4 and LCN2 promoters (Figure 3b, Supplementary Figure S3), as expected (Chen *et al.*, 2009).

We next tested the role of *ddx5* and *ddx17* on the regulation of S100A4 and LCN2 genes. The depletion of both *ddx5* and *ddx17* decreased the S100A4 and LCN2 mRNA levels (Figure 3c). Furthermore, the sub-optimal depletion of NFAT5 together with *ddx5* and *ddx17* showed an additive effect (Figure 3d, Supplementary Figure S1). To test whether the observed effects were direct transcriptional effects, ChIP assay was performed after MDA-MB-231 transfection with either HA-*ddx5* or FLAG-*ddx17* expression vectors. Both *ddx5* and *ddx17* specifically bound to the S100A4 and LCN2 promoters and, importantly, NFAT5 depletion reduced their recruitment (Figures 3e and f). Together with the interaction and transactivation studies (Figure 1), these results demonstrate that *ddx5* and *ddx17* are *bona fide* transcriptional coactivators of the NFAT5 pro-migratory transcriptional factor.

Ddx5 and ddx17 regulate alternative splicing of the NFAT5 gene

We tested whether the effects of *ddx5/ddx17* depletion on cell migration and gene expression might be due to a decrease in NFAT5 protein level. Remarkably, *ddx5/ddx17* depletion in MDA-MB-231 cells did not decrease NFAT5 protein level, but instead strongly increased it (left panel, Figure 4a). Similar results were obtained in the human MCF-7 breast cancer cells (right panel, Figure 4a) and in the human HeLa cells (see below). We demonstrated that the protein detected by immunoblot with the NFAT5 antibody after *ddx5/ddx17* depletion was indeed NFAT5, by co-transfecting MDA-MB-231 cells with an siRNA targeting NFAT5 (Figure 4b). Therefore, the effects described above of *ddx5/ddx17* depletion on migration and NFAT5 target genes are clearly not explained by a decrease in NFAT5 protein level. In fact, the inhibition of NFAT5 target genes expression resulting from *ddx5/ddx17* depletion (Figure 3) despite the increase in NFAT5 protein level in these conditions (Figure 4a) is probably due to the requirement of *ddx5* and *ddx17* in mediating NFAT5 transcriptional effects (Figures 1 and 3).

We next analyzed the mechanisms by which *ddx5* and *ddx17* control NFAT5 expression level. Remarkably, the depletion of *ddx5* and *ddx17* did not affect the total NFAT5 mRNA level in any of the tested cell lines (Figure 4c). However, RT-PCR using primers in exons 3 and 6 that flank known alternative exons 4 and 5 (Dalski *et al.*, 2002; Maouyo *et al.*, 2002) revealed that *ddx5/ddx17* depletion in MDA-MB-231, HeLa and MCF-7 cells favored the shorter NFAT5 product that did not

contain exons 4 and 5 (E3/E6, Figure 4d). This result was further supported after sequencing the PCR products (not shown) and by quantifying NFAT5 splicing variants by RT-Quantitative (q)PCR. As expected from PCR results (Figure 4d), *ddx5/ddx17* depletion increased the splicing variants lacking exons 4 and 5 (E3/E6, Figure 4e), whereas decreasing the level of the splicing variants containing exon 5 (E5/E6, Figure 4e). The level of the splicing variants containing exon 4 but not exon 5 (E4/E6) was not affected in HeLa and MCF-7 cells and increased in the MDA-MB-231 cells (E4/E6, Figure 4e).

These results indicated that *ddx5/ddx17* depletion induced the skipping of exon 5 and this was confirmed by using primers that allowed to specifically quantify each splicing variant containing or not exon 5. Indeed, the level of exon 5 containing transcripts decreased after *ddx5/ddx17* depletion when compared with the level of transcripts that did not contain exon 5, either in the presence or in the absence of exon 4 (Figure 4f).

These data suggested that *ddx5/ddx17* depletion impacts on alternative splicing of the human NFAT5 exon 5. This possibility was first confirmed by using another set of siRNAs targeting the UTRs of *ddx5* or *ddx17* (siUTR*ddx5/17*) that indeed increased the level of NFAT5 splicing variants that did not contain exon 5 in HeLa cells (E3/E6 vs E5/E6 and E4/E6 vs E5/E6, Figure 5a). In addition, cell co-transfection with wild-type *ddx5* or *ddx17* cDNAs that do not contain UTR sequences and that are therefore not affected by siUTR*ddx5/17*, partially rescued the siUTR*ddx5/17* effect on NFAT5 splicing (Figure 5a). Importantly, mutated *ddx5* and *ddx17* cDNAs encoding proteins lacking the helicase activity did not rescue the splicing phenotype (Figure 5a). Furthermore, *ddx5* and *ddx17* depletion resulted in a strong increase in NFAT5 protein expression level in HeLa cells (Figure 5b), as observed in MDA-MB-231 and MCF-7 cells (Figure 4a); this was rescued by *ddx5* or *ddx17* over-expression (Figure 5b).

Going a step forward, we next tested whether *ddx5* and/or *ddx17* immunoprecipitate the NFAT5 pre-mRNA. HeLa cells were transfected either with HA-*ddx5* or FLAG-*ddx17* expression vectors or with the corresponding empty expression vectors as controls that did not affect NFAT5 pre-mRNA level (IN, Figure 5c). After formaldehyde-mediated crosslinking of HeLa cells, HA and FLAG antibodies immunoprecipitated NFAT5 pre-mRNA in the HA-*ddx5*- and FLAG-*ddx17*-transfected cells, respectively, but not in the control cells (Figure 5c). Similar results were obtained using inducible stable MCF-7 cells expressing HA-*ddx5* or FLAG-*ddx17* proteins (Figure 5d).

To further test the potential role of *ddx5* and *ddx17* in NFAT5 alternative splicing, a minigene containing the human NFAT5 exon 5 and about 200 nucleotides of the surrounding introns was generated (Figure 5e). As expected, *ddx5/ddx17* depletion in HeLa cells induced the skipping of the minigene exon 5 (Figure 5e). Furthermore, the over-expression of wild-type but not mutated *ddx5* and *ddx17* proteins in HeLa cells antagonized the splicing effect of *ddx5/ddx17* depletion

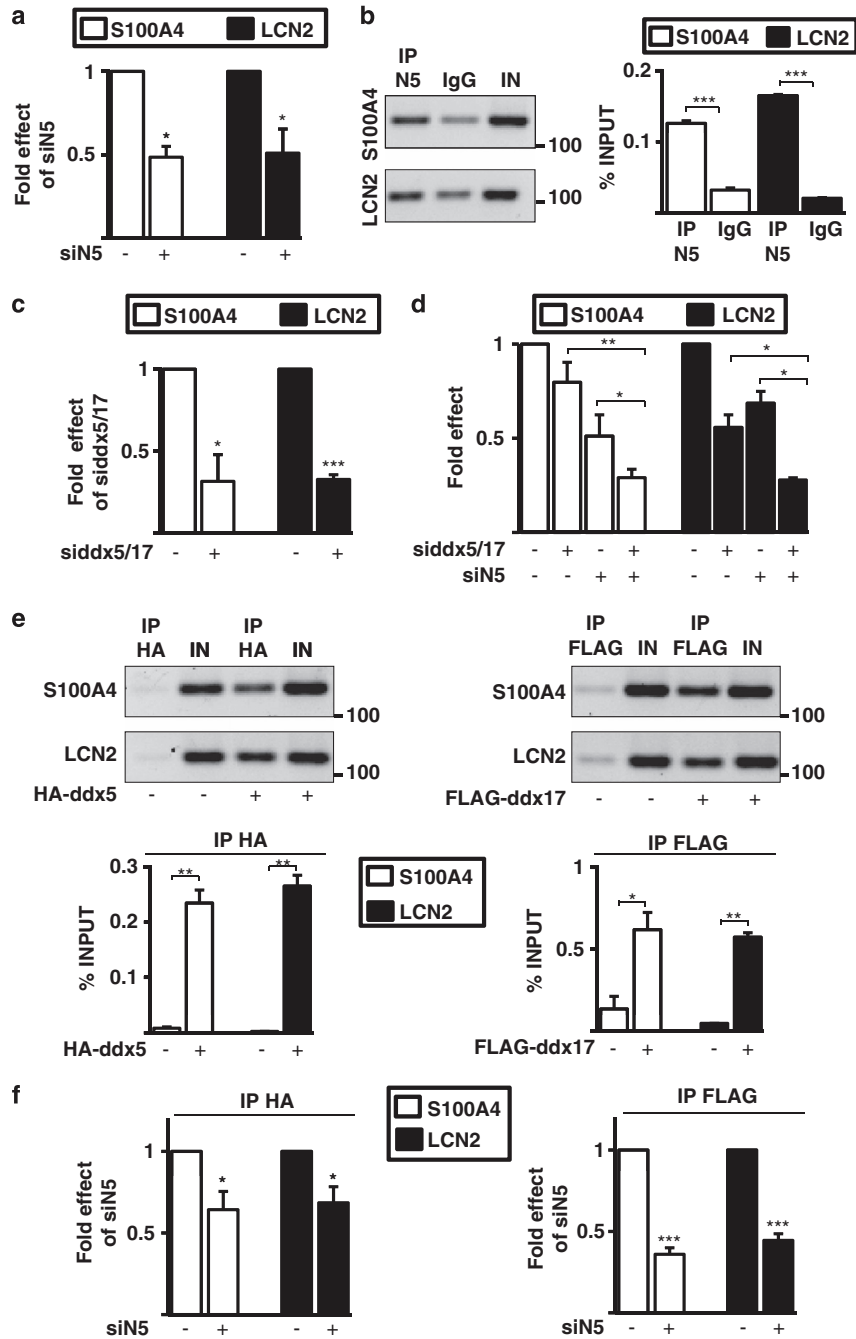


Figure 3 ddx5 and ddx17 regulate NFAT5 target genes. (a) RT-qPCR analysis of S100A4 and LCN2 mRNA levels after transfection of MDA-MB-231 cells with a control siRNA or siN5. (b) PCR and qPCR analysis with primers targeting S100A4 and LCN2 promoters after immunoprecipitation of NFAT5 (IP N5)-containing chromatin in MDA-MB-231 cells and compared with control IgG. (c) RT-qPCR analysis of S100A4 and LCN2 mRNA levels after transfection of MDA-MB-231 cells with a control siRNA or siddx5/17. (d) RT-qPCR analysis of S100A4 and LCN2 mRNA levels after transfection of MDA-MB-231 cells with a control siRNA, siN5 and/or siddx5/17. (e) PCR and qPCR analysis with primers targeting S100A4 and LCN2 promoters after immunoprecipitation of HA-ddx5 (IP HA) or FLAG-ddx17 (IP FLAG)-containing chromatin in MDA-MB-231 cells transfected with HA-ddx5 or FLAG-ddx17 expression vectors compared with MDA-MB-231 cells transfected with empty expression vectors. PCR gels are representative of at least three independent experiments. (f) qPCR analysis with primers targeting S100A4 and LCN2 promoters after the immunoprecipitation of HA-ddx5 (IP HA) or FLAG-ddx17 (IP FLAG)-containing chromatin in MDA-MB-231 cells transfected with HA-ddx5 or FLAG-ddx17 expression vectors and siN5 compared with MDA-MB-231 cells transfected with HA-ddx5 or FLAG-ddx17 expression vectors and a control siRNA. Histograms represent the average of at least three independent experiments. Error bars represent s.e.m. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

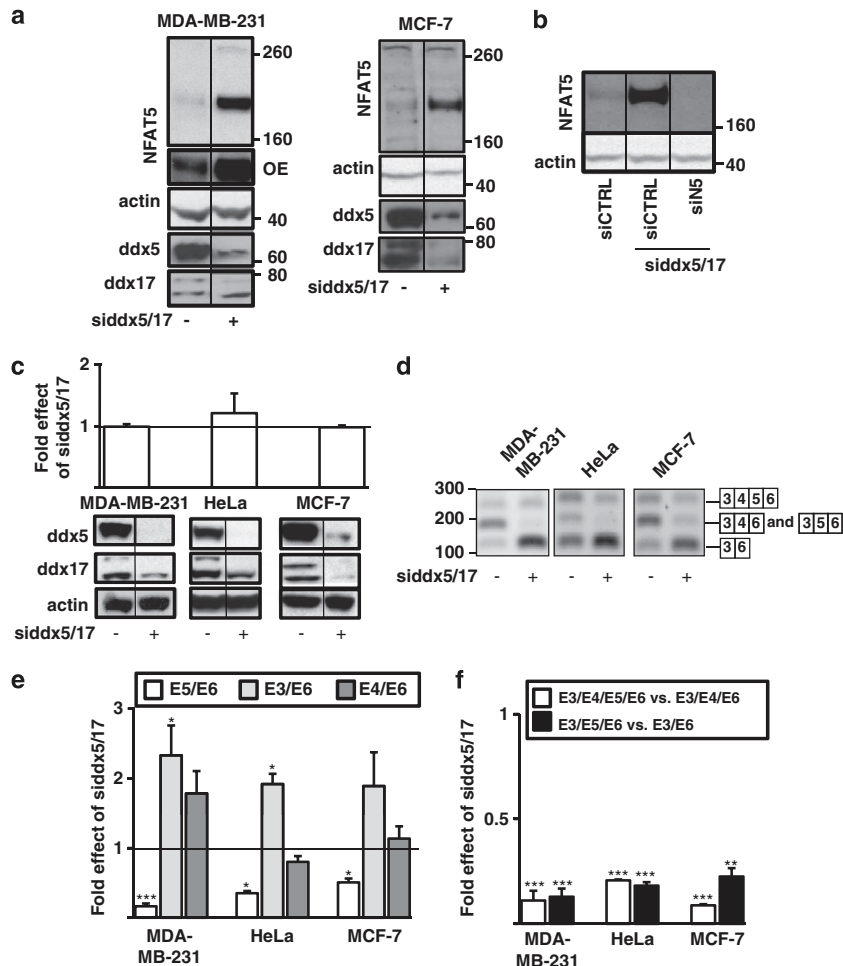


Figure 4 ddx5 and ddx17 control the expression level of NFAT5-splicing variants. **(a)** WB analysis of NFAT5, ddx5, ddx17 and actin, 48 h after transfection of human MDA-MB-231 and MCF-7 cells with a control siRNA or a siRNA targeting both ddx5 and ddx17 (siddx5/17). OE, over-exposed. **(b)** WB analysis of NFAT5 and actin, 48 h after transfection of human MDA-MB-231 cells with a control siRNA (siCTRL) or siddx5/17 and/or a siRNA targeting NFAT5 (siN5). **(c)** RT-qPCR of total NFAT5 transcripts (upper panel) and WB analysis (lower panel), 48 h after transfection of MDA-MB-231, HeLa and MCF-7 cells with a control siRNA or siddx5/17. **(d)** RT-qPCR analysis of NFAT5 transcripts using a forward primer in exon 3 and a reverse primer in exon 6 in the same experimental conditions as in panel C. **(e)** RT-qPCR analysis of NFAT5 transcripts, in the same experimental conditions as in panel C, using primers to amplify transcripts containing exon 5 (E5/E6), neither exon 5 nor exon 4 (E3/E6) or exon 4 alone (E4/E6). **(f)** RT-qPCR analysis of NFAT5 transcripts, in the same experimental conditions as in panel C, using primers to amplify transcripts containing exons 3, 4, 5 and 6 (E3/E4/E5/E6), transcripts containing exons 3, 4 and 6 (E3/E4/E6), transcripts containing exons 3, 5 and 6 (E3/E5/E6), or transcripts containing exons 3 and 6 only (E3/E6). Histograms represent the average of at least three independent experiments and represent the fold effect of the siRNA targeting ddx5 and ddx17 compared with a control siRNA. Error bars represent s.e.m. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

(Figure 5f). Similarly, the over-expression of wild-type ddx5 or ddx17 in MDA-MB-231 cells favored exon 5 inclusion in the minigene assay, whereas the over-expression of mutated ddx5 or ddx17 form induced exon 5 skipping (Figure 5g). Collectively, these results demonstrated that ddx5 and ddx17 favor NFAT5 exon 5 inclusion in an RNA helicase activity-dependent manner.

NFAT5 protein level is regulated by splicing coupled to NMD

On analyzing NFAT5 sequence, we observed that NFAT5 exon 5 contains two in-frame stop codons that are conserved during evolution (Figure 6a). This

suggested that NFAT5 transcripts containing this exon might be unproductive (that is, not-translated) transcripts and regulated by the NMD pathway. To test this hypothesis, MDA-MB-231 and HeLa cells were treated for 4 and 6 h with the translation inhibitor cycloheximide, which inhibits mRNA degradation by the NMD pathway that requires on-going translation. As shown on Figure 6b, cycloheximide treatment increased the level of the NFAT5 splicing variants containing exon 5 (E5/E6, Figure 6b). Therefore, the ratio of transcripts containing exon 5 to transcripts that do not contain exon 5 was increased by cycloheximide treatment in both MDA-MB-231 and HeLa cells (Figure 6c). Similarly, cell transfection with a siRNA targeting

UPF1, a major actor of the NMD pathway, increased by ~20 to 50% the ratio of transcripts containing exon 5 to transcripts that do not contain exon 5 in MDA-MB-231 cells (MDA-MB-231, Figure 6d). A stronger increase by ~100% was observed in HeLa cells (HeLa, Figure 6d). Therefore, the data described on Figures 5 and 6 indicated that the regulation by ddx5 and ddx17 of NFAT5 exon 5 inclusion coupled with NMD provides a means for regulating NFAT5 protein expression level.

To further test this model, siRNAs targeting either all NFAT5 splicing variants (siN5 targeting sequences in exons 7 and 9) or specifically the splicing variants containing human exon 5 (siE5) were generated. As expected, cell transfection with siN5 or siE5 decreased the global level of all NFAT5 transcripts (Total, Figure 6e) and the level of the splicing variants containing E5 (E5/E6, Figure 6e). As expected, siE5 did not affect the level of the transcripts that do not contain exon 5 in contrast to siN5 (E3/E6, Figure 6e), which demonstrated the specificity of the siE5 siRNA. More importantly, siN5, but not siE5, strongly decreased the NFAT5 protein level (Figure 6f). This result indicated that NFAT5 transcripts containing exon 5 did not significantly contribute to NFAT5 protein synthesis. This result was confirmed by using an other siRNA targeting NFAT5 exon 2 (siE2) that has also been shown to be alternatively spliced (Dalski *et al.*, 2002). Indeed, although siE2 had a similar effect to siE5 on the global NFAT5 mRNA level (Total, Figure 6e), siE2 but not siE5 decreased NFAT5 protein level (Figure 6g). Collectively, these results demonstrated that ddx5 and ddx17 decreased NFAT5 protein level by favoring exon 5 inclusion, which resulted in the synthesis of unproductive (that is, not translated) mRNAs.

Discussion

Ddx5 and ddx17 are two highly related RNA helicases that have been involved in several steps of the gene expression process (Fuller-Pace and Ali, 2008; Jan-knecht, 2010). In particular, ddx5 and ddx17 act as transcriptional coregulators of transcription factors like estrogen receptor alpha, p53 and beta-catenin that have important roles in cancer initiation and progression. Although the role of ddx5 and ddx17 in cancer cell proliferation has been reported, our data identified a role for ddx5/ddx17 in cell migration (Figure 2). This new function of ddx5 and ddx17 is likely to be mediated, at least in part, by the regulation of the expression of the S100A4 and LCN2 genes that are involved in tumor progression and that are target genes of the NFAT5 transcription factor (Figures 1 and 3), which itself is known to favor cell migration (Jauliac *et al.*, 2002).

Indeed, it has been shown that, in breast cancer, intracellular S100A4 can induce cell motility in part through its ability to interact with myosin-IIA and extracellular S100A4 can stimulate MMP-13 activity,

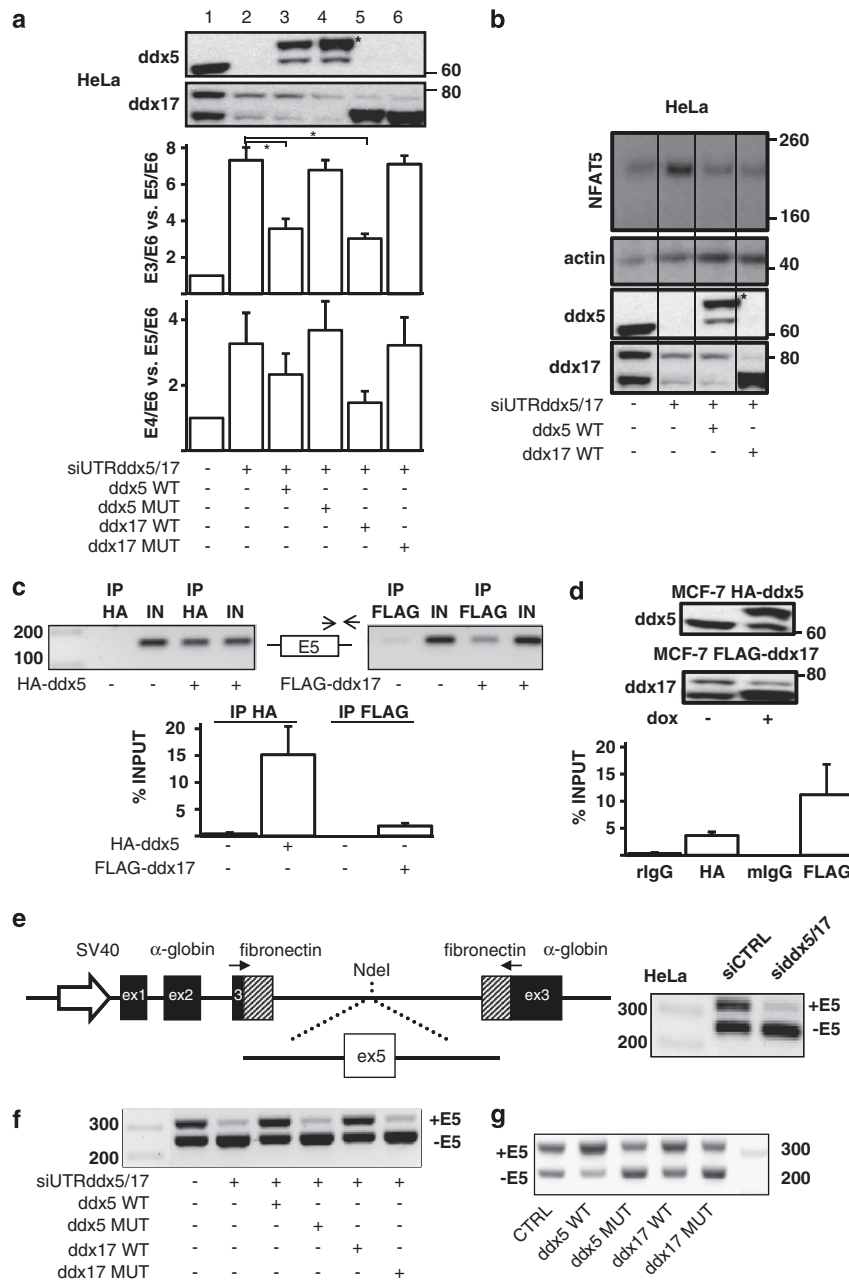
possibly contributing to tumor invasion (Garrett *et al.*, 2006; Li and Bresnick, 2006). Therefore, S100A4 can promote metastasis and crossing mice that overexpress S100A4 in the mammary epithelium with mouse models of metastasis dramatically increases the incidence of metastasis (Davies *et al.*, 1996). Finally, S100A4 expression is associated with a metastatic phenotype in multiple types of carcinoma, including breast cancer (Garrett *et al.*, 2006). Similarly, elevated levels of LCN2 expression have been reported in various cancers, including breast cancer. Remarkably, there is a strong association between LCN2 and metastasis (Yang *et al.*, 2009). LCN2 is a member of the lipocalin family composed of small extracellular proteins that transport and present ligands to cell surface receptors, and form macromolecular complexes, thus playing important roles in cell regulation, proliferation and differentiation (Flower, 1994). LCN2 can enhance tumor growth and metastasis by protecting matrix metalloproteinase-9 from degradation and by increasing angiogenesis and/or by promoting the epithelial to mesenchymal transition, which is associated with breast cancer progression (Leng *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009). Therefore, this study identified a novel gene regulatory pathway (NFAT5 stimulation of S100A4 and LCN2 genes) that is coactivated by ddx5/ddx17 and that, together with previously reported ddx5 and ddx17 target genes like cyclin D1 and Snail (Shin *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2007; Carter *et al.*, 2010), strengthens the role of ddx5 and ddx17 in tumor progression.

We also demonstrated that ddx5 and ddx17 regulate NFAT5 pre-mRNA splicing in addition to acting as NFAT5 transcriptional coactivators. Indeed, ddx5 and ddx17 splicing activity, relying on their helicase activity, favored the inclusion of the human NFAT5 exon 5 (Figures 4 and 5). To the best of our knowledge, this is the first demonstration that a transcriptional coregulator modulating the activity of a transcriptional factor can also control its expression at the splicing level. It must be underlined that ddx5, that coactivates p53, has been shown to selectively regulate the expression of the delta133p53 isoform (Moore *et al.*, 2010). However, this isoform is not generated by alternative splicing but by transcription from an internal promoter in intron 4 of the p53 gene. Remarkably, the effect of ddx5 and ddx17 on NFAT5 splicing has a very important role in NFAT5 protein expression level. Indeed, ddx5 and ddx17 favored the inclusion of the NFAT5 exon 5, which generated unproductive transcripts that were not translated (Figure 6). Interestingly NFAT5 exon 5 is one of the 111 'ultraconserved elements' identified in human protein-coding genes (Bejerano *et al.*, 2004; McGlincy and Smith, 2008). It has been reported that many ultraconserved elements are associated with exons inducing NMD ((Bejerano *et al.*, 2004; McGlincy and Smith, 2008). In this context, the ddx5/ddx17 effect on NFAT5 expression was observed in different human cell lines (Figure 4) as well as in a mouse cell line (Supplementary Figure S4). Collectively, these observations strengthen the key role of exon 5 in NFAT5 gene expression regulation. However, we cannot exclude that,

in some cellular contexts, the NFAT5 mRNA bearing exon 5 may escape NMD. However, many reports have indicated that NFAT5 protein level is tightly regulated, particularly during differentiation and in response to hyper-osmotic stresses (Woo *et al.*, 2000; Ferraris *et al.*, 2002). It has been shown that NFAT5 protein level is regulated by several mechanisms involving protein stability and miRNA-mediated mRNA silencing (Dahl *et al.*, 2001; Irarrazabal *et al.*, 2010; Levy *et al.*, 2010). We now report that NFAT5 protein level can also be regulated by the coupling of splicing to the NMD pathway (Figures 4, 5 and 6). It will be interesting to test whether this ddx5/ddx17-dependent mechanism is in-

involved in NFAT5 protein level regulation in hyper-osmotic conditions. Similarly, NFAT5 protein level is regulated during development and NFAT5 has a role in muscle differentiation (O'Connor *et al.*, 2007). As ddx5 and ddx17 also have a role in muscle differentiation (Carette *et al.*, 2006), it will be interesting to test the interplay between NFAT5 and ddx5/ddx17 in muscle development.

In conclusion, our data indicate that, on one hand, ddx5 and ddx17 transcriptional activity enhances NFAT5-mediated effects and, on the other hand, ddx5- and ddx17-splicing activity decreases NFAT5 protein level. These dual functions of ddx5 and ddx17



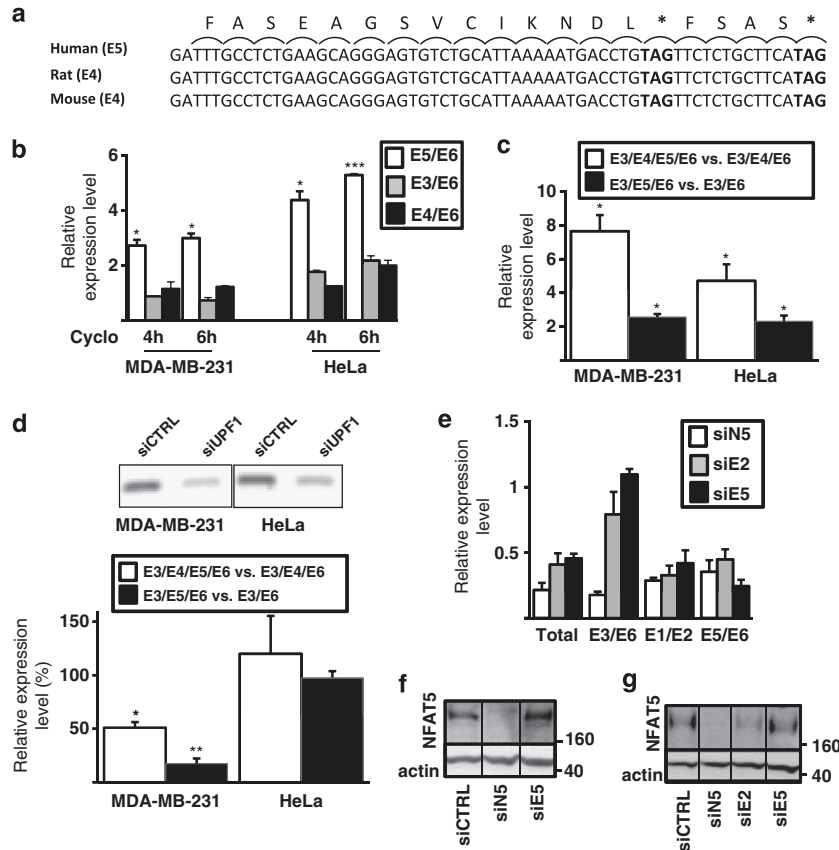


Figure 6 Regulation of NFAT5 protein level by coupling alternative splicing and the NMD pathway. (a) Conservation during evolution of the human NFAT5 exon 5 sequence bearing two in-frame stop codons (*). (b) RT-qPCR analysis of splicing variants containing exon 5 (E5/E6), none of exon 4 and exon 5 (E3/E6), or exon 4 alone (E4/E6) after 4 and 6 h of cycloheximide treatment (10 µg/ml) in MDA-MB-231 and HeLa cells. (c) RT-qPCR analysis of NFAT5 transcripts after 6 h of cycloheximide treatment using primers to amplify transcripts containing exons 3, 4, 5 and 6 (E3/E4/E5/E6), transcripts containing exons 3, 4 and 6 (E3/E4/E6), transcripts containing exons 3, 5, and 6 (E3/E5/E6), or transcripts containing exons 3 and 6 (E3/E6). (d) RT-PCR using UPF1 specific primers (upper panel) and RT-qPCR (lower panel) as described in panel C after transfection of MDA-MB-231 and HeLa cells with a control siRNA (siCTRL) or a siRNA targeting UPF1 (siUPF1). Data are represented as % of increase measured in three independent experiments. (e) RT-qPCR analysis of all NFAT5 mRNAs (Total), splicing variants containing none of exon 4 and exon 5 (E3/E6), splicing variants containing exon 2 (E1/E2) or exon 5 (E5/E6) after transfection of MDA-MB-231 cells with a control siRNA, siN5 targeting all NFAT5 splicing variants, siE2 targeting the NFAT5 splicing variants containing exon 2 or siE5 targeting the NFAT5 splicing variants containing exon 5. (f) WB analysis of NFAT5 and actin 48 h after transfection of MDA-MB-231 cells with a control siRNA (siCTRL), siN5 or siE5. (g) WB analysis of NFAT5 and actin 48 h after transfection of MDA-MB-231 cells with a control siRNA (siCTRL), siN5, siE2 or siE5. WBs and PCR gels are representative of at least three independent experiments. Histograms represent the average of at least three independent experiments. Error bars represent s.e.m. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

Figure 5 Regulation of NFAT5 alternative splicing by ddx5 and ddx17. (a) WB analysis of ddx5 and ddx17 after transfection of HeLa cells with a control siRNA or siRNAs targeting ddx5 or ddx17 UTRs (siUTRddx5/17) together with control expression vectors or wild-type ddx5 (ddx5 WT), wild-type ddx17 (ddx17 WT), mutated ddx5 (ddx5 MUT), or mutated ddx17 (ddx17 MUT) expression vectors (upper panel). Tagged ddx5 protein is marked by an asterisk. RT-qPCR analysis of NFAT5 transcripts, in the same experimental conditions as described above, using primers to amplify transcripts containing exon 5 (E5/E6), none of exon 5 and exon 4 (E3/E6) or exon 4 alone (E4/E6). Histograms represent the average of the E3/E6 to E5/E6 ratio and the E4/E6 to E5/E6 ratio obtained in three independent experiments. (b) WB analysis of NFAT5, ddx5, ddx17 and actin, 48 h after transfection of HeLa cells with a control siRNA or siRNAs targeting ddx5 or ddx17 UTRs (siUTRddx5/17) together with control expression vectors or wild-type ddx5 or ddx17 expression vectors. (c) RT-PCR and RT-qPCR analysis of NFAT5 pre-mRNAs precipitated using HA or FLAG antibodies after transfection of HeLa cells with HA-ddx5, FLAG-ddx17 or empty expression vectors. Histograms correspond to the average level of precipitated NFAT5 pre-mRNA compared with the input obtained in three independent experiments. (d) WB analysis of HA-ddx5 and Flag-ddx17 in the presence or absence of doxycycline using inducible MCF-7/Tet-On stable cell lines. RT-qPCR analysis of NFAT5 pre-mRNAs precipitated using HA, FLAG or control (IgG) antibodies after induction by doxycycline (dox) of HA-ddx5 or FLAG-ddx17 expression in stable MCF-7 cell lines. Histograms correspond to the average level of precipitated NFAT5 pre-mRNA compared with the input obtained in three independent experiments. (e) Schematic representation of the NFAT5 exon 5 minigene (left panel). RT-PCR analysis using primers in the minigene exons indicated by arrows on the left panel, after HeLa cells transfection with a control siRNA (siCTRL) or siN5/ddx17 (right panel). (f) RT-PCR using primers in the minigene exons after transfection of HeLa cells in the same experimental conditions as described in panel A. (g) RT-PCR using primers in the minigene exons after transfection of MDA-MB-231 cells with the minigene together with wild-type or mutated ddx5 or ddx17 expression vectors. WBs and PCR gels are representative of at least three independent experiments. Histograms represent the average of at least three independent experiments. Error bars represent s.e.m.

probably have an important role that is conserved during evolution in the NFAT5 pathway (Supplementary Figure S4). Increasing the level of ddx5/ddx17 would enhance NFAT5-mediated pro-migratory effects and would be antagonized by a decrease in NFAT5 protein level mediated by ddx5-and ddx17-splicing activity. Meanwhile, decreasing the level of ddx5/ddx17 would increase NFAT5 protein level but repress the expression level of ddx5/ddx17-dependent NFAT5 target genes like S100A4 and LCN2. Interestingly, all NFAT5 target genes might not be ddx5/ddx17-dependant genes. Indeed, among the tested NFAT5 target genes, we observed that the *SMIT* (sodium/myo-inositol cotransporter) gene, a known NFAT5 target gene was downregulated after NFAT5 depletion, but upregulated after ddx5/17 depletion, likely owing to the increase in NFAT5 protein level (Supplementary Figure S5). Even though the interplay between ddx5/ddx17 and the NFAT5-signaling pathway is likely complex, ddx5 and ddx17 seem to have a critical role in the regulation of a subset of NFAT5 target genes involved in cell migration as ddx5/ddx17 depletion inhibited this process (Figure 2). The precise and respective role of ddx5 and ddx17 in the NFAT5 pathway will also require further experiments. Indeed, we systematically observed that the co-depletion of ddx5 and ddx17 had a stronger effect on NFAT5 pathway and *NFAT5* gene expression regulation than the depletion of either ddx5 or ddx17 alone (Figure 2; Supplementary Figures S6 and S7). Even though these results suggest that ddx5 and ddx17 have similar activities, the data obtained could be explained either by ddx5 and ddx17 having full redundant functions when co-expressed in cells (meaning that they work together in the same complexes) or by their replacement by each other when one or the other is missing.

Finally, it is interesting to integrate the dual impact of ddx5 and ddx17 on the pro-migratory NFAT5 transcription factor in the context of the known role of ddx5 and ddx17 in cancer. Indeed, although there are increasing evidences that these proteins have an important role in cancer, their effects are likely to be context-dependent, as recently reviewed (Fuller-Pace and Moore, 2011). Ddx5 and ddx17 have been reported to have either oncogenic functions or tumor cosuppressor roles (Fuller-Pace and Moore, 2011). One intriguing possibility is that, depending on the cellular context, ddx5/ddx17-splicing activity or their transcriptional activity could dominate each other and this could participate in the dual function of ddx5 and ddx17 in cancer. In this context, several reports have indicated that the splicing and transcriptional activities of ddx5 and ddx17 can be modulated by different post-translational modifications that depend on cellular signaling pathways (Yang *et al.*, 2006, 2007; Jacobs *et al.*, 2007; Carter *et al.*, 2010; Mooney *et al.*, 2010a, b). In addition, several post-translational modifications of ddx5 or ddx17 have been shown to be altered in different cancers (Causevic *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2005). Therefore, different cellular signaling pathways activated in different cellular contexts may favor one of the molecular functions of ddx5 and ddx17, which could

have different impact on cell behavior and tumor progression.

Materials and methods

Cell culture, plasmid constructions and stable cell lines

Cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% glutamine, 1% penicillin and streptomycin antibiotics and 4,5 g/l glucose (HeLa, MCF-7) or 1 g/l glucose (MDA-MB-231). HA-ddx5 and FLAG-ddx17 were cloned in pTRE2-hyg vector to generate inducible MCF-7/Tet-On stable cell lines (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France). Resistant clones were selected with hygromycin (300 µg/ml, Clontech) and protein expression was checked after doxycycline treatment (1 µg/ml). NFAT5 exon 5 with 245 and 173 bp of flanking introns was amplified by PCR with primers containing *NdeI* restriction site: NFAT5_{in4S} (GGAATTCC ATATGGAATCCCCTACCACTCCAGC) and NFAT5_{in5AS} (GGAATTCCATATGGAATTCCTTTATTGCCTCA GC). *NdeI*-digested PCR product was cloned into pTB minigene. Primers used for minigene assay are: pTBalpha (CAACTTCAAGCTCCTAAGCCACTGC) and pTBbra (GGTACCAGGAAGTTGGTTAAATCA).

Cell transfection

Cells were transiently transfected with siRNAs (Table 1) at a final concentration of 26.6 nM (except in Figure 3d, 10 nM siDDX5/17 and 20 nM siN5) using RNAiMax (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Cells were harvested 48 h after transfection. Transfections were performed using Lipofectamine LTX (Invitrogen) in immunoprecipitation and minigene assays. HeLa cells were plated and transfected with siRNAs targeting ddx5 and ddx17 UTRs and transfected 24 h later with siRNAs and expression vectors using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in rescue experiments.

RNA, RT-PCR and RT-qPCR

Total RNAs were extracted using TRIzol (Invitrogen). 1 µl of Glycoblue (Ambion/Applied Biosystems, Austin, TX, USA) was added before RNA precipitation with isopropanol. RNAs (1 µg) were treated with DNase I (DNAfree, Ambion) 30 min at 37 °C and reverse-transcribed using SuperScript II and random primers (Invitrogen). Before performing PCR, all RT reaction mixtures were diluted to contain 2.5 ng/µl of initial RNA. PCRs were performed using 5 µl of the diluted cDNAs and GoTaq polymerase (Promega, Madison, WI, USA). qPCR was performed using 2.5 µl of the diluted cDNAs and SYBR Green I Master mix on a LightCycler (Roche, Mannheim, Germany). Primer sequences are provided in Table 1. The relative amounts of mRNAs were determined on the basis of the threshold cycle for each PCR product (C_t) and were normalized with Actin RNA levels (CCTCCCTGG AGAAGAGCTA; CCAGACAGCACTGTGTTGG). Primers used to analyze S100A4 and LCN2 were: S100A4-E2S (GATG TGATGGTGTCCACCTTC); S100A4-E3AS (GTACTCTTG GAAGTCCACCTC); LCN2-E2S (GGTAGGCTGGCAGGG AATG); LCN2-E3AS (CTTAATGTTGCCAGCGTGAAC). Primers used to analyze NFAT5 splicing were: NFAT5-E3S2 (AATGAGTCAGACAAGCGGTG) and NFAT5-E6AS2 (TGGAAGAGGTGGTAAAGGAG). Primers used to analyze UPF1 were: UPF1-S (ACACCAAGCTCTACCAAGGAG) and UPF1-AS (ACAATGATGACGCCATACCTTG).

Western blot (WB)

Protein extracts were obtained using NP-40 buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 0.4 M NaCl, 5 mM EDTA pH 8, 1% NP40,

Table 1 Sequences of the siRNAs and primers used to quantify NFAT5 mRNAs by qPCR

SiRNAs	Sequences	
siCTRL	CGUACGCGGAAUACUUCGAdTdT	
siddx5/17	GGCUAGAUGUGGAAGAUGUdTdT	
siUTRddx5	AACCGCAACCAUUGACGCCAUdTdT	
siUTRddx17	UCAUGCAGAUUAGUUAGAAdTdT; CAGCAGACUUAUU ACAUUdTdT	
siN5	GAAAGGAGCUGAAGAUAGUdTdT; GUAGGGAUUAUGAA AUUGAdTdT	
siE2	GUUACACCCAUCACAGAAUdTdT; GAAUUUCAUAGAG CUGGAdTdT	
siE5	GACCUGUAGUUCUCUGCUUdTdT; GCAGGGAGUGUCU GCAUUAdTdT	
Primers	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')
Total human NFAT5	AGTGGACATTGAAGGCACTAC	TTGGAACCAGCAATTCCTATTC
E5/E6	GATTTGCCTCTGAAGCAGGG	CATAGCCTTGCTGTCGGTGAC
E3/E6	AGCTGTTGTTGCTGCTGATGC ^a	CATAGCCTTGCTGTCGGTGAC
E4/E6	CTGCATTCTCATGTGCATGATCC	GGGAGCTGAAGAAGCATCCTT ^a
E3/E4/E5/E6	AGCTGTTGTTGCTGCTGGGA ^a	GGGAGCTGAAGAAGCATCTAT ^a
E3/E5/E6	AGCTGTTGTTGCTGCTGGATT ^a	GGGAGCTGAAGAAGCATCTAT ^a
E1/E2	GATGCCCTCGACTTCATCTC	CTGTGATGGGTGTAACCTCAGAG
Total mouse NFAT5	GTGGACATTGAAGGTACCAC	CTTCAACATCGGCATTCCTC
+mE4	GATTTGCCTCTGAAGCAGGG	CATAGCCTTGCTGTCGGTGAC
–mE4	AGCTGTAGTTGCTGCTGATGC ^a	CATAGCCTTGCTGTCGGTGAC

^aPrimers overlapping two exons.

0.2% SDS, 1 mM DTT) and protease inhibitors (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). 20 µg of proteins were analyzed by WB. Used antibodies were: NFAT5 (PA1-023, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA), DDX5 (ab10261, Abcam, Cambridge, MA, USA), DDX17 (ab24601 and ab52826 for the *in situ* PLA, Abcam), c-Myc (9E10, sc-40, Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), Anti-FLAG M2 (Sigma Aldrich), Anti-HA (3F10, Roche) or Actin (I19, sc-1616, Santa-Cruz Biotechnology) antibodies.

Co-immunoprecipitation

MDA-MB-231 cells were lysed 24 h after transfection in buffer containing 50 mM Tris–HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1 mM PMSF, protease and phosphatase inhibitors (Sigma). Cleared cell extracts were incubated overnight with 4 µg of antibodies bound to protein G magnetic beads (Invitrogen). The protein-bound magnetic beads were washed three times with PBS1X, resuspended in loading buffer before WB analysis. Inputs correspond to 5% volume of the cleared cell lysates.

In situ PLA

The *in situ* PLA was conducted using the Duolink II Kit (Olink Bioscience, Uppsala, Sweden) according to the manufacturer's instructions. Proximity ligation signals were detected with a Zeiss fluorescence microscope (63× objective) and images were processed with ImageJ software program.

Luciferase assay

The osmotic stress-responsive luciferase reporter plasmid ORE Luc, which incorporates 132 bp of the human aldose reductase gene enhancer containing three consensus binding sites for NFAT5, was made by PCR amplifying genomic DNA (5'-TTACATGGAAAAATATCTGGGCTAG-3'; 5'-CTGGTAGTGACTCAAGCAC-3') and cloning the resulting PCR fragment 5' of the minimal SV40 promoter in the luciferase reporter plasmid pGL3 (Promega) (Lopez-Rodriguez *et al.*,

2001). MDA-MB-231 were plated in 10-cm plates and transfected with firefly luciferase reporter gene (3 µg), renilla luciferase control plasmid (100 ng), NFAT5 (4 µg), ddx5 and ddx17 expression vectors (2 µg). After 24 h, cells were plated in 6-well plates in triplicates. Harvested cells were lysed with lysis buffer 5X to measure firefly and renilla luciferase activities using Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega).

ChIP and RNA-ChIP

Cells were cross-linked with 1% formaldehyde for 10 min and lysed in buffer containing 50 mM Tris–HCl pH 7.5, 150 mM KCl, 5 mM EDTA, 1% NP40, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 50 mM sodium fluoride, phosphatase and protease inhibitors. Chromatin was sheared by sonication with Bioruptor (Diagenode, Liège, Belgium) to generate ~200-bp DNA fragments and incubated with antibodies and magnetic beads overnight at 4 °C. Beads were washed five times with buffer containing 50 mM Tris–HCl pH7.5, 150 mM KCl, 1% NP40 and 0.25% sodium deoxycholate, and two times with TE buffer. Antibody-bound chromatin was reverse-crosslinked overnight at 65 °C and treated with proteinase K (Qiagen, Valencia, CA, USA) before DNA purification on column (Qiagen). Purified DNA was diluted three times in water and analyzed by PCR using the following primers: hS100A4-pS1 (CAGAGTCCTGCCCTCAAGGAA); hS100A4-pA1 (TCTCCGTGGTCAATCCCATC); hLCN2-pS1 (CCCA TGCAAGGAGGGAAATC); and LCN2-pA1 (CCTCATGGG AGGTGGTGTG). RNA-ChIP was performed using NFAT5-E5S2 (TTGCCCTCTGAAGCAGGGAGTG) and NFAT5-I5AS (ATGCTGGTGGTCCACATTCAA) primers as previously described (Bittencourt *et al.*, 2008).

Migration assay

Cells were transfected with NFAT5 and β-Gal constructs (1 µg) or with siRNAs (siNFAT5, siddx5/17, siddx5, siddx17). Migration assay was performed as previously described (Jauliac *et al.*, 2002).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank S Kato and J Marie for providing wild-type and mutant ddx5 and ddx17 expression vectors. We thank

Emanuele Buratti for providing pTB minigene construct. We thank Coralie Poulard and Muriel Le Romancer-Cherifi for their help with PLA. This work was supported by EC (NoE EURASNET), Institut National du Cancer, Association pour la Recherche sur le Cancer, Ligue Nationale Contre le Cancer and Agence Nationale de la Recherche. S Germann, B Gaudineau and M Fougère were supported by Association pour la Recherche sur le Cancer; L Gratadou by Agence Nationale de la Recherche; E Zonta by the French Ministry of Education; E Dardenne by Ligue Nationale Contre le Cancer.

References

- Allemand E, Batsche E, Muchardt C. (2008). Splicing, transcription, and chromatin: a menage a trois. *Curr Opin Genet Dev* **18**: 145–151.
- Auboeuf D, Batsche E, Dutertre M, Muchardt C, O'Malley BW. (2007). Coregulators: transducing signal from transcription to alternative splicing. *Trends Endocrinol Metab* **18**: 122–129.
- Auboeuf D, Honig A, Berget SM, O'Malley BW. (2002). Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators. *Science* **298**: 416–419.
- Ayers M, Symmans WF, Stec J, Damokosh AI, Clark E, Hess K *et al.* (2004). Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* **22**: 2284–2293.
- Baksh S, Widlund HR, Frazer-Abel AA, Du J, Fosmire S, Fisher DE *et al.* (2002). NFATc2-mediated repression of cyclin-dependent kinase 4 expression. *Mol Cell* **10**: 1071–1081.
- Barbier J, Dutertre M, Bittencourt D, Sanchez G, Gratadou L, de la Grange P *et al.* (2007). Regulation of H-ras splice variant expression by cross talk between the p53 and nonsense-mediated mRNA decay pathways. *Mol Cell Biol* **27**: 7315–7333.
- Bates GJ, Nicol SM, Wilson BJ, Jacobs AM, Bourdon JC, Wardrop J *et al.* (2005). The DEAD box protein p68: a novel transcriptional coactivator of the p53 tumour suppressor. *Embo J* **24**: 543–553.
- Bejerano G, Pheasant M, Makunin I, Stephen S, Kent WJ, Mattick JS *et al.* (2004). Ultraconserved elements in the human genome. *Science* **304**: 1321–1325.
- Bittencourt D, Dutertre M, Sanchez G, Barbier J, Gratadou L, Auboeuf D. (2008). Cotranscriptional splicing potentiates the mRNA production from a subset of estradiol-stimulated genes. *Mol Cell Biol* **28**: 5811–5824.
- Blencowe BJ. (2003). Splicing regulation: the cell cycle connection. *Curr Biol* **13**: R149–R151.
- Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI. (2007). Cellular response to hyperosmotic stresses. *Physiol Rev* **87**: 1441–1474.
- Camats M, Guil S, Kokolo M, Bach-Elias M. (2008). P68 RNA helicase (DDX5) alters activity of cis- and trans-acting factors of the alternative splicing of H-Ras. *PLoS One* **3**: e2926.
- Caretti G, Schiltz RL, Dilworth FJ, Di Padova M, Zhao P, Ogrzyzko V *et al.* (2006). The RNA helicases p68/p72 and the noncoding RNA SRA are coregulators of MyoD and skeletal muscle differentiation. *Dev Cell* **11**: 547–560.
- Carter CL, Lin C, Liu CY, Yang L, Liu ZR. (2010). Phosphorylated p68 RNA helicase activates Snai1 transcription by promoting HDAC1 dissociation from the Snai1 promoter. *Oncogene* **29**: 5427–5436.
- Causevic M, Hislop RG, Kernohan NM, Carey FA, Kay RA, Steele RJ *et al.* (2001). Overexpression and poly-ubiquitylation of the DEAD-box RNA helicase p68 in colorectal tumours. *Oncogene* **20**: 7734–7743.
- Chang YF, Chan WK, Imam JS, Wilkinson MF. (2007). Alternatively spliced T-cell receptor transcripts are up-regulated in response to disruption of either splicing elements or reading frame. *J Biol Chem* **282**: 29738–29747.
- Chen M, Sastry SK, O'Connor KL. (2011). Src kinase pathway is involved in NFAT5-mediated S100A4 induction by hyperosmotic stress in colon cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **300**: C1155–C1163.
- Chen M, Sinha M, Luxon BA, Bresnick AR, O'Connor KL. (2009). Integrin alpha6beta4 controls the expression of genes associated with cell motility, invasion, and metastasis, including S100A4/metastasin. *J Biol Chem* **284**: 1484–1494.
- Chen Y, Schnetz MP, Irrarazabal CE, Shen RF, Williams CK, Burg MB *et al.* (2007). Proteomic identification of proteins associated with the osmoregulatory transcription factor TonEBP/OREBP: functional effects of Hsp90 and PARP-1. *Am J Physiol Renal Physiol* **292**: F981–F992.
- Chuvpilo S, Jankevics E, Tyrsin D, Akimzhanov A, Moroz D, Jha MK *et al.* (2002). Autoregulation of NFATc1/A expression facilitates effector T cells to escape from rapid apoptosis. *Immunity* **16**: 881–895.
- Clark EL, Coulson A, Dalglish C, Rajan P, Nicol SM, Fleming S *et al.* (2008). The RNA helicase p68 is a novel androgen receptor coactivator involved in splicing and is overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res* **68**: 7938–7946.
- Dahl SC, Handler JS, Kwon HM. (2001). Hypertonicity-induced phosphorylation and nuclear localization of the transcription factor TonEBP. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**: C248–C253.
- Dalski A, Hebinck A, Winking H, Butzmann U, Schwinger E, Zuhlke C. (2002). Complete cDNA sequence, expression, alternative splicing, and genomic organization of the mouse Nfat5 gene. *Cytogenet Genome Res* **97**: 179–182.
- David CJ, Manley JL. (2010). Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. *Genes Dev* **24**: 2343–2364.
- Davies MP, Rudland PS, Robertson L, Parry EW, Jolicoeur P, Barraclough R. (1996). Expression of the calcium-binding protein S100A4 (p9K) in MMTV-neu transgenic mice induces metastasis of mammary tumours. *Oncogene* **13**: 1631–1637.
- Dutertre M, Gratadou L, Dardenne E, Germann S, Samaan S, Lidereau R *et al.* (2010a). Estrogen regulation and physiopathologic significance of alternative promoters in breast cancer. *Cancer Res* **70**: 3760–3770.
- Dutertre M, Vagner S, Auboeuf D. (2010b). Alternative splicing and breast cancer. *RNA Biol* **7**: 403–411.
- Ferraris JD, Williams CK, Persaud P, Zhang Z, Chen Y, Burg MB. (2002). Activity of the TonEBP/OREBP transactivation domain varies directly with extracellular NaCl concentration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 739–744.
- Flower DR. (1994). The lipocalin protein family: a role in cell regulation. *FEBS Lett* **354**: 7–11.
- Fougere M, Gaudineau B, Barbier J, Guaddachi F, Feugeas JP, Auboeuf D *et al.* (2010). NFAT3 transcription factor inhibits breast cancer cell motility by targeting the Lipocalin 2 gene. *Oncogene* **29**: 2292–2301.
- Friedl P, Wolf K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* **3**: 362–374.
- Fuller-Pace FV, Ali S. (2008). The DEAD box RNA helicases p68 (Ddx5) and p72 (Ddx17): novel transcriptional co-regulators. *Biochem Soc Trans* **36**: 609–612.
- Fuller-Pace FV, Moore HC. (2011). RNA helicases p68 and p72: multifunctional proteins with important implications for cancer development. *Future Oncol* **7**: 239–251.

- Gardner LB. (2010). Nonsense-mediated RNA decay regulation by cellular stress: implications for tumorigenesis. *Mol Cancer Res* **8**: 295–308.
- Garrett SC, Varney KM, Weber DJ, Bresnick AR. (2006). S100A4, a mediator of metastasis. *J Biol Chem* **281**: 677–680.
- Guil S, Gattoni R, Carrascal M, Abian J, Stevenin J, Bach-Elias M. (2003). Roles of hnRNP A1, SR proteins, and p68 helicase in c-Hras alternative splicing regulation. *Mol Cell Biol* **23**: 2927–2941.
- Hanahan D, Weinberg RA. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57–70.
- Helfman DM, Kim EJ, Lukanidin E, Grigorian M. (2005). The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis. *Br J Cancer* **92**: 1955–1958.
- Honig A, Auboeuf D, Parker MM, O'Malley BW, Berget SM. (2002). Regulation of alternative splicing by the ATP-dependent DEAD-box RNA helicase p72. *Mol Cell Biol* **22**: 5698–5707.
- Irrazabal CE, Gallazzini M, Schnetz MP, Kunin M, Simons BL, Williams CK *et al*. (2010). Phospholipase C-gamma1 is involved in signaling the activation by high NaCl of the osmoprotective transcription factor TonEBP/OREBP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 906–911.
- Jacobs AM, Nicol SM, Hislop RG, Jaffray EG, Hay RT, Fuller-Pace FV. (2007). SUMO modification of the DEAD box protein p68 modulates its transcriptional activity and promotes its interaction with HDAC1. *Oncogene* **26**: 5866–5876.
- Janknecht R. (2010). Multi-talented DEAD-box proteins and potential tumor promoters: p68 RNA helicase (DDX5) and its paralogs, p72 RNA helicase (DDX17). *Am J Transl Res* **2**: 223–234.
- Jauliac S, Lopez-Rodriguez C, Shaw LM, Brown LF, Rao A, Toker A. (2002). The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nat Cell Biol* **4**: 540–544.
- Kar A, Fushimi K, Zhou X, Ray P, Shi C, Chen X *et al*. (2011). RNA Helicase p68 (DDX5) regulates tau exon 10 splicing by modulating a stem-loop structure at the 5' splice site. *Mol Cell Biol* **31**: 1812–1821.
- Leng X, Ding T, Lin H, Wang Y, Hu L, Hu J *et al*. (2009). Inhibition of lipocalin 2 impairs breast tumorigenesis and metastasis. *Cancer Res* **69**: 8579–8584.
- Leng X, Wu Y, Arlinghaus RB. (2011). Relationships of lipocalin 2 with breast tumorigenesis and metastasis. *J Cell Physiol* **226**: 309–314.
- Levy C, Khaled M, Iliopoulos D, Janas MM, Schubert S, Pinner S *et al*. (2010). Intronic miR-211 assumes the tumor suppressive function of its host gene in melanoma. *Mol Cell* **40**: 841–849.
- Lewis BP, Green RE, Brenner SE. (2003). Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 189–192.
- Li ZH, Bresnick AR. (2006). The S100A4 metastasis factor regulates cellular motility via a direct interaction with myosin-IIA. *Cancer Res* **66**: 5173–5180.
- Lopez-Rodriguez C, Aramburu J, Jin L, Rakeman AS, Michino M, Rao A. (2001). Bridging the NFAT and NF-kappaB families: NFAT5 dimerization regulates cytokine gene transcription in response to osmotic stress. *Immunity* **15**: 47–58.
- Macian F. (2005). NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol* **5**: 472–484.
- Mancini M, Toker A. (2009). NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nat Rev Cancer* **9**: 810–820.
- Maouyo D, Kim JY, Lee SD, Wu Y, Woo SK, Kwon HM. (2002). Mouse TonEBP-NFAT5: expression in early development and alternative splicing. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**: F802–F809.
- McGlicy NJ, Smith CW. (2008). Alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay: what is the meaning of nonsense? *Trends Biochem Sci* **33**: 385–393.
- Metivier R, Penot G, Hubner MR, Reid G, Brand H, Kos M *et al*. (2003). Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* **115**: 751–763.
- Mooney SM, Goel A, D'Assoro AB, Salisbury JL, Janknecht R. (2010a). Pleiotropic effects of p300-mediated acetylation on p68 and p72 RNA helicase. *J Biol Chem* **285**: 30443–30452.
- Mooney SM, Grande JP, Salisbury JL, Janknecht R. (2010b). Sumoylation of p68 and p72 RNA helicases affects protein stability and transactivation potential. *Biochemistry* **49**: 1–10.
- Moore HC, Jordan LB, Bray SE, Baker L, Quinlan PR, Purdie CA *et al*. (2010). The RNA helicase p68 modulates expression and function of the Delta133 isoform(s) of p53, and is inversely associated with Delta133p53 expression in breast cancer. *Oncogene* **29**: 6475–6484.
- Muller MR, Rao A. (2010). NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age. *Nat Rev Immunol* **10**: 645–656.
- Neu-Yilik G, Kulozik AE. (2008). NMD: multitasking between mRNA surveillance and modulation of gene expression. *Adv Genet* **62**: 185–243.
- O'Connor RS, Mills ST, Jones KA, Ho SN, Pavlath GK. (2007). A combinatorial role for NFAT5 in both myoblast migration and differentiation during skeletal muscle myogenesis. *J Cell Sci* **120**: 149–159.
- Rosow KL, Janknecht R. (2003). Synergism between p68 RNA helicase and the transcriptional coactivators CBP and p300. *Oncogene* **22**: 151–156.
- Shin S, Rosow KL, Grande JP, Janknecht R. (2007). Involvement of RNA helicases p68 and p72 in colon cancer. *Cancer Res* **67**: 7572–7578.
- Stamm S, Ben-Ari S, Rafalska I, Tang Y, Zhang Z, Toiber D *et al*. (2005). Function of alternative splicing. *Gene* **344**: 1–20.
- Warner DR, Bhattacharjee V, Yin X, Singh S, Mukhopadhyay P, Pisano MM *et al*. (2004). Functional interaction between Smad, CREB binding protein, and p68 RNA helicase. *Biochem Biophys Res Commun* **324**: 70–76.
- Warzecha CC, Jiang P, Amirikian K, Dittmar KA, Lu H, Shen S *et al*. (2010). An ESRP-regulated splicing programme is abrogated during the epithelial-mesenchymal transition. *Embo J* **29**: 3286–3300.
- Watanabe M, Yanagisawa J, Kitagawa H, Takeyama K, Ogawa S, Arai Y *et al*. (2001). A subfamily of RNA-binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor alpha coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *Embo J* **20**: 1341–1352.
- Wilson BJ, Bates GJ, Nicol SM, Gregory DJ, Perkins ND, Fuller-Pace FV. (2004). The p68 and p72 DEAD box RNA helicases interact with HDAC1 and repress transcription in a promoter-specific manner. *BMC Mol Biol* **5**: 11.
- Woo SK, Dahl SC, Handler JS, Kwon HM. (2000). Bidirectional regulation of tonicity-responsive enhancer binding protein in response to changes in tonicity. *Am J Physiol Renal Physiol* **278**: F1006–F1012.
- Wortham NC, Ahamed E, Nicol SM, Thomas RS, Periyasamy M, Jiang J *et al*. (2009). The DEAD-box protein p72 regulates ERalpha/oestrogen-dependent transcription and cell growth, and is associated with improved survival in ERalpha-positive breast cancer. *Oncogene* **28**: 4053–4064.
- Yang J, Bielenberg DR, Rodig SJ, Doiron R, Clifton MC, Kung AL *et al*. (2009). Lipocalin 2 promotes breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 3913–3918.
- Yang L, Lin C, Liu ZR. (2005). Phosphorylations of DEAD box p68 RNA helicase are associated with cancer development and cell proliferation. *Mol Cancer Res* **3**: 355–363.
- Yang L, Lin C, Liu ZR. (2006). P68 RNA helicase mediates PDGF-induced epithelial mesenchymal transition by displacing Axin from beta-catenin. *Cell* **127**: 139–155.
- Yang L, Lin C, Zhao S, Wang H, Liu ZR. (2007). Phosphorylation of p68 RNA helicase plays a role in platelet-derived growth factor-induced cell proliferation by up-regulating cyclin D1 and c-Myc expression. *J Biol Chem* **282**: 16811–16819.
- Yoeli-Lerner M, Yiu GK, Rabinovitz I, Erhardt P, Jauliac S, Toker A. (2005). Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Mol Cell* **20**: 539–550.

The Ddx5 and Ddx17 RNA helicases are cornerstones in the complex regulatory array of steroid hormone-signaling pathways

Samaan Samaan^{1,2,3,4}, Léon-Charles Tranchevent^{2,3,4,5}, Etienne Dardenne^{2,3,4,5},
Micaela Polay Espinoza^{2,3,4,5}, Eleonora Zonta^{1,2,3,4}, Sophie Germann^{2,3,4,5},
Lise Gratadou^{2,3,4,5}, Martin Dutertre^{2,3,4,5} and Didier Auboeuf^{2,3,4,5,*}

¹Université de Paris Diderot-Paris 7, F-75013 Paris, France, ²Inserm U1052, F-69008 Lyon, France, ³CNRS UMR5286, F-69008 Lyon, France, ⁴Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, 69008 Lyon, France and ⁵Université de Lyon 1, F-69100 Villeurbanne, France

Received August 30, 2013; Revised October 25, 2013; Accepted November 4, 2013

ABSTRACT

Estrogen and androgen receptors (ER and AR) play key roles in breast and prostate cancers, respectively, where they regulate the transcription of large arrays of genes. The activities of ER and AR are controlled by large networks of protein kinases and transcriptional coregulators, including Ddx5 and its highly related paralog Ddx17. The Ddx5 and Ddx17 RNA helicases are also splicing regulators. Here, we report that Ddx5 and Ddx17 are master regulators of the estrogen- and androgen-signaling pathways by controlling transcription and splicing both upstream and downstream of the receptors. First, Ddx5 and Ddx17 are required downstream of ER and AR for the transcriptional and splicing regulation of a large number of steroid hormone target genes. Second, Ddx5 and Ddx17 act upstream of ER and AR by controlling the expression, at the splicing level, of several key regulators of ER and AR activities. Of particular interest, we demonstrate that Ddx5 and Ddx17 control alternative splicing of the GSK3 β kinase, which impacts on both ER and AR protein stability. We also provide a freely available online resource which gives information regarding splicing variants of genes involved in the estrogen- and androgen-signaling pathways.

INTRODUCTION

The sex steroid hormones, estrogen and testosterone, influence normal physiology, reproduction and behavior. Their biological functions are mediated through cognate nuclear receptors that govern gene expression in hormone-

sensitive tissues. Many lines of evidence have implicated steroid hormones as etiologic factors in the origin and progression of various malignancies (1,2). Perturbation of the estrogen-signaling pathway is associated with two-thirds of breast cancers that express the estrogen receptor alpha (ER α), which is considered as a good prognosis marker. The androgen receptor (AR) is activated by the binding of testosterone or its physiologically active metabolite, 5 α -dihydrotestosterone (DHT) and is involved in prostate cancer initiation and metastasis.

ER α and AR are members of the large superfamily of nuclear receptors and act as ligand-activated transcription factors. The canonical model of steroid receptor action implies a ligand-specific conformational change triggering its phosphorylation, homodimerization and binding to hormone responsive elements located in promoters or regulatory regions of target genes (3). Activation of the estrogen and androgen pathways requires the concerted action of a plethora of factors. Some of them are involved in posttranslational modifications of the hormone receptors, impacting for example on their subcellular localization or stability (4–6). Other factors, the so-called transcriptional coregulators, are recruited by hormone receptors on target promoters to mediate their effects on transcription (7,8). For both ER α and AR, dozens of coregulators, including coactivators and corepressors, have been identified. However, most of them have been studied in the context of a few target genes, and therefore it is currently unknown whether they contribute to the hundreds of gene regulations induced by hormones.

Among these, the DEAD-box RNA helicase Ddx5 (p68) and its highly related paralog, Ddx17 (p72), are transcriptional coregulators of ER α and AR (9,10). Ddx5 and Ddx17 interact directly with ER α and AR and were shown in a few cases to be recruited to target promoters (11,12) where they might modulate RNA polymerase II recruitment. However, the extent of ER α and AR endogenous

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +334 26 55 67 46; Fax: +334 78 78 27; Email: didier.auboeuf@inserm.fr

© The Author(s) 2013. Published by Oxford University Press.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

target genes on which Ddx5/Ddx17 act as transcriptional coregulators is not known. In addition to being transcriptional coregulators, Ddx5 and Ddx17 are *bona fide* components of the splicing machinery, the spliceosome (13), and play a role in the regulation of alternative splicing that leads to the production from the same gene of several splicing variants coding for different protein isoforms with different and sometimes opposite biological activities (14–17). Alternative splicing is the rule, not the exception, as 90% of human genes produce several splicing variants. Alternative splicing is the main mechanism increasing the diversity of the proteome coded by a limited number of genes (18). In this context, the Ddx5 and Ddx17 multifunctional proteins could coordinate transcription and splicing allowing the production of the proper isoform from hormone target genes as previously suggested by using minigene reporter assay (19). However, whether Ddx5 and Ddx17 regulate splicing of endogenous hormone target genes is not known.

In this work, we report using large-scale approaches for first time that Ddx5 and Ddx17 are master regulators of the estrogen and androgen-signaling pathways. Indeed, these proteins are not only required for regulating the expression of a large number of endogenous estrogen- and androgen-target genes both at the transcriptional and splicing level but remarkably, they are also acting upstream of the estrogen and androgen receptors by controlling the expression, at the splicing level, of several key regulators of the hormone-signaling pathways.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and stable cell lines

MCF-7 cells were grown in DMEM and LNCaP cells in RPMI-1640 (Gibco/LifeTechnologies). Both mediums were supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% glutamine and 1% penicillin/streptomycin. Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂. Wild-type Ddx5-HA and Ddx17-HA and mutated Ddx5-HA K144A and Ddx17-HA K142R were cloned into pTRE2-hyg vectors to generate inducible MCF-7/Tet-On stable cell lines (Clontech). Resistant clones were selected with hygromycin (300 mg/ml, Clontech) and protein expression was checked after Doxycycline treatment (1 µg/ml) for 48 h.

Cell transfection and treatment

A total of 3×10^6 cells were transiently transfected with 26.6 nM siRNAs (Supplementary Table S3) using Lipofectamine RNAiMax (LifeTechnologies). Twenty-four hours before treatment, MCF-7 and LNCaP cells, were cultured in red phenol-free medium supplemented with 2% charcoal-treated FBS. Cells were treated with E2 (10 nM; Sigma) for 1 or 10 h or DHT (10 nM; Sigma) for 24 h. Control cells received equal volumes of vehicle (ethanol).

RNA preparation, RT-PCR and RT-qPCR

Total RNAs were prepared using TRIpure Isolation Reagent (Roche), and 1 µl of Glycoblu (Ambion) was

added before RNA precipitation. Nuclear fractionation was performed as previously described (20). Reverse transcription (RT) was performed with 1–2 µg of total RNA using M-MLV Reverse Transcriptase (LifeTechnologies) and random primers. The RT reactions were diluted and used either for PCR analysis using GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega) or in qPCR using SYBR Green I Master Mix (Roche) on a Roche LightCycler 480 II. Primer sequences are provided in Supplementary Table S3. The relative RNA levels were determined on the basis of the threshold cycle (C_t) for each qPCR product and normalized to 18S ribosomal RNA levels.

Affymetrix exon array

One microgram of total RNA was processed with the GeneChip WT Sense Target Labeling kit and hybridized to GeneChip Human Exon 1.0 ST arrays. Affymetrix exon-array data were normalized with quantile normalization. Antigenomic probes were used to perform the background correction. Only probes targeting exons annotated from full-length cDNA were retained for analysis. Cross hybridizing probes and probes with lower signals intensity than anti-genomic background probes showing the same GC content were removed. Only probes with a DABG P -value ≤ 0.05 in at least half of the arrays were considered for further statistical analysis. Arrays were performed in four independent replicates. The strategies adopted to identify E2-, DHT-regulated and Ddx5/17-dependent genes are described in Supplementary Figure S1. Briefly, the median intensity of all constitutive exonic probes was calculated for each gene in each sample, and the experimental samples and control groups were compared using a Student's paired t -test. Paired statistical analyses were performed using the Student's paired t test on the splicing index (SI) to analyze the Exon Array data at the exon level (SI > 1.5, $P < 0.05$). The SI corresponds to a comparison of gene-normalized exon intensity values between the two analyzed experimental conditions.

Western blot analysis

Total protein extracts were obtained using NP-40 buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 0.4 M NaCl, 5 mM EDTA pH 8, 1% NP40, 0.2% SDS, 1 mM DTT) supplemented with Protease and Phosphatase Inhibitors (Roche). An amount of 20 µg of proteins were separated by NuPAGE® Novex 3–8% Tris-Acetate or 12% bis-tris-Acetate Gels (LifeTechnologies). Membranes were incubated with specific primary antibodies against Ddx5 (ab10261, Abcam), Ddx17 (ab24601 Abcam), SMRT (H-300, sc-20778 Santa Cruz), AR (441, sc-7305), ER α (F-10, sc-8002 Santa Cruz), GSK3 β (27C10, Cell signaling) and β -Actin (I-19, sc-1616 Santa Cruz).

Chromatin-immunoprecipitation

ER α chromatin-immunoprecipitation (ChIP) assay was performed in MCF-7 cells using anti-ER α antibody (HC-20, sc-543 Santa Cruz). Ddx5-HA ChIP assay was performed in inducible MCF-7 cell line as previously described (21) using anti-HA antibody (3F10, Roche).

MCF-7 or MCF-7 inducible cell lines were maintained in red phenol-free medium supplemented with 2% charcoal-treated FBS. Cells were treated with E2 (10 nM; Sigma) for 1 h before fixation. Primers used are detailed in Supplementary Table S3.

RESULTS

Ddx5 and Ddx17 are master regulators of the estrogen-signaling pathway

In order to assess the extent to which Ddx5 and Ddx17 participate in gene expression regulation in response to estradiol (E2), ER-positive MCF-7 breast cancer cells were treated with E2 or vehicle for 10 h after being transfected with a control siRNA (siCTRL) or an siRNA (siDdx5/17) targeting a conserved region shared by Ddx5 and Ddx17 (Figure 1A). Whole-transcriptome analysis was performed using Affymetrix Exon Arrays, which allowed us to assess expression at the global gene level as well as at the exon level. The median intensity of exonic probes of each gene was computed in each sample from four independent experiments. Using cutoffs of 1.5 for fold change and 0.05 for *P*-value, 354 (67%) and 173 (33%) genes were predicted to be activated and repressed by E2, respectively (Figure 1B). Comparative analysis of control and Ddx5/17-depleted cells (Supplementary Table S1) revealed that Ddx5 and Ddx17 are required for the regulation of 186 (53%) of E2-activated and 98 (57%) of E2-repressed genes (Figure 1B and Supplementary Table S1) as validated by RT-qPCR for a large number of cases (Figure 1C). Similar results were observed in a subset of selected genes using another set of siRNAs targeting Ddx5 and Ddx17 (Figure 1D and Supplementary Figure S2A).

The observed effects likely occurred at the transcriptional level as Ddx5/17 depletion abrogated E2-mediated effects at the pre-mRNA level and did not significantly affect the half-life of the tested E2-regulated mRNAs (Figure 1E and Supplementary Figure S2C). Furthermore, ER α and Ddx5 were detected on a subset of E2-target genes and their recruitment was increased after E2 treatment as demonstrated by ChIP assay (Figure 1F). These results are in agreement with previous reports (9,11,22,23) indicating that Ddx5 and Ddx17 are *bona fide* ER α transcriptional coregulators and are therefore required for mediating E2 effects on transcription. However, we observed that Ddx5/17 depletion also decreased ER α protein (but not mRNA) levels (Figure 1G), suggesting that Ddx5 and Ddx17 may also contribute to the estrogen-signaling pathway by another mechanism (see below). Of note, Ddx5/17 depletion did not affect other signaling pathways (Supplementary Figure S2D).

In addition to their role in transcription, Ddx5 and Ddx17 have been shown to play a role in alternative splicing regulation (14–17). The analysis of Exon Array data revealed that Ddx5 and Ddx17 silencing changed the splicing pattern of 65 genes among the E2-regulated genes (Figure 2A and Supplementary Table S1), as validated by RT-PCR (Figure 2B). Therefore, Ddx5 and Ddx17 are not only required for the E2-mediated effects on

transcription, but also for the production of specific isoforms from, at least, a subset of endogenous E2-regulated genes. However, as most of the genes regulated at the splicing level by Ddx5 and Ddx17 were not regulated at the transcriptional level by E2 treatment (Figure 2A), this suggested that Ddx5/17 effects on splicing and E2 effects on transcription were mainly independent.

Ddx5 and Ddx17 regulate splicing of several genes involved in the estrogen-signaling pathway

Among 193 genes encoding for mediators or regulators of the estrogen-signaling pathway, 26 were predicted to be regulated by Ddx5/17 at the splicing level (Figure 2C and Supplementary Figure S3A). For example, several genes coding for protein kinases involved in ER α phosphorylation, including CDK2, p38 MAPK (ERK2) and GSK3 β , were affected at the splicing level when Ddx5 and Ddx17 were knocked down (Figure 2D and Supplementary Figure S3A). Likewise, several ER α transcriptional coregulators were affected at the splicing level by Ddx5/17 silencing (Figure 2D and Supplementary Figure S3A). This included transcriptional coactivators like CREB-binding protein (CBP) and the Mediator Subunit 1 (MED1) that plays a crucial role to anchor liganded ER α to the transcriptional pre-initiation complex (24), as well as several corepressors such as the nuclear corepressor 1 (N-CoR1) and its paralog N-COR2, also known as SMRT (Silencing Mediator of Retinoic acid and Thyroid hormone receptor) (25). The identity of some splicing variants was verified by sequencing (Supplementary Figure S4).

To further confirm the effects of Ddx5 and Ddx17 on splicing, inducible stable MCF-7 cell lines expressing wild type or helicase-mutated Ddx5 were transfected with a control siRNA or a mixture of siRNAs targeting *DDX5* and *DDX17* UTRs. The re-expression of wild-type, but not mutated Ddx5, partially rescued the effect of the siDdx5/17 UTR on the splicing pattern (Figure 2E, left panel). Similar results were obtained in inducible stable MCF-7 cell lines expressing wild-type Ddx17 or the mutant K142R lacking the helicase activity (Figure 2E, right panel). This observation raised the possibility that Ddx5 and Ddx17 contributed to the ER α -signaling pathway not only as ER α transcriptional coregulators but also by regulating the splicing pattern of key actors of the pathway.

To address the functional relevance of splicing regulation of key actors of the ER α -signaling pathway by Ddx5 and Ddx17, we focused on the SMRT transcriptional corepressor. As shown in Figure 3A, RT-qPCR analysis confirmed the RT-PCR data (Figure 2D) and showed that Ddx5/17 depletion induced exon 42 skipping (SMRT Δ E42). Interestingly, exon 42 skipping is predicted to introduce a premature stop codon in exon 43 (Figure 3B, upper panel), suggesting that SMRT Δ E42 transcripts might be unproductive (that is, not translated) and regulated by the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway. Supporting this hypothesis, incubation of MCF-7 cells with the translation inhibitor cycloheximide, that blocks mRNA degradation by the NMD pathway, increased the ratio of SMRT Δ E42

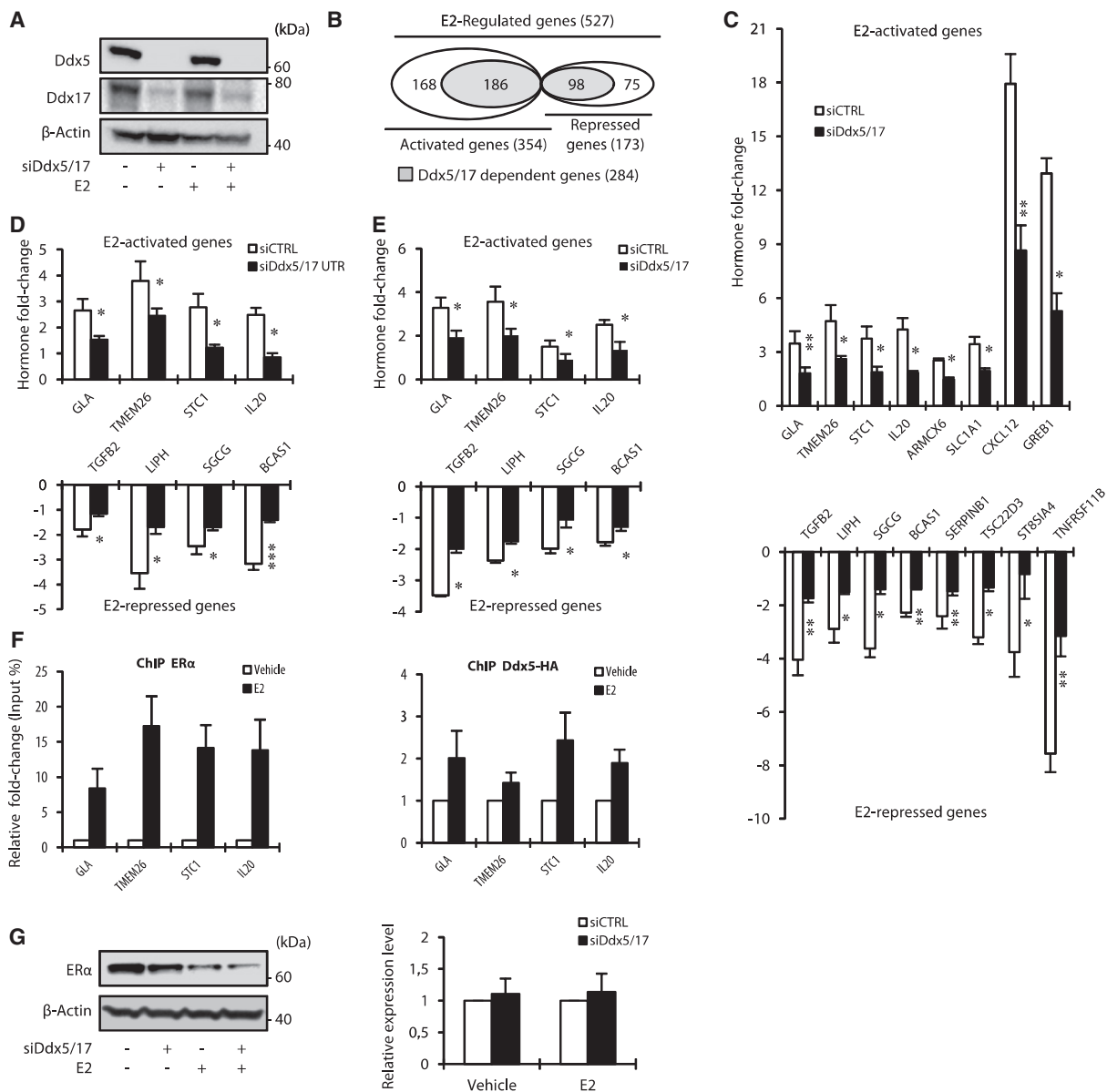


Figure 1. Ddx5 and Ddx17 are master regulators of the estrogen-signaling pathway. (A) Western blot analysis of Ddx5, Ddx17 and β -Actin as loading control, using total protein extract from MCF-7 cells transfected with either a control siRNA or siDdx5/17 in the presence or absence of estradiol (E2) for 10h. (B) *In silico* prediction of Exon array analysis of genes regulated at the global expression level by E2 and dependent of Ddx5 and Ddx17 (in gray). (C) Hormone fold change induced by E2 treatment for 10h of the expression level of a subset of mRNAs as determined by RT-qPCR in MCF-7 cells transfected with siCTRL or siDdx5/17 (genes upregulated by E2 in the upper panel and genes downregulated by E2 in the lower panel). (D) Hormone fold change induced by E2 treatment for 10h of the expression level of a subset of mRNAs as determined by RT-qPCR in MCF-7 cells transfected with siCTRL or a mixture of siRNAs-targeting Ddx5 and Ddx17 UTRs (siDdx5/17 UTR). (E) Hormone fold change as assessed by RT-qPCR measuring the unspliced pre-mRNAs of E2-regulated genes in the nuclear extracts. MCF-7 cells were transiently transfected with Control siRNA or siDdx5/17 then treated with E2 or vehicle for 1h. (F) qPCR analysis using primers spanning promoter regions of a subset of E2-regulated genes on genomic DNA in a ChIP assay using MCF-7 for ER α (left panel) and MCF-7 stable cell lines expressing Ddx5-HA (right panel). (G) Western blot analysis of ER α and β -Actin as loading control using MCF-7 cells transfected with either a control siRNA or siDdx5/17 in the presence or absence of estradiol (E2) for 10h (left panel). Relative expression level of ER α mRNA as assessed by RT-qPCR analysis (right panel). Histograms represent the average of at least three independent experiments. Error bars, s.e.m.; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (*t*-test).

transcripts to transcripts containing exon 42 (SMRT + E42) (Figure 3B, lower panel). In addition and as expected from the increased NMD-degraded SMRT Δ E42 production, Ddx5/17 depletion induced a

decrease of SMRT protein expression levels (Figure 3C, left panel). Finally, MCF-7 cells transfected with siRNA targeting SMRT mRNA showed a significantly reduced E2 effect on a subset of downregulated transcripts

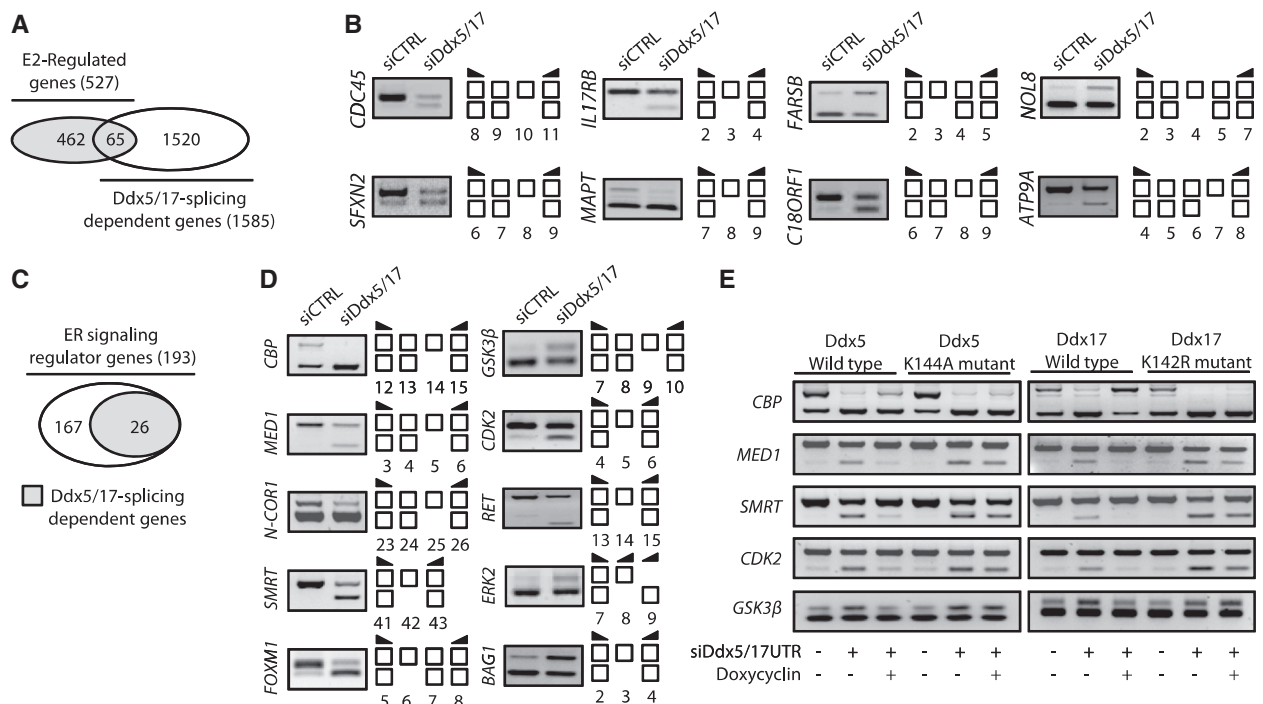


Figure 2. Ddx5 and Ddx17 regulate splicing of a subset of E2-target genes and genes involved in estrogen-signaling pathway. (A) *in silico* prediction of Exon array analysis. Venn diagram representing E2-regulated genes and genes that were regulated by Ddx5 and Ddx17 at the splicing level. (B) Validation by RT-PCR of splicing variants produced from E2-target genes and regulated by Ddx5 and Ddx17. Exons are represented by white boxes and primers used for PCR by black arrows. (C) Diagram representing ER-signaling regulators genes that were regulated by Ddx5 and Ddx17 at the splicing level. (D) Validation by RT-PCR of splicing events regulated by Ddx5/17. MCF-7 cells were transfected for 48 h with a Control siRNA (siCTRL) or siDdx5/17, then treated for 10 h with E2 (10 nM). Depletion of Ddx5 and Ddx17 induced both exon inclusion and exon skipping. (E) Rescue experiments in inducible stable cell lines. Re-expression of wild-type or mutated Ddx5 (left panel) and Ddx17 (right panel) forms in MCF-7 inducible stable cell lines after transfection with siRNAs targeting *DDX5* and *DDX17* UTRs was induced by Doxycyclin (1 μ g/ml) treatment.

compared with control cells (Figure 3C, right panel and 3D). Altogether, these data indicated that the role of Ddx5 and Ddx17 in the regulation of the estrogen-signaling pathway is not limited to their function as ER transcriptional coregulators on estrogen-regulated genes, but also pointed to a previously undocumented regulation of coregulated splicing events directly linked to this pathway.

Ddx5 and Ddx17 play a major role in the androgen-signaling pathway

As for ER α , Ddx5 and Ddx17 are transcriptional coregulators of AR. To study the genome-wide contribution of Ddx5 and Ddx17 to the androgen-signaling pathway, we applied the same experimental strategy using the human LNCaP prostate cancer cell line that was treated with DHT for 24 h (Figure 4A). Affymetrix Exon array analysis predicted that out of a total of 1573 DHT-regulated genes, 1319 (84%) were activated and 254 (16%) repressed (Figure 4B). *In silico* analysis predicted that 868 (66%) of DHT-activated and 103 (40%) of DHT-repressed genes were regulated in a Ddx5/17-dependent manner (Figure 4B and Supplementary Table S2), as validated by RT-qPCR (Figure 4C).

When analyzing Exon Array data at the exon level, we identified 371 DHT-regulated genes (among 1573) whose

splicing was affected by Ddx5/17 depletion (Figure 4D and Supplementary Table S2), as validated by RT-PCR (Figure 4E). Finally, as shown in Figure 4F, several (24 out of 144) Ddx5/17-regulated splicing variants are produced from genes involved in the regulation of the androgen-signaling pathway (Figure 4G and Supplementary Figure S3B).

Of particular interest, and similarly to our observation on ER α , Ddx5/17 depletion in LNCaP cells, reduced AR protein (but not mRNA) level (Figure 4H). Therefore, Ddx5 and Ddx17 likely contribute to both estrogen and androgen-signaling pathways through several mechanisms.

Ddx5 and Ddx17 stabilize ER α and AR by modulating GSK3 β splicing

Comparing the data obtained in both MCF-7 and LNCaP cells, we observed that several genes regulated at the splicing level by Ddx5/17 are involved in both ER α and AR-signaling pathways (e.g. CBP, MED1, N-COR1, SMRT and GSK3 β) (Figure 2D, 4G and Supplementary Figure S3). Interestingly, it has been shown that the GSK3 β kinase phosphorylates and stabilizes both ER α (5,26) and AR (6,27). Two GSK3 β isoforms, resulting from exon 9 alternative splicing, have been reported in rodents (28,29) and human (30). The conventional

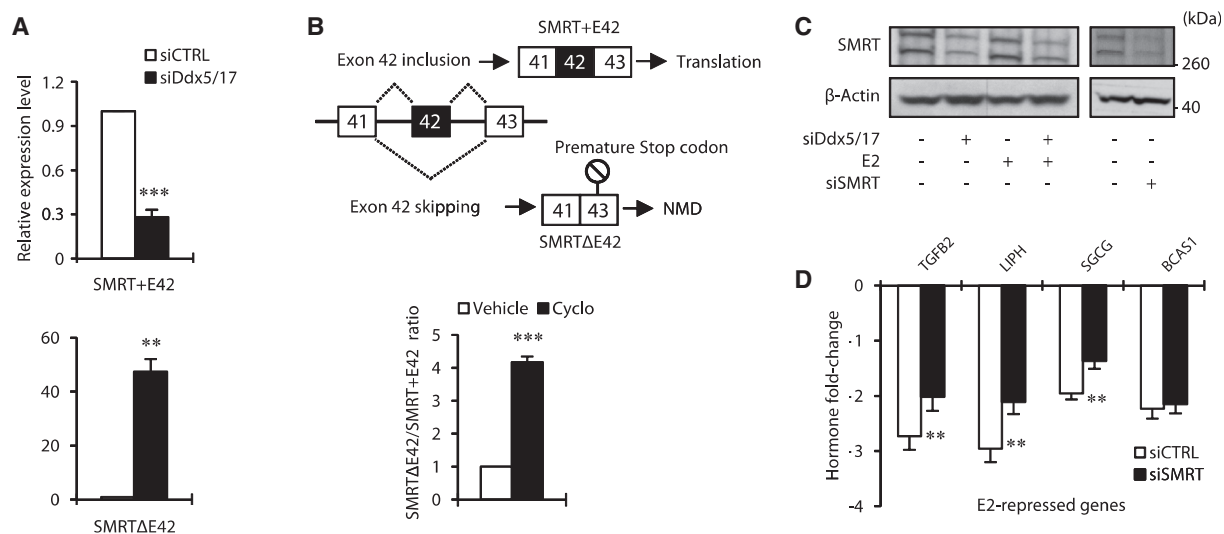


Figure 3. Ddx5 and Ddx17 control SMRT protein expression level. (A) RT-qPCR analysis measuring SMRT splicing variant expression level in MCF-7 cells transfected for 48 h with a control siRNA (siCTRL) or siDdx5/17. Specific primers were designed to amplify transcripts containing or not exon 42, SMRT + E42 and SMRTΔE42, respectively. (B) Upper panel, skipping of exon 42 results in a premature stop codon in exon 43. Lower panel, RT-qPCR analysis measuring SMRT splicing variant ratio in MCF-7 cells after 6 h of cycloheximide treatment (10 μg/ml). (C) Western blot analysis of SMRT protein expression level and β-Actin as a loading control in MCF-7 cells transfected with a control siRNA, siDdx5/17 or siRNA-targeting SMRT mRNA. (D) Hormone fold change induced by E2 treatment for 10 h of the expression level of a subset of mRNAs as determined by RT-qPCR in MCF-7 cells transfected with siCTRL or siSMRT. Histograms represent the average of at least three independent experiments. Error bars represent s.e.m.; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (t test).

isoform GSK3β1 that regulates ERα and AR protein stability does not contain exon 9 in contrast to the GSK3β2 isoform (Figure 5A, upper panel). Interestingly, exon 9 encodes for a 13 amino acid peptide within the kinase catalytic domain, which reduces the kinase activity of the GSK3β2 isoform compared with the canonical GSK3β1 isoform (28,30,31).

We first validated the effect of Ddx5/17 depletion on GSK3β exon 9 splicing by RT-qPCR analysis (bottom panel of Figure 5A). This confirmed that in the absence of Ddx5/17, exon 9 inclusion augments, indicating that the production of GSK3β2 splicing variant is increased while the GSK3β1 splicing variant is decreased in MCF-7 cells. Accordingly, a western blot analysis showed that Ddx5/17 silencing resulted in the appearance of a slower migrating protein band detected by the GSK3β antibody (Figure 5B), consistent with the detection of the GSK3β2 isoform (32), while the GSK3β1 isoform decreased.

As previously reported (5,26,33), GSK3β depletion and pharmacological inhibition resulted in ERα protein level decrease (Figure 5C). Remarkably, Ddx5/17 depletion had the same effect (Figure 5C) and this effect was further enhanced in MCF-7 cells transfected with specific siRNAs (Figure 5D, upper panel) targeting the GSK3β1 but not the GSK3β2 isoform (Figure 5D, bottom panel). Collectively these results support a model in which Ddx5/17 silencing reduces the production of the canonical GSK3β1 isoform, resulting in a decreased ERα protein level. Similar results were obtained in LNCaP cells: Ddx5/17 depletion decreased the production of the conventional GSK3β1 isoform (Figure 5E, upper panel) as well as AR protein level, as did GSK3β depletion or

pharmacological inhibition (Figure 5E, bottom panel), as previously reported (6,27,34,35).

Therefore, Ddx5/17 directly participate to the estrogen- and androgen-signaling pathways as ERα and AR transcriptional coregulators but also indirectly by regulating alternative splicing of other transcriptional coregulators or other actors of the signaling pathways (Figure 5F, and see 'Discussion' section).

DISCUSSION

Activation of the estrogen and androgen-signaling pathways requires the concerted action of a plethora of factors that either affect post-translational modifications of ERα and AR or are recruited on hormone target genes to mediate their transcriptional effects. In this work, we report that the Ddx5 and Ddx17 RNA helicases, that have been shown to be ERα and AR transcriptional coregulators (see 'Introduction' section), are master regulators of the estrogen and androgen-signaling pathways by controlling transcription and splicing both upstream and downstream of receptors (Figure 5F). Indeed, Ddx5 and Ddx17 regulate the expression of a large number of estrogen- and androgen-target genes both at the transcriptional and splicing levels (Figures 1–4). Therefore, Ddx5 and Ddx17 intervene downstream of the signaling pathways for the transcriptional and splicing regulation of hormone-targeted genes. This result observed on a large scale on endogenous hormone target genes supports a model where at least some transcriptional coregulators are not only involved in the quantitative regulation of endogenous gene expression but also in

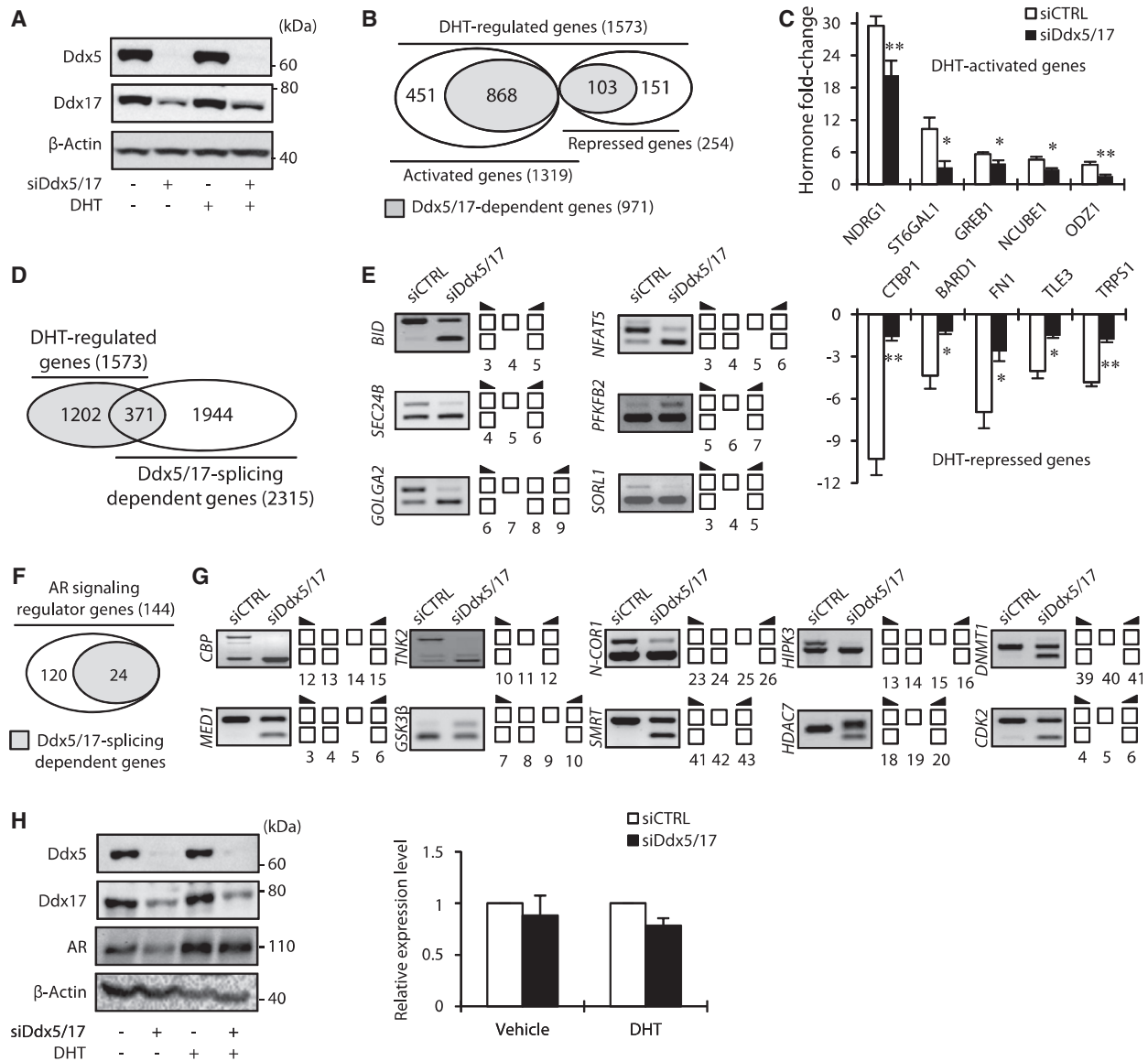


Figure 4. Ddx5 and Ddx17 play a major role in the androgen-signaling pathway. (A) Western blot analysis of Ddx5, Ddx17 and β -Actin as loading control, using total protein extract from LNCaP cells transfected with either a control siRNA (siCTRL) or siDdx5/17 in the presence or absence of DHT for 24 h. (B) *In silico* prediction of exon array analysis of genes regulated at the global expression level by DHT and dependent of Ddx5 and Ddx17 (in gray). (C) Hormone fold change induced by DHT treatment for 24 h of the expression level of a subset of mRNAs as determined by RT-qPCR in LNCaP cells transfected with siCTRL or siDdx5/17 (genes upregulated by DHT in the upper panel and genes downregulated by DHT in the lower panel). (D) *In silico* prediction of Exon array analysis. Venn diagram representing DHT-regulated genes and genes that were regulated by Ddx5 and Ddx17 at the splicing level. (E) Validation by RT-PCR of splicing variants produced from DHT-target genes and regulated by Ddx5 and Ddx17. LNCaP cells were transfected with siCTRL or siDdx5/17 then treated by DHT (10 nM) for 24 h. (F) Diagram representing AR-signaling regulators genes that were regulated by Ddx5 and Ddx17 at the splicing level. (G) Validation by RT-PCR of splicing events regulated by Ddx5/Ddx17 in the same experimental condition than F panel. (H) Western blot analysis of Ddx5, Ddx17, AR proteins level. β -Actin was used as loading control (left panel). LNCaP cells were transfected with either a control siRNA or siDdx5/17 in the presence or absence of DHT for 24 h. RT-qPCR analysis of the relative expression level of AR mRNA (right panel). Histograms represent the average of at least three independent experiments. Error bars represent s.e.m.; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ (*t*-test).

their qualitative regulation by allowing the production of specific splicing variants in response to stimuli.

Furthermore, we show that Ddx5 and Ddx17 act upstream of the estrogen and androgen-signaling pathways by controlling the expression, at the splicing

level, of several key regulators of the hormone-signaling pathways. (Figures 1-4 and 5F). Of particular interest, we showed that Ddx5 and Ddx17 controlled the expression level of the SMRT transcriptional coregulator. Indeed, Ddx5/17 depletion favored the production of a SMRT

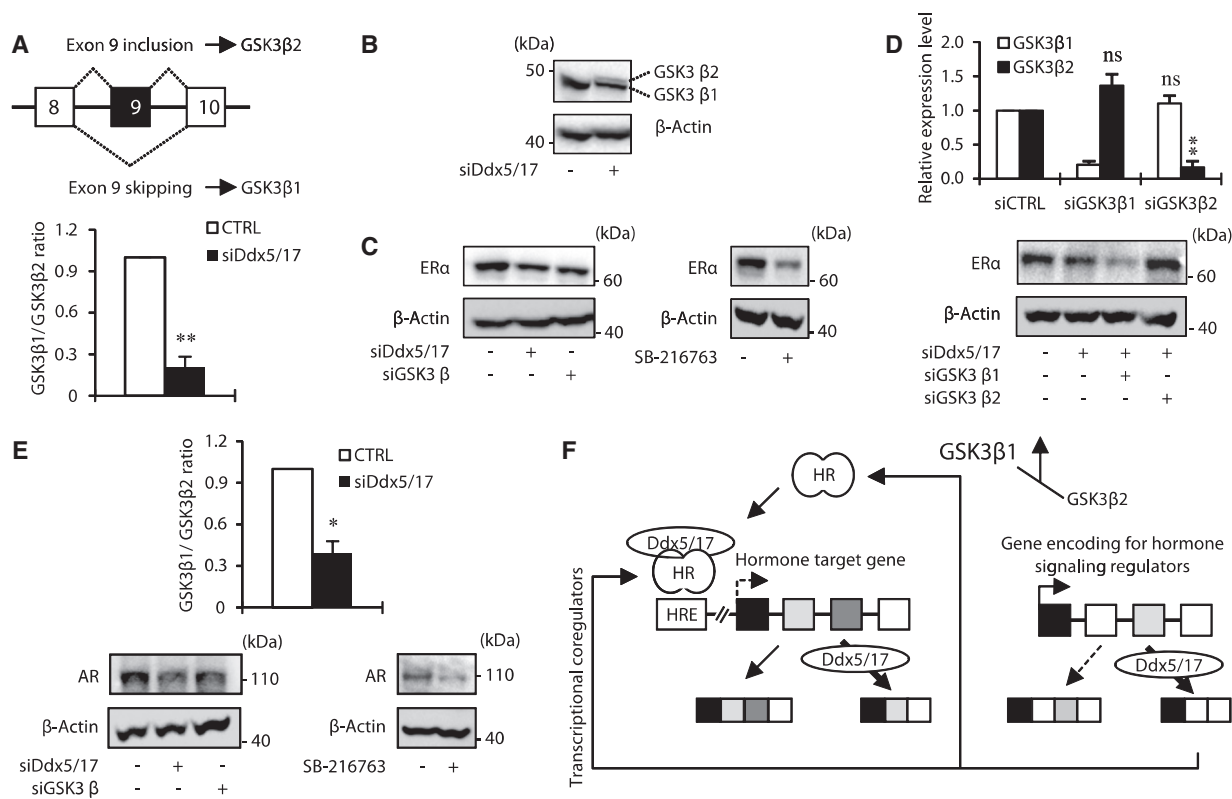


Figure 5. Ddx5 and Ddx17 stabilize ER α and AR protein by modulating GSK3 β splicing. (A) Schematic representation of GSK3 β primary transcripts (upper panel). RT-qPCR analysis measuring the GSK3 β 1 and GSK3 β 2 ratio in MCF-7 cells transfected with a control siRNA or siDdx5/17. (B) Western blot analysis of GSK3 β and β -actin as a loading control in MCF-7 cells transfected with a control siRNA or siDdx5/17. (C) Western blot analysis of ER α protein level and β -actin as a loading control in MCF-7 cells transfected with a control siRNA, siDdx5/17 or siGSK3 β (left panel) or treated with 20 μ M of the SB-216673 GSK3 β inhibitor for 24 h (right panel). (D) RT-qPCR analysis measuring GSK3 β 1 and GSK3 β 2 splicing variant expression level in MCF-7 cells transfected with specific siRNAs targeting each isoform (i.e. siGSK3 β 1 and siGSK3 β 2, upper panel). Western blot analysis of ER α protein level and β -Actin as a loading control in MCF-7 cells transfected with a control siRNA, siDdx5/17 and siGSK3 β 1 or siGSK3 β 2 (lower panel). (E) RT-qPCR analysis measuring the GSK3 β 1 and GSK3 β 2 ratio in LNCaP cells transfected with a control siRNA or siDdx5/17 (upper panel). Western blot analysis of AR protein level and β -actin as a loading control in LNCaP cells transfected with a control siRNA, siDdx5/17 or siGSK3 β or treated with 20 μ M of the SB-216673 GSK3 β inhibitor for 24 h (lower panels). (F) Ddx5 and Ddx17 that are recruited by Steroid Hormone Receptors (HR) on Hormone Responsive Elements (HRE) act as transcriptional coregulators and regulate alternative splicing of a least a subset of hormone-regulated genes (left panel). Meanwhile, Ddx5 and Ddx17 control the expression at the splicing level of key regulators of the steroid hormone-signaling pathways. Effectors of the steroid hormone-signaling pathways regulated at the splicing level by Ddx5/17 can either be transcriptional coregulators (e.g. SMRT) or proteins modulating HR post-translational modifications, like GSK3 β that controls AR and ER α protein expression levels.

splicing variant that is degraded by the NMD pathway, leading to the decrease of SMRT protein level (Figure 3). Furthermore, we demonstrated that Ddx5 and Ddx17 regulated alternative splicing of GSK3 β , thereby controlling AR and ER α protein levels (Figure 5). Thus, our data show that Ddx5/17 control steroid hormone-signaling pathways on a large scale, by acting both upstream and downstream of hormone receptors.

One interesting remaining question is whether Ddx5 and Ddx17 effects on transcription and splicing are somehow connected. At the transcriptional level, it has been proposed that Ddx5 and Ddx17 are recruited at the promoter level by transcriptional factors and serve as a bridge between transcription factors and other transcriptional coregulators, in particular, histone modifiers CBP (36,37) and HDACs (38). The effects of Ddx5 and Ddx17 in splicing are less characterized.

It has been proposed that, these proteins may help the binding of splicing regulators on their target pre-mRNAs owing to their RNA helicase activity (14,15,39). Interestingly, Ddx5 and Ddx17 interact with RNA polymerase II (RNAPII) and could affect transcription elongation (40,41). Because transcription elongation can have an impact on alternative splicing regulation (42), Ddx5 and Ddx17 could impact on splicing owing to their effects on transcription elongation. However, as most of the genes regulated at the splicing level by Ddx5 and Ddx17 were not regulated at the transcriptional level by E2 or DHT treatment (Figures 2A and 4D), this suggested that Ddx5/17 effects on splicing and E2 or DHT effects on transcription were mainly independent. However, this does not exclude a link between transcription and splicing. For example, Ddx5 and Ddx17 may have to be first recruited by the transcriptional

machinery before being loaded onto the nascent RNA molecules to impact on splicing; the recruitment by the transcriptional machinery may not necessarily be measurable by an effect on gene transcription activity.

Even though further experiments are required to better understand the mechanisms by which Ddx5 and Ddx17 affect transcription and splicing, their broad effects on the estrogen and androgen-signaling pathways has several physio-pathological consequences. First, the misregulation of Ddx5 and/or Ddx17 expression level and/or activity owing to posttranslational modifications that was reported in many cases of breast and prostate cancer (10,23,43–45), may have a broad impact on the estrogen- and androgen-signaling pathways that play a major role in the etiology and progression of those cancers. For example, the *Ddx5* gene is fused in frame to the *ETV4* gene in prostate tumors (43). Based on our data, it can be anticipated that such a translocation may have a broad impact on the androgen-signaling pathway in these tumors.

Second, we observed that many of the Ddx5/17 splicing-regulated genes have been reported to play a direct role in tamoxifen resistance, one of the major endocrine therapies of breast cancer. This includes several transcriptional coregulators such as SMRT, MED1 and NCoR1 involved in resistance to tamoxifen (46–48) and several kinases such as GSK3 β , CDK2 and RET which participate, directly or indirectly, to ER α phosphorylation and thus, the hormone-independent activation of ER and tamoxifen resistance (49–51). Interestingly as well, Ddx5 expression correlates with that of HER-2/neu epidermal growth factor receptor (23,45). It has been reported that overexpression of HER2/neu is associated with increased ER phosphorylation on ser-118 residue (52) which could play a role in resistance to tamoxifen by permanent ER α activation. Interestingly, even though further experiments are required because of potential contradictory reported data, high Ddx5 expression level could be associated with higher tumor grade or poor prognosis in ER-positive breast cancer patients (23,53). Furthermore, a recent report indicate that, Ddx5 and Ddx17 proteins level change significantly according to breast cancer subtype (45) and is highly dependent on certain miRNAs abundance and regulation, in particular miR-206 that has been reported to play a major role in breast cancer and estrogen pathway (54). Therefore, changes in the expression of Ddx5 and Ddx17, in particular under the control of altered miRNAs in breast cancer, could play a role in resistance to tamoxifen, in particular owing to their effects on splicing of genes involved in resistance (see above). It would be particularly interesting to test whether resistance to endocrine therapy is associated with mis-regulation of splicing of genes involved in steroid hormone-signaling pathways.

While many researches have been concentrated on the canonical GSK3 β 1, ubiquitously distributed in organs, minor attention was attributed to GSK3 β 2 isoform, whose substrate preference and physiological significance remain unclear. In GSK3 β 2 long isoform, exon 9 translation produces a 13 amino acid insert of unknown function in an external loop near the catalytic domain (28–30)

which was associated with reduced kinase activity (30,31). Changes in the balance of GSK3 β 2/GSK3 β 1 isoforms due to alternative splicing regulation could have a broad impact in cancer initiation or progression, not only owing to an effect on ER and AR protein level, as reported in this work but also owing to the key role of GSK3 β in the β -catenin homeostasis and its cross-talk with WNT-signaling pathway.

Because there is increasing evidence that the interplay between transcription and splicing participates in signaling pathway regulation and outcomes, we created a freely available website, named SSAS-DB (<http://fasterdb.lyon.unicancer.fr/ssas-db/home.pl>) that provides genome-wide information on the impact of estrogen, androgen and Ddx5/17 on gene expression in breast and prostate cancer cell lines, at both whole-gene (transcriptional) and exon- (alternative splicing) levels. This website is a valuable tool to analyze the splicing variants of hormone-regulated genes or genes involved in hormone-signaling pathways (see [Supplementary Figure S5](#) for further information on SSAS-DB).

In conclusion, our work provides a new understanding of steroid hormone-signaling pathways owing to the identification of two related proteins, Ddx5 and Ddx17, that not only mediate the regulation at both transcriptional and splicing levels of a large subset of steroid hormone target genes, but also control a set of splicing events in genes that, in turn, control steroid receptor abundance and activity. Thus, we propose that Ddx5 and Ddx17 are master regulators of estrogen and androgen-signaling pathways by acting both upstream and downstream of receptors.

SUPPLEMENTARY DATA

[Supplementary Data](#) are available at NAR Online, including [55].

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Mark McCarron for helpful reading of the paper and Marie-Pierre Lambert for drawing figures.

FUNDING

The Institut National du Cancer (INCa); Agence Nationale de la Recherche (ANR); Fondation Recherche Médicale (FRM); Ligue Nationale Contre le Cancer (to S.S. and E.D.); Association Française contre les Myopathies (to M.P.E.), FRM (to E.Z.) and Association pour la Recherche sur le Cancer (to S.G.). Funding for open access charge: Institut National du Cancer (INCa) Agence Nationale de la Recherche (ANR) Fondation Recherche Médicale (FRM) Ligue Nationale Contre le Cancer (LNCC) Association Française contre les Myopathies (AFM) Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC)

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Madhunapantula,S.V., Mosca,P. and Robertson,G.P. (2010) Steroid hormones drive cancer development. *Cancer Biol. Ther.*, **10**, 765–766.
- Green,S.M., Mostaghel,E.A. and Nelson,P.S. (2012) Androgen action and metabolism in prostate cancer. *Mol. Cell Endocrinol.*, **360**, 3–13.
- Kato,S., Yokoyama,A. and Fujiki,R. (2011) Nuclear receptor coregulators merge transcriptional coregulation with epigenetic regulation. *Trends Biochem. Sci.*, **36**, 272–281.
- Le Romancer,M., Poulard,C., Cohen,P., Sentis,S., Renoir,J.M. and Corbo,L. (2011) Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocr. Rev.*, **32**, 597–622.
- Grisouard,J., Medunjanin,S., Hermani,A., Shukla,A. and Mayer,D. (2007) Glycogen synthase kinase-3 protects estrogen receptor alpha from proteasomal degradation and is required for full transcriptional activity of the receptor. *Mol. Endocrinol.*, **21**, 2427–2439.
- Schutz,S.V., Cronauer,M.V. and Rinnab,L. (2010) Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta promotes nuclear export of the androgen receptor through a CRM1-dependent mechanism in prostate cancer cell lines. *J. Cell. Biochem.*, **109**, 1192–1200.
- O'Malley,B.W., Malovannaya,A. and Qin,J. (2012) Minireview: nuclear receptor and coregulator proteomics—2012 and beyond. *Mol. Endocrinol.*, **26**, 1646–1650.
- Rosenfeld,M.G., Lunyak,V.V. and Glass,C.K. (2006) Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response. *Genes Dev.*, **20**, 1405–1428.
- Watanabe,M., Yanagisawa,J., Kitagawa,H., Takeyama,K., Ogawa,S., Arai,Y., Suzawa,M., Kobayashi,Y., Yano,T., Yoshikawa,H. *et al.* (2001) A subfamily of RNA-binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor alpha coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *EMBO J.*, **20**, 1341–1352.
- Clark,E.L., Coulson,A., Dalgliesh,C., Rajan,P., Nicol,S.M., Fleming,S., Heer,R., Gaughan,L., Leung,H.Y., Elliott,D.J. *et al.* (2008) The RNA helicase p68 is a novel androgen receptor coactivator involved in splicing and is overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res.*, **68**, 7938–7946.
- Metivier,R., Penot,G., Hubner,M.R., Reid,G., Brand,H., Kos,M. and Gannon,F. (2003) Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell*, **115**, 751–763.
- Wong,H.Y., Demmers,J.A., Bezstarosti,K., Grootegoed,J.A. and Brinkmann,A.O. (2009) DNA dependent recruitment of DDX17 and other interacting proteins by the human androgen receptor. *Biochim. Biophys. Acta*, **1794**, 193–198.
- Liu,Z.R. (2002) p68 RNA helicase is an essential human splicing factor that acts at the U1 snRNA-5' splice site duplex. *Mol. Cell Biol.*, **22**, 5443–5450.
- Kar,A., Fushimi,K., Zhou,X., Ray,P., Shi,C., Chen,X., Liu,Z., Chen,S. and Wu,J.Y. (2011) RNA helicase p68 (DDX5) regulates tau exon 10 splicing by modulating a stem-loop structure at the 5' splice site. *Mol. Cell Biol.*, **31**, 1812–1821.
- Guil,S., Gattoni,R., Carrascal,M., Abian,J., Stevenin,J. and Bach-Elias,M. (2003) Roles of hnRNP A1, SR proteins, and p68 helicase in c-H-ras alternative splicing regulation. *Mol. Cell Biol.*, **23**, 2927–2941.
- Germann,S., Grataidou,L., Zonta,E., Dardenne,E., Gaudineau,B., Fougere,M., Samaan,S., Dutertre,M., Jauliac,S. and Auboeuf,D. (2012) Dual role of the ddx5/ddx17 RNA helicases in the control of the pro-migratory NFAT5 transcription factor. *Oncogene*, **31**, 4536–4549.
- Dardenne,E., Pierredon,S., Driouch,K., Grataidou,L., Lacroix-Triki,M., Espinoza,M.P., Zonta,E., Germann,S., Mortada,H., Villemin,J.P. *et al.* (2012) Splicing switch of an epigenetic regulator by RNA helicases promotes tumor-cell invasiveness. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **19**, 1139–1146.
- Kelemen,O., Convertini,P., Zhang,Z., Wen,Y., Shen,M., Falalueva,M. and Stamm,S. (2013) Function of alternative splicing. *Gene*, **514**, 1–30.
- Auboeuf,D., Honig,A., Berget,S.M. and O'Malley,B.W. (2002) Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators. *Science*, **298**, 416–419.
- Barbier,J., Dutertre,M., Bittencourt,D., Sanchez,G., Grataidou,L., de la Grange,P. and Auboeuf,D. (2007) Regulation of H-ras splice variant expression by cross talk between the p53 and nonsense-mediated mRNA decay pathways. *Mol. Cell Biol.*, **27**, 7315–7333.
- Zonta,E., Bittencourt,D., Samaan,S., Germann,S., Dutertre,M. and Auboeuf,D. (2013) The RNA helicase DDX5/p68 is a key factor promoting c-fos expression at different levels from transcription to mRNA export. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 554–564.
- Endoh,H., Maruyama,K., Masuhiro,Y., Kobayashi,Y., Goto,M., Tai,H., Yanagisawa,J., Metzger,D., Hashimoto,S. and Kato,S. (1999) Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 5363–5372.
- Wortham,N.C., Ahamed,E., Nicol,S.M., Thomas,R.S., Periyasamy,M., Jiang,J., Ochocka,A.M., Shousha,S., Huson,L., Bray,S.E. *et al.* (2009) The DEAD-box protein p72 regulates ERalpha/oestrogen-dependent transcription and cell growth, and is associated with improved survival in ERalpha-positive breast cancer. *Oncogene*, **28**, 4053–4064.
- Zhang,X., Krutchinsky,A., Fukuda,A., Chen,W., Yamamura,S., Chait,B.T. and Roeder,R.G. (2005) MED1/TRAP220 exists predominantly in a TRAP/ Mediator subpopulation enriched in RNA polymerase II and is required for ER-mediated transcription. *Mol. Cell*, **19**, 89–100.
- Varlakhanova,N., Snyder,C., Jose,S., Hahn,J.B. and Privalsky,M.L. (2010) Estrogen receptors recruit SMRT and N-CoR corepressors through newly recognized contacts between the corepressor N terminus and the receptor DNA binding domain. *Mol. Cell Biol.*, **30**, 1434–1445.
- Medunjanin,S., Hermani,A., De Servi,B., Grisouard,J., Rincke,G. and Mayer,D. (2005) Glycogen synthase kinase-3 interacts with and phosphorylates estrogen receptor alpha and is involved in the regulation of receptor activity. *J. Biol. Chem.*, **280**, 33006–33014.
- Schutz,S.V., Schrader,A.J., Zengerling,F., Genze,F., Cronauer,M.V. and Schrader,M. (2011) Inhibition of glycogen synthase kinase-3beta counteracts ligand-independent activity of the androgen receptor in castration resistant prostate cancer. *PLoS One*, **6**, e25341.
- Wood-Kaczmar,A., Kraus,M., Ishiguro,K., Philpott,K.L. and Gordon-Weeks,P.R. (2009) An alternatively spliced form of glycogen synthase kinase-3beta is targeted to growing neurites and growth cones. *Mol. Cell Neurosci.*, **42**, 184–194.
- Mukai,F., Ishiguro,K., Sano,Y. and Fujita,S.C. (2002) Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta. *J. Neurochem.*, **81**, 1073–1083.
- Schaffer,B., Wiedau-Pazos,M. and Geschwind,D.H. (2003) Gene structure and alternative splicing of glycogen synthase kinase 3 beta (GSK-3beta) in neural and non-neural tissues. *Gene*, **302**, 73–81.
- Castano,Z., Gordon-Weeks,P.R. and Kypta,R.M. (2010) The neuron-specific isoform of glycogen synthase kinase-3beta is required for axon growth. *J. Neurochem.*, **113**, 117–130.
- Kwok,J.B., Hallupp,M., Loy,C.T., Chan,D.K., Woo,J., Mellick,G.D., Buchanan,D.D., Silburn,P.A., Halliday,G.M. and Schofield,P.R. (2005) GSK3B polymorphisms alter transcription and splicing in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.*, **58**, 829–839.
- Kim,H.M., Kim,C.S., Lee,J.H., Jang,S.J., Hwang,J.J., Ro,S. and Choi,J. (2013) CG0009, a novel glycogen synthase kinase 3 inhibitor, induces cell death through cyclin D1 depletion in breast cancer cells. *PLoS One*, **8**, e60383.
- Liao,X., Thrasher,J.B., Holzbeierlein,J., Stanley,S. and Li,B. (2004) Glycogen synthase kinase-3beta activity is required for androgen-stimulated gene expression in prostate cancer. *Endocrinology*, **145**, 2941–2949.

35. Mazor, M., Kawano, Y., Zhu, H., Waxman, J. and Kypta, R.M. (2004) Inhibition of glycogen synthase kinase-3 represses androgen receptor activity and prostate cancer cell growth. *Oncogene*, **23**, 7882–7892.
36. Rossow, K.L. and Janknecht, R. (2003) Synergism between p68 RNA helicase and the transcriptional coactivators CBP and p300. *Oncogene*, **22**, 151–156.
37. Shin, S. and Janknecht, R. (2007) Concerted activation of the Mdm2 promoter by p72 RNA helicase and the coactivators p300 and P/CAF. *J. Cell Biochem.*, **101**, 1252–1265.
38. Wilson, B.J., Bates, G.J., Nicol, S.M., Gregory, D.J., Perkins, N.D. and Fuller-Pace, F.V. (2004) The p68 and p72 DEAD box RNA helicases interact with HDAC1 and repress transcription in a promoter-specific manner. *BMC Mol. Biol.*, **5**, 11.
39. Laurent, F.X., Sureau, A., Klein, A.F., Trouslard, F., Gasnier, E., Furling, D. and Marie, J. (2012) New function for the RNA helicase p68/DDX5 as a modifier of MBNL1 activity on expanded CUG repeats. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 3159–3171.
40. Clark, E.L., Fuller-Pace, F.V., Elliott, D.J. and Robson, C.N. (2008) Coupling transcription to RNA processing via the p68 DEAD box RNA helicase androgen receptor co-activator in prostate cancer. *Biochem. Soc. Trans.*, **36**, 546–547.
41. Clark, E.L., Hadjimichael, C., Temperley, R., Barnard, A., Fuller-Pace, F.V. and Robson, C.N. (2013) p68/Ddx5 supports beta-catenin & RNAP II during androgen receptor mediated transcription in prostate cancer. *PLoS One*, **8**, e54150.
42. Kadener, S., Fededa, J.P., Rosbash, M. and Kornblihtt, A.R. (2002) Regulation of alternative splicing by a transcriptional enhancer through RNA pol II elongation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 8185–8190.
43. Han, B., Mehra, R., Dhanasekaran, S.M., Yu, J., Menon, A., Lonigro, R.J., Wang, X., Gong, Y., Wang, L., Shankar, S. et al. (2008) A fluorescence in situ hybridization screen for E26 transformation-specific aberrations: identification of DDX5-ETV4 fusion protein in prostate cancer. *Cancer Res.*, **68**, 7629–7637.
44. Janknecht, R. (2010) Multi-talented DEAD-box proteins and potential tumor promoters: p68 RNA helicase (DDX5) and its paralog, p72 RNA helicase (DDX17). *Am. J. Transl. Res.*, **2**, 223–234.
45. Wang, D., Huang, J. and Hu, Z. (2012) RNA helicase DDX5 regulates microRNA expression and contributes to cytoskeletal reorganization in basal breast cancer cells. *Mol. Cell. Proteom.*, **11**, M111 011932.
46. Graham, J.D., Bain, D.L., Richer, J.K., Jackson, T.A., Tung, L. and Horwitz, K.B. (2000) Thoughts on tamoxifen resistant breast cancer Are coregulators the answer or just a red herring? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **74**, 255–259.
47. Nagalingam, A., Tighiouart, M., Ryden, L., Joseph, L., Landberg, G., Saxena, N.K. and Sharma, D. (2012) Med1 plays a critical role in the development of tamoxifen resistance. *Carcinogenesis*, **33**, 918–930.
48. van Agthoven, T., Sieuwerts, A.M., Veldscholte, J., Meijer-van Gelder, M.E., Smid, M., Brinkman, A., den Dekker, A.T., Leroy, I.M., van Ijcken, W.F., Sleijfer, S. et al. (2009) CITED2 and NCOR2 in anti-oestrogen resistance and progression of breast cancer. *Br. J. Cancer*, **101**, 1824–1832.
49. Caldon, C.E., Sergio, C.M., Kang, J., Muthukaruppan, A., Boersma, M.N., Stone, A., Barraclough, J., Lee, C.S., Black, M.A., Miller, L.D. et al. (2012) Cyclin E2 overexpression is associated with endocrine resistance but not insensitivity to CDK2 inhibition in human breast cancer cells. *Mol. Cancer Therapeut.*, **11**, 1488–1499.
50. Oyama, M., Nagashima, T., Suzuki, T., Kozuka-Hata, H., Yumoto, N., Shiraiishi, Y., Ikeda, K., Kuroki, Y., Gotoh, N., Ishida, T. et al. (2011) Integrated quantitative analysis of the phosphoproteome and transcriptome in tamoxifen-resistant breast cancer. *J. Biol. Chem.*, **286**, 818–829.
51. Plaza-Menacho, I., Morandi, A., Robertson, D., Pancholi, S., Drury, S., Dowsett, M., Martin, L.A. and Isacke, C.M. (2010) Targeting the receptor tyrosine kinase RET sensitizes breast cancer cells to tamoxifen treatment and reveals a role for RET in endocrine resistance. *Oncogene*, **29**, 4648–4657.
52. Yamashita, H., Nishio, M., Toyama, T., Sugiura, H., Kondo, N., Kobayashi, S., Fujii, Y. and Iwase, H. (2008) Low phosphorylation of estrogen receptor alpha (ERalpha) serine 118 and high phosphorylation of ERalpha serine 167 improve survival in ER-positive breast cancer. *Endocrine-related Cancer*, **15**, 755–763.
53. Dutertre, M., Grataudou, L., Dardenne, E., Germann, S., Samaan, S., Lidereau, R., Driouch, K., de la Grange, P. and Auboeuf, D. Estrogen regulation and physiopathologic significance of alternative promoters in breast cancer. *Cancer Res.*, **70**, 3760–3770.
54. Kondo, N., Toyama, T., Sugiura, H., Fujii, Y. and Yamashita, H. (2008) miR-206 Expression is down-regulated in estrogen receptor alpha-positive human breast cancer. *Cancer Res.*, **68**, 5004–5008.

Bibliographie

Note : Récemment, plusieurs publications provenant de l'équipe S. Kato ont été retirées pour fraudes scientifiques. Cela comprend notamment l'article *Endoh et al. 1999* qui est la première mise en évidence du rôle de Ddx5 comme corégulateur du récepteur aux estrogènes. Cependant, la plupart des résultats obtenus par cette équipe à propos du rôle de DDX5 et Ddx17 comme corégulateurs transcriptionnels, ou régulateurs des microARNs ont été confirmés par d'autres auteurs.

Anczuków, O., Rosenberg, A. Z., Akerman, M., Das, S., Zhan, L., Karni, R., ... Krainer, A. R. (2012). The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation. *Nature Structural & Molecular Biology*, *19*(2), 220–8. doi:10.1038/nsmb.2207

André, F., Michiels, S., Dessen, P., Scott, V., Suciu, V., Uzan, C., ... Delaloge, S. (2009). Exonic expression profiling of breast cancer and benign lesions: a retrospective analysis. *The Lancet Oncology*, *10*(4), 381–90. doi:10.1016/S1470-2045(09)70024-5

Ansieau, S., Bastid, J., Doreau, A., Morel, A.-P., Bouchet, B. P., Thomas, C., ... Puisieux, A. (2008). Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell*, *14*(1), 79–89. doi:10.1016/j.ccr.2008.06.005

Aslakson, C. J., & Miller, F. R. (1992). Selective Events in the Metastatic Process Defined by Analysis of the Sequential Dissemination of Subpopulations of a Mouse Mammary Tumor Selective Events in the Metastatic Process Defined by Analysis of the Sequential Dissemination of Subpopulations of a, 1399–1405.

Auboeuf, D., Batsché, E., Dutertre, M., Muchardt, C., & O'Malley, B. W. (2007). Coregulators: transducing signal from transcription to alternative splicing. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *18*(3), 122–9. doi:10.1016/j.tem.2007.02.003

Auweter, S. D., Oberstrass, F. C., & Zu, C.-. (2006). Sequence-specific binding of single-stranded RNA: is there a code for recognition ?, *34*(17), 4943–4959. doi:10.1093/nar/gkl620

- Barash, Y., Calarco, J. a, Gao, W., Pan, Q., Wang, X., Shai, O., ... Frey, B. J. (2010). Deciphering the splicing code. *Nature*, 465(7294), 53–9. doi:10.1038/nature09000
- Barta, I., & Iggo, R. (1995). Autoregulation of expression of the yeast Dbp2p “DEAD-box” protein is mediated by sequences in the conserved DBP2 intron. *The EMBO Journal*, 14(15), 3800–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=394454&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bates, G. J., Nicol, S. M., Wilson, B. J., Jacobs, A.-M. F., Bourdon, J.-C., Wardrop, J., ... Fuller-Pace, F. V. (2005). The DEAD box protein p68: a novel transcriptional coactivator of the p53 tumour suppressor. *The EMBO Journal*, 24(3), 543–53. doi:10.1038/sj.emboj.7600550
- Beltran, M., Puig, I., Peña, C., García, J. M., Alvarez, A. B., Peña, R., ... de Herreros, A. G. (2008). A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Genes & Development*, 22(6), 756–69. doi:10.1101/gad.455708
- Berget, S. M., Moore, C., & Sharp, P. a. (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. 1977. *Reviews in Medical Virology*, 10(6), 356–62; discussion 355–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11114075>
- Berx, G., & van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(6), a003129. doi:10.1101/cshperspect.a003129
- Bhowmick, N. a, Chytil, A., Plieth, D., Gorska, A. E., Dumont, N., Shappell, S., ... Moses, H. L. (2004). TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5659), 848–51. doi:10.1126/science.1090922
- Bhowmick, N. A., Neilson, E. G., & Moses, H. L. (2004). and progression, 432(November).

- Bond, A. T., Mangus, D. A., He, F., & Jacobson, A. (2001). Absence of Dbp2p Alters Both Nonsense-Mediated mRNA Decay and rRNA Processing. *Journal of Molecular Biology*, 311(1), 1–11. doi:10.1128/MCB.21.21.7366
- Bonnal, S., Vigevani, L., & Valcárcel, J. (2012). The spliceosome as a target of novel antitumour drugs. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 11(11), 847–59. doi:10.1038/nrd3823
- Brabletz, T., Jung, a, Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L. a, ... Kirchner, T. (2001). Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(18), 10356–61. doi:10.1073/pnas.171610498
- Braeutigam, C., Rago, L., Rolke, a, Waldmeier, L., Christofori, G., & Winter, J. (2013). The RNA-binding protein Rbfox2: an essential regulator of EMT-driven alternative splicing and a mediator of cellular invasion. *Oncogene*, (January), 1–11. doi:10.1038/onc.2013.50
- Buelt, M. K., Glidden, B. J., & Storm, D. R. (1994). *Journal of Molecular Biology*, 236(2), 29367–29370.
- Buszczak, M., & Spradling, A. C. (2006a). The Drosophila P68 RNA helicase regulates transcriptional deactivation by promoting RNA release from chromatin. *Genes & Development*, 20(8), 977–89. doi:10.1101/gad.1396306
- Buszczak, M., & Spradling, A. C. (2006b). The Drosophila P68 RNA helicase regulates transcriptional deactivation by promoting RNA release from chromatin. *Genes & Development*, 20(8), 977–89. doi:10.1101/gad.1396306
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., ... Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), 15524–9. doi:10.1073/pnas.242606799

- Caretti, G., Schiltz, R. L., Dilworth, F. J., Di Padova, M., Zhao, P., Ogryzko, V., ... Sartorelli, V. (2006). The RNA helicases p68/p72 and the noncoding RNA SRA are coregulators of MyoD and skeletal muscle differentiation. *Developmental Cell*, *11*(4), 547–60. doi:10.1016/j.devcel.2006.08.003
- Carter, C. L., Lin, C., Liu, C.-Y., Yang, L., & Liu, Z.-R. (2010). Phosphorylated p68 RNA helicase activates Snail1 transcription by promoting HDAC1 dissociation from the Snail1 promoter. *Oncogene*, *29*(39), 5427–36. doi:10.1038/onc.2010.276
- Caruthers, J. M., & McKay, D. B. (2002). Helicase structure and mechanism. *Current Opinion in Structural Biology*, *12*(1), 123–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11839499>
- Causevic, M., Hislop, R. G., Kernohan, N. M., Carey, F. a, Kay, R. a, Steele, R. J., & Fuller-Pace, F. V. (2001). Overexpression and poly-ubiquitylation of the DEAD-box RNA helicase p68 in colorectal tumours. *Oncogene*, *20*(53), 7734–43. doi:10.1038/sj.onc.1204976
- Chakrabarti, R., Hwang, J., Andres Blanco, M., Wei, Y., Lukačičin, M., Romano, R.-A., ... Kang, Y. (2012). Elf5 inhibits the epithelial-mesenchymal transition in mammary gland development and breast cancer metastasis by transcriptionally repressing Snail2. *Nature Cell Biology*, *14*(11), 1212–1222. doi:10.1038/ncb2607
- Chen, J., & Weiss, W. a. (2014). Alternative splicing in cancer: implications for biology and therapy. *Oncogene*, (October 2013), 1–14. doi:10.1038/onc.2013.570
- Chen, S., & Parmigiani, G. (2007). Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *25*(11), 1329–33. doi:10.1200/JCO.2006.09.1066
- Chin, K., DeVries, S., Fridlyand, J., Spellman, P. T., Roydasgupta, R., Kuo, W.-L., ... Gray, J. W. (2006). Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. *Cancer Cell*, *10*(6), 529–41. doi:10.1016/j.ccr.2006.10.009
- Choi, Y.-J., & Lee, S.-G. (2012). The DEAD-box RNA helicase DDX3 interacts with DDX5, co-localizes with it in the cytoplasm during the G2/M phase of the cycle, and affects its

- shuttling during mRNP export. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(3), 985–96. doi:10.1002/jcb.23428
- Cieply, B., Riley, P., Pifer, P. M., Widmeyer, J., Addison, J. B., Ivanov, A. V, ... Frisch, S. M. (2012). Suppression of the epithelial-mesenchymal transition by Grainyhead-like-2. *Cancer Research*, 72(9), 2440–53. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-4038
- Clark, E. L., Coulson, A., Dalgliesh, C., Rajan, P., Nicol, S. M., Fleming, S., ... Robson, C. N. (2008). The RNA helicase p68 is a novel androgen receptor coactivator involved in splicing and is overexpressed in prostate cancer. *Cancer Research*, 68(19), 7938–46. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0932
- Clark, E. L., Hadjimichael, C., Temperley, R., Barnard, A., Fuller-Pace, F. V, & Robson, C. N. (2013). p68/Ddx5 supports β -catenin & RNAP II during androgen receptor mediated transcription in prostate cancer. *PloS One*, 8(1), e54150. doi:10.1371/journal.pone.0054150
- Cloutier, S. C., Ma, W. K., Nguyen, L. T., & Tran, E. J. (2012). The DEAD-box RNA helicase Dbp2 connects RNA quality control with repression of aberrant transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(31), 26155–66. doi:10.1074/jbc.M112.383075
- Cordin, O., Hahn, D., & Beggs, J. D. (2012). Structure, function and regulation of spliceosomal RNA helicases. *Current Opinion in Cell Biology*, 24(3), 431–8. doi:10.1016/j.ceb.2012.03.004
- Cordin, O., Tanner, N. K., Linder, P., & Banroques, J. (2004). The newly discovered Q motif of DEAD-box RNA helicases regulates RNA-binding and helicase activity, 23(13), 2478–2487. doi:10.1038/sj.emboj.7600272
- Corney, D. C., Hwang, C.-I., Matoso, A., Vogt, M., Flesken-Nikitin, A., Godwin, A. K., ... Nikitin, A. Y. (2010). Frequent downregulation of miR-34 family in human ovarian cancers. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 16(4), 1119–28. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2642
- Costanzi, C., & Pehrson, J. R. (1998). of female mammals, 628(1997), 1997–1999.

- Creppe, C., Janich, P., Cantariño, N., Noguera, M., Valero, V., Musulén, E., ... Buschbeck, M. (2012). MacroH2A1 regulates the balance between self-renewal and differentiation commitment in embryonic and adult stem cells. *Molecular and Cellular Biology*, 32(8), 1442–52. doi:10.1128/MCB.06323-11
- Darnell, R. B., Jelen, N., Ule, J., & Marko, Z. (2007). Evolution of Nova-Dependent Splicing Regulation in the Brain, 3(10). doi:10.1371/journal.pgen.0030173
- David, C. J., Boyne, A. R., Millhouse, S. R., & Manley, J. L. (2011). activation through recruitment of a U2AF65 – Prp19 complex The RNA polymerase II C-terminal domain promotes splicing activation through recruitment of a U2AF65 – Prp19 complex, 972–983. doi:10.1101/gad.2038011
- David, C. J., Chen, M., Assanah, M., Canoll, P., & Manley, J. L. (2010). HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature*, 463(7279), 364–8. doi:10.1038/nature08697
- Davis, B. N., Hilyard, A. C., Lagna, G., & Hata, A. (2008). SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature*, 454(7200), 56–61. doi:10.1038/nature07086
- Dey, H., & Liu, Z.-R. (2012). Phosphorylation of p68 RNA helicase by p38 MAP kinase contributes to colon cancer cells apoptosis induced by oxaliplatin. *BMC Cell Biology*, 13(1), 27. doi:10.1186/1471-2121-13-27
- Dutertre, M., Gratadou, L., Dardenne, E., Germann, S., Samaan, S., Lidereau, R., ... Auboeuf, D. (2010). Estrogen regulation and physiopathologic significance of alternative promoters in breast cancer. *Cancer Research*, 70(9), 3760–70. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3988
- Elenbaas, B. (2001). Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes & Development*, 15(1), 50–65. doi:10.1101/gad.828901
- Endoh, H., Maruyama, K., Masuhiro, Y., Kobayashi, Y., Goto, M., Tai, H., ... Hashimoto, S. (1999). Purification and Identification of p68 RNA Helicase Acting as a Transcriptional

Coactivator Specific for the Activation Function 1 of Human Estrogen Receptor α
Purification and Identification of p68 RNA Helicase Acting as a Transcriptional
Coactivator Spe.

Fairman-williams, M. E., & Guenther, U. (2010). SF1 and SF2 helicases : family matters, 313–
324. doi:10.1016/j.sbi.2010.03.011

Flaberg, E., Guven, H., Savchenko, A., Pavlova, T., Kashuba, V., Szekely, L., & Klein, G. (2012).
The architecture of fibroblast monolayers of different origin differentially influences
tumor cell growth. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*,
131(10), 2274–83. doi:10.1002/ijc.27521

Folkman, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nature Reviews*.
Drug Discovery, 6(4), 273–86. doi:10.1038/nrd2115

Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs
are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, 19(1), 92–105.
doi:10.1101/gr.082701.108

Fukuda, T., Yamagata, K., Fujiyama, S., Matsumoto, T., Koshida, I., Yoshimura, K., ... Kato, S.
(2007). DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for
processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nature Cell Biology*, 9(5), 604–11.
doi:10.1038/ncb1577

Fuller-Pace, F. V. (2013). The DEAD box proteins DDX5 (p68) and DDX17 (p72): Multi-tasking
transcriptional regulators. *Biochimica et Biophysica Acta*, 5.
doi:10.1016/j.bbagr.2013.03.004

Fuller-Pace, F. V., & Ali, S. (2008). The DEAD box RNA helicases p68 (Ddx5) and p72 (Ddx17):
novel transcriptional co-regulators. *Biochemical Society Transactions*, 36(Pt 4), 609–12.
doi:10.1042/BST0360609

Gamble, M. J., Frizzell, K. M., Yang, C., Krishnakumar, R., & Kraus, W. L. (2010). The histone
variant macroH2A1 marks repressed autosomal chromatin, but protects a subset of its

target genes from silencing. *Genes & Development*, 24(1), 21–32.
doi:10.1101/gad.1876110

Geißler, V., Altmeyer, S., Stein, B., Uhlmann-Schiffler, H., & Stahl, H. (2013). The RNA helicase Ddx5/p68 binds to hUpf3 and enhances NMD of Ddx17/p72 and Smg5 mRNA. *Nucleic Acids Research*, 41(16), 7875–88. doi:10.1093/nar/gkt538

Germann, S., Gratadou, L., Zonta, E., Dardenne, E., Gaudineau, B., Fougère, M., ... Auboeuf, D. (2012). Dual role of the ddx5/ddx17 RNA helicases in the control of the pro-migratory NFAT5 transcription factor. *Oncogene*, 31(42), 4536–49. doi:10.1038/onc.2011.618

Ghigna, C., Giordano, S., Shen, H., Benvenuto, F., Castiglioni, F., Comoglio, P. M., ... Biamonti, G. (2005). Cell motility is controlled by SF2/ASF through alternative splicing of the Ron protooncogene. *Molecular Cell*, 20(6), 881–90. doi:10.1016/j.molcel.2005.10.026

Goswami, S., Philippar, U., Sun, D., Patsialou, A., Avraham, J., Wang, W., ... Condeelis, J. S. (2009). Identification of invasion specific splice variants of the cytoskeletal protein Mena present in mammary tumor cells during invasion in vivo. *Clinical & Experimental Metastasis*, 26(2), 153–9. doi:10.1007/s10585-008-9225-8

Gregory, P. a, Bert, A. G., Paterson, E. L., Barry, S. C., Tsykin, A., Farshid, G., ... Goodall, G. J. (2008). The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature Cell Biology*, 10(5), 593–601. doi:10.1038/ncb1722

Guil, S., Gattoni, R., Stévenin, J., Bach-elias, M., & Ste, J. (2003). Helicase in c-H- ras Alternative Splicing Regulation Roles of hnRNP A1 , SR Proteins , and p68 Helicase in c-H-ras Alternative Splicing Regulation So. doi:10.1128/MCB.23.8.2927

Guo, S., Li, Y., Tong, Q., Gu, F., Zhu, T., Fu, L., & Yang, S. (2012). δ EF1 down-regulates ER- α expression and confers tamoxifen resistance in breast cancer. *PloS One*, 7(12), e52380. doi:10.1371/journal.pone.0052380

- Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, a S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W., & Weinberg, R. a. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, *400*(6743), 464–8. doi:10.1038/22780
- Han, B., Mehra, R., Dhanasekaran, S. M., Yu, J., Menon, A., Lonigro, R. J., ... Chinnaiyan, A. M. (2008). A fluorescence in situ hybridization screen for E26 transformation-specific aberrations: identification of DDX5-ETV4 fusion protein in prostate cancer. *Cancer Research*, *68*(18), 7629–37. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2014
- Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, *21*(3), 309–22. doi:10.1016/j.ccr.2012.02.022
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>
- Hanahan, D., Weinberg, R. A., & Francisco, S. (2000). The Hallmarks of Cancer Review University of California at San Francisco, *100*, 57–70.
- Hartmuth, K., Urlaub, H., Vornlocher, H.-P., Will, C. L., Gentzel, M., Wilm, M., & Lührmann, R. (2002). Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(26), 16719–24. doi:10.1073/pnas.262483899
- Hegele, A., Kamburov, A., Grossmann, A., Sourlis, C., Wowro, S., Weimann, M., ... Stelzl, U. (2012). Dynamic protein-protein interaction wiring of the human spliceosome. *Molecular Cell*, *45*(4), 567–80. doi:10.1016/j.molcel.2011.12.034
- Helicase, A. D. R. N. A., Hönig, A., Auboeuf, D., Parker, M. M., Bert, W., Malley, O., ... Malley, B. W. O. (2002). Regulation of Alternative Splicing by the Regulation of Alternative Splicing by the ATP-Dependent DEAD-Box RNA Helicase p72 Arnd Ho. doi:10.1128/MCB.22.16.5698
- Hochedlinger, K., & Plath, K. (2009). Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development (Cambridge, England)*, *136*(4), 509–23. doi:10.1242/dev.020867

- Hong, S., Noh, H., Chen, H., Padia, R., Pan, Z. K., Su, S.-B., ... Huang, S. (2013). Signaling by p38 MAPK Stimulates Nuclear Localization of the Microprocessor Component p68 for Processing of Selected Primary MicroRNAs. *Science Signaling*, 6(266), ra16. doi:10.1126/scisignal.2003706
- Horiguchi, K., Sakamoto, K., Koinuma, D., Semba, K., Inoue, a, Inoue, S., ... Saitoh, M. (2012). TGF- β drives epithelial-mesenchymal transition through δ EF1-mediated downregulation of ESRP. *Oncogene*, 31(26), 3190–201. doi:10.1038/onc.2011.493
- Hovhannisyan, R. H., & Carstens, R. P. (2005). A Novel Intronic cis Element , ISE / ISS-3 , Regulates Rat Fibroblast Growth Factor Receptor 2 Splicing through Activation of an Upstream Exon and Repression of a Downstream Exon Containing a Noncanonical Branch Point Sequence A Novel Intronic cis Element. doi:10.1128/MCB.25.1.250
- Hu, M., Yao, J., Carroll, D. K., Weremowicz, S., Chen, H., Carrasco, D., ... Polyak, K. (2008). Regulation of in situ to invasive breast carcinoma transition. *Cancer Cell*, 13(5), 394–406. doi:10.1016/j.ccr.2008.03.007
- Hu, X., Macdonald, D. M., Huettner, P. C., Feng, Z., El Naqa, I. M., Schwarz, J. K., ... Wang, X. (2009). A miR-200 microRNA cluster as prognostic marker in advanced ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 114(3), 457–64. doi:10.1016/j.ygyno.2009.05.022
- Huang, Y., Li, W., Yao, X., Lin, Q.-J., Yin, J.-W., Liang, Y., ... Wang, G. (2012). Mediator complex regulates alternative mRNA processing via the MED23 subunit. *Molecular Cell*, 45(4), 459–69. doi:10.1016/j.molcel.2011.12.022
- Huelga, S. C., Vu, A. Q., Arnold, J. D., Liang, T. Y., Liu, P. P., Yan, B. Y., ... Yeo, G. W. (2012). Integrative genome-wide analysis reveals cooperative regulation of alternative splicing by hnRNP proteins. *Cell Reports*, 1(2), 167–78. doi:10.1016/j.celrep.2012.02.001
- Iggo, R. D., Jamieson, D. J., Macneill, S. A., Southgate, J., Mcpheat, J., & Lanet, A. P. (1991). p68 RNA Helicase : Identification of a Nucleolar Form and Cloning of Related Genes Containing a Conserved Intron in Yeasts. doi:10.1128/MCB.11.3.1326.Updated

- Israelsen, W. J., Dayton, T. L., Davidson, S. M., Fiske, B. P., Hosios, A. M., Bellinger, G., ... Vander Heiden, M. G. (2013). PKM2 isoform-specific deletion reveals a differential requirement for pyruvate kinase in tumor cells. *Cell*, *155*(2), 397–409. doi:10.1016/j.cell.2013.09.025
- Jacobs, a-M. F., Nicol, S. M., Hislop, R. G., Jaffray, E. G., Hay, R. T., & Fuller-Pace, F. V. (2007). SUMO modification of the DEAD box protein p68 modulates its transcriptional activity and promotes its interaction with HDAC1. *Oncogene*, *26*(40), 5866–76. doi:10.1038/sj.onc.1210387
- Jalal, C., Uhlmann-Schiffler, H., & Stahl, H. (2007). Redundant role of DEAD box proteins p68 (Ddx5) and p72/p82 (Ddx17) in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Nucleic Acids Research*, *35*(11), 3590–601. doi:10.1093/nar/gkm058
- Janknecht, R. (2010). Multi-talented DEAD-box proteins and potential tumor promoters: p68 RNA helicase (DDX5) and its paralog, p72 RNA helicase (DDX17). *American Journal of Translational Research*, *2*(3), 223–34. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2892403&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Jensen, E. D., Niu, L., Caretti, G., Nicol, S. M., Teplyuk, N., Stein, G. S., ... Westendorf, J. J. (2008). p68 (Ddx5) interacts with Runx2 and regulates osteoblast differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, *103*(5), 1438–51. doi:10.1002/jcb.21526
- Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2009). Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition, *119*(6). doi:10.1172/JCI39104.1420
- Kapoor, A., Goldberg, M. S., Cumberland, L. K., Ratnakumar, K., Segura, M. F., Emanuel, P. O., ... Bernstein, E. (2010). The histone variant macroH2A suppresses melanoma progression through regulation of CDK8. *Nature*, *468*(7327), 1105–9. doi:10.1038/nature09590
- Kar, A., Fushimi, K., Zhou, X., Ray, P., Shi, C., Chen, X., ... Wu, J. Y. (2011). RNA helicase p68 (DDX5) regulates tau exon 10 splicing by modulating a stem-loop structure at the 5' splice site. *Molecular and Cellular Biology*, *31*(9), 1812–21. doi:10.1128/MCB.01149-10

- Keirsebilck, A., Bonne, S., Staes, K., Hengel, J. Van, Nollet, F., Reynolds, A., & Roy, F. Van. (1998). Molecular Cloning of the Human p120 ctn Catenin Gene (CTNND1): Expression of Multiple Alternatively Spliced Isoforms, *146*, 129–146.
- Khodor, Y. L., Rodriguez, J., Abruzzi, K. C., Tang, C. A., Li, M. T. M., & Rosbash, M. (2011). Nascent-seq indicates widespread cotranscriptional pre-mRNA splicing in *Drosophila*, 2502–2512. doi:10.1101/gad.178962.111.CTD
- Kornblihtt, A. R., Schor, I. E., Alló, M., Dujardin, G., Petrillo, E., & Muñoz, M. J. (2013). Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *14*(3), 153–65. doi:10.1038/nrm3525
- Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews. Genetics*, *11*(9), 597–610. doi:10.1038/nrg2843
- Kumar, M. S., Lu, J., Mercer, K. L., Golub, T. R., & Jacks, T. (2007). Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nature Genetics*, *39*(5), 673–7. doi:10.1038/ng2003
- Kustatscher, G., Hothorn, M., Pugieux, C., Scheffzek, K., & Ladurner, A. G. (2005). Splicing regulates NAD metabolite binding to histone macroH2A. *Nature Structural & Molecular Biology*, *12*(7), 624–5. doi:10.1038/nsmb956
- Lamm, G. M., Nicol, S. M., Fuller-Pace, F. V, & Lamond, a I. (1996). p72: a human nuclear DEAD box protein highly related to p68. *Nucleic Acids Research*, *24*(19), 3739–47. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=146168&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Lapuk, A., Marr, H., Jakkula, L., Pedro, H., Bhattacharya, S., Purdom, E., ... Gray, J. W. (2010). Exon-level microarray analyses identify alternative splicing programs in breast cancer. *Molecular Cancer Research : MCR*, *8*(7), 961–74. doi:10.1158/1541-7786.MCR-09-0528

- Larriba, M. J., Martín-Villar, E., García, J. M., Pereira, F., Peña, C., de Herreros, A. G., ... Muñoz, A. (2009). Snail2 cooperates with Snail1 in the repression of vitamin D receptor in colon cancer. *Carcinogenesis*, *30*(8), 1459–68. doi:10.1093/carcin/bgp140
- Laurent, F.-X., Sureau, A., Klein, A. F., Trouslard, F., Gasnier, E., Furling, D., & Marie, J. (2012). New function for the RNA helicase p68/DDX5 as a modifier of MBNL1 activity on expanded CUG repeats. *Nucleic Acids Research*, *40*(7), 3159–71. doi:10.1093/nar/gkr1228
- Lazarov, M., Kubo, Y., Cai, T., Dajee, M., Tarutani, M., Lin, Q., ... Khavari, P. a. (2002). CDK4 coexpression with Ras generates malignant human epidermal tumorigenesis. *Nature Medicine*, *8*(10), 1105–14. doi:10.1038/nm779
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, *23*(20), 4051–60. doi:10.1038/sj.emboj.7600385
- Li, X., Kuang, J., Shen, Y., Majer, M. M., Nelson, C. C., Parsawar, K., ... Kuwada, S. K. (2012). The atypical histone macroH2A1.2 interacts with HER-2 protein in cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(27), 23171–83. doi:10.1074/jbc.M112.379412
- Lin, C., Yang, L., Yang, J. J., Huang, Y., & Liu, Z. (2005). ATPase / Helicase Activities of p68 RNA Helicase Are Required for Pre-mRNA Splicing but Not for Assembly of the Spliceosome
ATPase / Helicase Activities of p68 RNA Helicase Are Required for Pre-mRNA Splicing but Not for Assembly of the Spliceosome. doi:10.1128/MCB.25.17.7484
- Liu, Q., Fu, H., Sun, F., Zhang, H., Tie, Y., Zhu, J., ... Zheng, X. (2008). miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes. *Nucleic Acids Research*, *36*(16), 5391–404. doi:10.1093/nar/gkn522
- Liu, Z. (2002). p68 RNA Helicase Is an Essential Human Splicing Factor That Acts at the U1 snRNA-5' Splice Site Duplex
p68 RNA Helicase Is an Essential Human Splicing Factor That Acts at the U1 snRNA-5J Splice Site Duplex, *22*(15). doi:10.1128/MCB.22.15.5443

- Lovci, M. T., Ghanem, D., Marr, H., Arnold, J., Gee, S., Parra, M., ... Yeo, G. W. (2013). Rbfox proteins regulate alternative mRNA splicing through evolutionarily conserved RNA bridges. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(12), 1434–42. doi:10.1038/nsmb.2699
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. a, Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., ... Golub, T. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435(7043), 834–8. doi:10.1038/nature03702
- Luco, R. F., Allo, M., Schor, I. E., Kornblihtt, A. R., & Misteli, T. (2010). Review Epigenetics in Alternative Pre-mRNA Splicing. *Cell*, 144(1), 16–26. doi:10.1016/j.cell.2010.11.056
- Luco, R. F., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B. J., Pereira-Smith, O. M., & Misteli, T. (2010). Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5968), 996–1000. doi:10.1126/science.1184208
- Lund, E., & Dahlberg, J. E. (2006). Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 71, 59–66. doi:10.1101/sqb.2006.71.050
- Lundberg, A. S., Randell, S. H., Stewart, S. a, Elenbaas, B., Hartwell, K. a, Brooks, M. W., ... Hahn, W. C. (2002). Immortalization and transformation of primary human airway epithelial cells by gene transfer. *Oncogene*, 21(29), 4577–86. doi:10.1038/sj.onc.1205550
- Lyko, F. (2007). Methylation of Human MicroRNA Genes in Normal and Neoplastic Cells ND ES SC Key words RIB RIB, (May), 1001–1005.
- Ma, L., Young, J., Prabhala, H., Pan, E., Mestdagh, P., Muth, D., ... Weinberg, R. a. (2010). miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nature Cell Biology*, 12(3), 247–56. doi:10.1038/ncb2024
- Mani, S. a, Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., ... Weinberg, R. a. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133(4), 704–15. doi:10.1016/j.cell.2008.03.027

- Matos, P., & Ã, P. J. (2009). Antagonistic SR proteins regulate alternative splicing of tumor-related Rac1b downstream of the PI3-kinase and Wnt pathways, *18*(19), 3696–3707. doi:10.1093/hmg/ddp317
- Mazurek, A., Luo, W., Krasnitz, A., Hicks, J., Powers, R. S., & Stillman, B. (2012). DDX5 regulates DNA replication and is required for cell proliferation in a subset of breast cancer cells. *Cancer Discovery*, *2*(9), 812–25. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0116
- Mi, J., Liu, Y., Rabbani, Z. N., Yang, Z., Urban, J. H., Sullenger, B. a, & Clary, B. M. (2010). In vivo selection of tumor-targeting RNA motifs. *Nature Chemical Biology*, *6*(1), 22–4. doi:10.1038/nchembio.277
- Miura, K., Fujibuchi, W., & Unno, M. (2012). INVITED REVIEW, *2012*, 212–217.
- Mooney, S. M., Goel, A., D'Assoro, A. B., Salisbury, J. L., & Janknecht, R. (2010). Pleiotropic effects of p300-mediated acetylation on p68 and p72 RNA helicase. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(40), 30443–52. doi:10.1074/jbc.M110.143792
- Mooney, S. M., Grande, J. P., Salisbury, J. L., & Janknecht, R. (2010). Sumoylation of p68 and p72 RNA helicases affects protein stability and transactivation potential. *Biochemistry*, *49*(1), 1–10. doi:10.1021/bi901263m
- Morel, A.-P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., & Puisieux, A. (2008). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*, *3*(8), e2888. doi:10.1371/journal.pone.0002888
- Moreno-Bueno, G., Cubillo, E., Sarrió, D., Peinado, H., Rodríguez-Pinilla, S. M., Villa, S., ... Cano, A. (2006). Genetic profiling of epithelial cells expressing E-cadherin repressors reveals a distinct role for Snail, Slug, and E47 factors in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Research*, *66*(19), 9543–56. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0479
- Netter, C., Weber, G., Benecke, H., & Wahl, M. C. (2009). Functional stabilization of an RNA recognition motif by a noncanonical N-terminal expansion. *RNA (New York, N.Y.)*, *15*(7), 1305–13. doi:10.1261/rna.1359909

- Neubauer, G., King, a, Rappsilber, J., Calvio, C., Watson, M., Ajuh, P., ... Mann, M. (1998). Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nature Genetics*, *20*(1), 46–50. doi:10.1038/1700
- Neve, R. M., Chin, K., Fridlyand, J., Yeh, J., Baehner, F. L., Fevr, T., ... Gray, J. W. (2006). A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, *10*(6), 515–27. doi:10.1016/j.ccr.2006.10.008
- Nicol, S. M., Bray, S. E., Derek Black, H., Lorimore, S. a, Wright, E. G., Lane, D. P., ... Fuller-Pace, F. V. (2012). The RNA helicase p68 (DDX5) is selectively required for the induction of p53-dependent p21 expression and cell-cycle arrest after DNA damage. *Oncogene*, *68*(July), 1–9. doi:10.1038/onc.2012.426
- Novikov, L., Park, J. W., Chen, H., Klerman, H., Jalloh, A. S., & Gamble, M. J. (2011). QKI-mediated alternative splicing of the histone variant MacroH2A1 regulates cancer cell proliferation. *Molecular and Cellular Biology*, *31*(20), 4244–55. doi:10.1128/MCB.05244-11
- Numasaki, M., Watanabe, M., Suzuki, T., Takahashi, H., Nakamura, A., McAllister, F., ... Sasaki, H. (2005). IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *175*(9), 6177–89. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16237115>
- Ocaña, O. H., Córcoles, R., Fabra, A., Moreno-Bueno, G., Acloque, H., Vega, S., ... Nieto, M. A. (2012). Metastatic colonization requires the repression of the epithelial-mesenchymal transition inducer Prrx1. *Cancer Cell*, *22*(6), 709–24. doi:10.1016/j.ccr.2012.10.012
- Of, E., Protein, S. R., & Factors, R. (2013). EVOLUTION OF SR PROTEIN AND HnRNP SPLICING, *3*(1), 1–12. doi:10.1002/wrna.100.EVOLUTION
- Oliveira, A. R. C. P., & Pavarino, E. C. (2012). VEGF gene alternative splicing : pro- and anti-angiogenic isoforms in cancer, 363–370. doi:10.1007/s00432-011-1073-2

- Pandit, S., Zhou, Y., Shiue, L., Coutinho-Mansfield, G., Li, H., Qiu, J., ... Fu, X.-D. (2013). Genome-wide analysis reveals SR protein cooperation and competition in regulated splicing. *Molecular Cell*, *50*(2), 223–35. doi:10.1016/j.molcel.2013.03.001
- Park, S.-M., Gaur, A. B., Lengyel, E., & Peter, M. E. (2008). The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes & Development*, *22*(7), 894–907. doi:10.1101/gad.1640608
- Pelisch, F., Allo, M., Kornblihtt, A. R., & Schor, I. E. (2009). Neuronal cell depolarization induces intragenic chromatin modifications affecting NCAM alternative splicing, *106*(11).
- Pencheva, N., & Tavazoie, S. F. (2013). Control of metastatic progression by microRNA regulatory networks. *Nature Cell Biology*, *15*(6), 546–54. doi:10.1038/ncb2769
- Posavec, M., Timinszky, G., & Buschbeck, M. (2013). Macro domains as metabolite sensors on chromatin. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *70*(9), 1509–24. doi:10.1007/s00018-013-1294-4
- Postigo, A. a, Depp, J. L., Taylor, J. J., & Kroll, K. L. (2003). Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. *The EMBO Journal*, *22*(10), 2453–62. doi:10.1093/emboj/cdg226
- Pradeepa, M. M., Sutherland, H. G., Ule, J., Grimes, G. R., & Bickmore, W. a. (2012). Psp1/Ledgf p52 binds methylated histone H3K36 and splicing factors and contributes to the regulation of alternative splicing. *PLoS Genetics*, *8*(5), e1002717. doi:10.1371/journal.pgen.1002717
- Quesada, V., Conde, L., Villamor, N., Ordóñez, G. R., Jares, P., Bassaganyas, L., ... López-Otín, C. (2012). Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nature Genetics*, *44*(1), 47–52. doi:10.1038/ng.1032

- Reinke, L. M., Xu, Y., & Cheng, C. (2012). Snail represses the splicing regulator epithelial splicing regulatory protein 1 to promote epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(43), 36435–42. doi:10.1074/jbc.M112.397125
- Rich, J. N., Guo, C., Mclendon, R. E., Bigner, D. D., Wang, X., & Counter, C. M. (2001). A Genetically Tractable Model of Human Glioma Formation A Genetically Tractable Model of Human Glioma Formation 1, 3556–3560.
- Rosenberger, U., Lehmann, I., Weise, C., Franke, P., Hucho, F., & Buchner, K. (2002). Identification of PSF as a protein kinase Calpha-binding protein in the cell nucleus. *Journal of Cellular Biochemistry*, *86*(2), 394–402. doi:10.1002/jcb.10233
- Rossow, K. L., & Janknecht, R. (2003). Synergism between p68 RNA helicase and the transcriptional coactivators CBP and p300. *Oncogene*, *22*(1), 151–6. doi:10.1038/sj.onc.1206067
- Roussos, E. T., Balsamo, M., Alford, S. K., Wyckoff, J. B., Gligorijevic, B., Wang, Y., ... Condeelis, J. S. (2011a). Mena invasive (Mena INV) promotes multicellular streaming motility and transendothelial migration in a mouse model of breast cancer, 2120–2131. doi:10.1242/jcs.086231
- Roussos, E. T., Goswami, S., Balsamo, M., Wang, Y., Stobezki, R., Adler, E., ... Oktay, M. H. (2011). Mena invasive (Mena(INV)) and Mena11a isoforms play distinct roles in breast cancer cell cohesion and association with TMEM. *Clinical & Experimental Metastasis*, *28*(6), 515–27. doi:10.1007/s10585-011-9388-6
- Salzman, D. W., Shubert-Coleman, J., & Furneaux, H. (2007). P68 RNA helicase unwinds the human let-7 microRNA precursor duplex and is required for let-7-directed silencing of gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(45), 32773–9. doi:10.1074/jbc.M705054200
- Sánchez-Tilló, E., Liu, Y., de Barrios, O., Siles, L., Fanlo, L., Cuatrecasas, M., ... Postigo, A. (2012). EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *69*(20), 3429–56. doi:10.1007/s00018-012-1122-2

- Sánchez-Tilló, E., Siles, L., de Barrios, O., Cuatrecasas, M., Vaquero, E. C., Castells, A., & Postigo, A. (2011). Expanding roles of ZEB factors in tumorigenesis and tumor progression. *American Journal of Cancer Research*, *1*(7), 897–912. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3196287&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Savagner, P., Vallés, a M., Jouanneau, J., Yamada, K. M., & Thiery, J. P. (1994). Alternative splicing in fibroblast growth factor receptor 2 is associated with induced epithelial-mesenchymal transition in rat bladder carcinoma cells. *Molecular Biology of the Cell*, *5*(8), 851–62. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=301106&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Savagner, P., Yamada, K. M., & Thiery, J. P. (1997). The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Cell Biology*, *137*(6), 1403–19. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2132541&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Schliekelman, M. J., Gibbons, D. L., Faca, V. M., Creighton, C. J., Rizvi, Z. H., Zhang, Q., ... Hanash, S. M. (2011). Targets of the tumor suppressor miR-200 in regulation of the epithelial-mesenchymal transition in cancer. *Cancer Research*, *71*(24), 7670–82. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0964
- Schwartz, S., Meshorer, E., & Ast, G. (2009). Chromatin organization marks exon-intron structure. *Nature Structural & Molecular Biology*, *16*(9), 990–5. doi:10.1038/nsmb.1659
- Shapiro, I. M., Cheng, A. W., Flytzanis, N. C., Balsamo, M., Condeelis, J. S., Oktay, M. H., ... Gertler, F. B. (2011). An EMT-driven alternative splicing program occurs in human breast cancer and modulates cellular phenotype. *PLoS Genetics*, *7*(8), e1002218. doi:10.1371/journal.pgen.1002218

- Shi, H., Cordin, O., Minder, C. M., Linder, P., & Xu, R.-M. (2004). Crystal structure of the human ATP-dependent splicing and export factor UAP56. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(51), 17628–33. doi:10.1073/pnas.0408172101
- Shin, S., Rossow, K. L., Grande, J. P., & Janknecht, R. (2007). Involvement of RNA helicases p68 and p72 in colon cancer. *Cancer Research*, *67*(16), 7572–8. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4652
- Shinozaki, A., Sakatani, T., Ushiku, T., Hino, R., Isogai, M., Ishikawa, S., ... Fukayama, M. (2010). Downregulation of microRNA-200 in EBV-associated gastric carcinoma. *Cancer Research*, *70*(11), 4719–27. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4620
- Shirakihara, T., Saitoh, M., & Miyazono, K. (2007). Differential Regulation of Epithelial and Mesenchymal Markers by ERF1 Proteins in Epithelial – Mesenchymal Transition Induced by TGF- β . *Journal of Cellular Biochemistry*, *18*(September), 3533–3544. doi:10.1091/mbc.E07
- Siemens, H., Jackstadt, R., Hüntgen, S., Kaller, M., Menssen, A., Götz, U., & Hermeking, H. (2011). feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transitions © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute . © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute ., *10*(24), 4256–4271.
- Spies, N., Nielsen, C. B., Padgett, R. a, & Burge, C. B. (2009). Biased chromatin signatures around polyadenylation sites and exons. *Molecular Cell*, *36*(2), 245–54. doi:10.1016/j.molcel.2009.10.008
- Sporn, J. C., & Jung, B. (2012). Differential regulation and predictive potential of MacroH2A1 isoforms in colon cancer. *The American Journal of Pathology*, *180*(6), 2516–26. doi:10.1016/j.ajpath.2012.02.027
- Sporn, J. C., Kustatscher, G., Hothorn, T., Collado, M., Serrano, M., Muley, T., ... Ladurner, a G. (2009). Histone macroH2A isoforms predict the risk of lung cancer recurrence. *Oncogene*, *28*(38), 3423–8. doi:10.1038/onc.2009.26
- Srebrow, A. (n.d.). The fibronectin transcription.

- Stucke, V. M., Gorses, D., & Hofmann, F. (2008). ND ES SC RIB ND ES, 7(6), 830–832.
- Subramanyam, D., & Blelloch, R. (2011). From microRNAs to targets: pathway discovery in cell fate transitions. *Current Opinion in Genetics & Development*, 21(4), 498–503. doi:10.1016/j.gde.2011.04.011
- Suzuki, H. I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., & Miyazono, K. (2009). Modulation of microRNA processing by p53. *Nature*, 460(7254), 529–33. doi:10.1038/nature08199
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–76. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
- Takaoka, Y., Shimizu, Y., Hasegawa, H., Ouchi, Y., Qiao, S., Nagahara, M., ... Iwamoto, T. (2012). Forced expression of miR-143 represses ERK5/c-Myc and p68/p72 signaling in concert with miR-145 in gut tumors of Apc(Min) mice. *PloS One*, 7(8), e42137. doi:10.1371/journal.pone.0042137
- Tazawa, H., Tsuchiya, N., Izumiya, M., & Nakagama, H. (2007). growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells, 104(39), 2–7.
- Terabe, M., Matsui, S., Noben-Trauth, N., Chen, H., Watson, C., Donaldson, D. D., ... Berzofsky, J. a. (2000). NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nature Immunology*, 1(6), 515–20. doi:10.1038/82771
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews. Cancer*, 2(6), 442–54. doi:10.1038/nrc822
- Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139(5), 871–90. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007

- Tilgner, H., Nikolaou, C., Althammer, S., Sammeth, M., Beato, M., Valcárcel, J., & Guigó, R. (2009). Nucleosome positioning as a determinant of exon recognition. *Nature Structural & Molecular Biology*, *16*(9), 996–1001. doi:10.1038/nsmb.1658
- Tsai, J. H., Donaher, J. L., Murphy, D. a, Chau, S., & Yang, J. (2012). Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell*, *22*(6), 725–36. doi:10.1016/j.ccr.2012.09.022
- Ule, J., Ule, A., Spencer, J., Williams, A., Hu, J.-S., Cline, M., ... Darnell, R. B. (2005). Nova regulates brain-specific splicing to shape the synapse. *Nature Genetics*, *37*(8), 844–52. doi:10.1038/ng1610
- Van Grunsven, L. a, Taelman, V., Michiels, C., Opdecamp, K., Huylebroeck, D., & Bellefroid, E. J. (2006). deltaEF1 and SIP1 are differentially expressed and have overlapping activities during *Xenopus* embryogenesis. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *235*(6), 1491–500. doi:10.1002/dvdy.20727
- Vargas, D. Y., Shah, K., Batish, M., Levandoski, M., Sinha, S., Marras, S. a E., ... Tyagi, S. (2011). Single-molecule imaging of transcriptionally coupled and uncoupled splicing. *Cell*, *147*(5), 1054–65. doi:10.1016/j.cell.2011.10.024
- Venables, J. P., Brosseau, J.-P., Gadea, G., Klinck, R., Prinos, P., Beaulieu, J.-F., ... Chabot, B. (2013a). RBFOX2 is an important regulator of mesenchymal tissue-specific splicing in both normal and cancer tissues. *Molecular and Cellular Biology*, *33*(2), 396–405. doi:10.1128/MCB.01174-12
- Venables, J. P., Brosseau, J.-P., Gadea, G., Klinck, R., Prinos, P., Beaulieu, J.-F., ... Chabot, B. (2013b). RBFOX2 is an important regulator of mesenchymal tissue-specific splicing in both normal and cancer tissues. *Molecular and Cellular Biology*, *33*(2), 396–405. doi:10.1128/MCB.01174-12
- Venables, J. P., Vignal, E., Baghdiguian, S., Fort, P., & Tazi, J. (2012). Tissue-specific alternative splicing of Tak1 is conserved in deuterostomes. *Molecular Biology and Evolution*, *29*(1), 261–9. doi:10.1093/molbev/msr193

- Vogt, M., Munding, J., Grüner, M., Liffers, S.-T., Verdoodt, B., Hauk, J., ... Hermeking, H. (2011). Frequent concomitant inactivation of miR-34a and miR-34b/c by CpG methylation in colorectal, pancreatic, mammary, ovarian, urothelial, and renal cell carcinomas and soft tissue sarcomas. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*, 458(3), 313–22. doi:10.1007/s00428-010-1030-5
- Wagner, M., Rid, R., Maier, C. J., Maier, R. H., Laimer, M., Hintner, H., ... Onder, K. (2012). DDX5 is a multifunctional co-activator of steroid hormone receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 361(1-2), 80–91. doi:10.1016/j.mce.2012.03.014
- Wang, D., Huang, J., & Hu, Z. (2012). RNA helicase DDX5 regulates microRNA expression and contributes to cytoskeletal reorganization in basal breast cancer cells. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 11(2), M111.011932. doi:10.1074/mcp.M111.011932
- Wang, H., Gao, X., Huang, Y., Yang, J., & Liu, Z.-R. (2009). P68 RNA helicase is a nucleocytoplasmic shuttling protein. *Cell Research*, 19(12), 1388–400. doi:10.1038/cr.2009.113
- Wang, H., Gao, X., Yang, J. J., & Liu, Z.-R. (2013). Interaction between p68 RNA helicase and Ca²⁺-calmodulin promotes cell migration and metastasis. *Nature Communications*, 4(May 2012), 1354. doi:10.1038/ncomms2345
- Wang, S. J., Zhang, C., You, Y., & Shi, C. M. (2012). Overexpression of RNA helicase p68 protein in cutaneous squamous cell carcinoma. *Clinical and Experimental Dermatology*, 37(8), 882–8. doi:10.1111/j.1365-2230.2012.04365.x
- Wang, Z., Chen, Z., Gao, Y., Li, N., Li, B., Tan, F., ... He, J. (2011). DNA hypermethylation of microRNA-34b/c has prognostic value for stage I non-small cell lung cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 11(5), 490–6. doi:10.4161/cbt.11.5.14550
- Warner, D. R., Bhattacharjee, V., Yin, X., Singh, S., Mukhopadhyay, P., Pisano, M. M., & Greene, R. M. (2004). Functional interaction between Smad, CREB binding protein, and p68 RNA helicase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 324(1), 70–6. doi:10.1016/j.bbrc.2004.09.017

- Warzecha, C. C., Jiang, P., Amirikian, K., Dittmar, K. a, Lu, H., Shen, S., ... Carstens, R. P. (2010). An ESRP-regulated splicing programme is abrogated during the epithelial-mesenchymal transition. *The EMBO Journal*, *29*(19), 3286–300. doi:10.1038/emboj.2010.195
- Warzecha, C. C., Sato, T. K., Nabet, B., Hogenesch, J. B., & Carstens, R. P. (2009). ESRP1 and ESRP2 are epithelial cell-type-specific regulators of FGFR2 splicing. *Molecular Cell*, *33*(5), 591–601. doi:10.1016/j.molcel.2009.01.025
- Watanabe, M., Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Takeyama, K., Ogawa, S., Arao, Y., ... Kato, S. (2001). A subfamily of RNA-binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor alpha coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *The EMBO Journal*, *20*(6), 1341–52. doi:10.1093/emboj/20.6.1341
- Wheelock, M. J., & Johnson, K. R. (2003). Cadherin-mediated cellular signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, *15*(5), 509–514. doi:10.1016/S0955-0674(03)00101-7
- Wiklund, E. D., Bramsen, J. B., Hulf, T., Dyrskjøt, L., Ramanathan, R., Hansen, T. B., ... Clark, S. J. (2011). Coordinated epigenetic repression of the miR-200 family and miR-205 in invasive bladder cancer. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, *128*(6), 1327–34. doi:10.1002/ijc.25461
- Wilson, B. J., Bates, G. J., Nicol, S. M., Gregory, D. J., Perkins, N. D., & Fuller-Pace, F. V. (2004). The p68 and p72 DEAD box RNA helicases interact with HDAC1 and repress transcription in a promoter-specific manner. *BMC Molecular Biology*, *5*, 11. doi:10.1186/1471-2199-5-11
- Witten, J. T., & Ule, J. (2011). Understanding splicing regulation through RNA splicing maps. *Trends in Genetics : TIG*, *27*(3), 89–97. doi:10.1016/j.tig.2010.12.001
- Wortham, N. C., Ahamed, E., Nicol, S. M., Thomas, R. S., Periyasamy, M., Jiang, J., ... Fuller-Pace, F. V. (2009). The DEAD-box protein p72 regulates ERalpha-/oestrogen-dependent transcription and cell growth, and is associated with improved survival in ERalpha-positive breast cancer. *Oncogene*, *28*(46), 4053–64. doi:10.1038/onc.2009.261

- Xiao, J., Lin, H., Luo, X., Luo, X., & Wang, Z. (2011). in response to stress. *The EMBO Journal*, 30(3), 524–532. doi:10.1038/emboj.2010.347
- Yamakuchi, M., Lotterman, C. D., Bao, C., Hruban, R. H., Karim, B., Mendell, J. T., ... Lowenstein, C. J. (2010). P53-induced microRNA-107 inhibits HIF-1 and tumor angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(14), 6334–9. doi:10.1073/pnas.0911082107
- Yamanaka, S., & Blau, H. M. (2010). Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*, 465(7299), 704–12. doi:10.1038/nature09229
- Yanagisawa, M., Huvelde, D., Kreinest, P., Lohse, C. M., John, C., Parker, A. S., ... Copland, J. A. (2008). A p120 Catenin Isoform Switch Affects Rho Activity , Induces Tumor Cell Invasion , and Predicts Metastatic Disease * □. doi:10.1074/jbc.M801192200
- Yang, L., Lin, C., & Liu, Z. (2005a). Phosphorylations of DEAD Box p68 RNA Helicase Are Associated with Cancer Development and Cell Proliferation Phosphorylations of DEAD Box p68 RNA Helicase Are Associated with Cancer Development and Cell Proliferation, 355–363.
- Yang, L., Lin, C., & Liu, Z.-R. (2005b). Signaling to the DEAD box--regulation of DEAD-box p68 RNA helicase by protein phosphorylations. *Cellular Signalling*, 17(12), 1495–504. doi:10.1016/j.cellsig.2005.03.008
- Yang, L., Lin, C., & Liu, Z.-R. (2006). P68 RNA helicase mediates PDGF-induced epithelial mesenchymal transition by displacing Axin from beta-catenin. *Cell*, 127(1), 139–55. doi:10.1016/j.cell.2006.08.036
- Yang, Q., & Jankowsky, E. (2006). The DEAD-box protein Ded1 unwinds RNA duplexes by a mode distinct from translocating helicases. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(11), 981–6. doi:10.1038/nsmb1165
- Yang, Y., Zhan, L., Zhang, W., Sun, F., Wang, W., Tian, N., ... Jin, Y. (2011). RNA secondary structure in mutually exclusive splicing. *Nature Structural & Molecular Biology*, 18(2), 159–68. doi:10.1038/nsmb.1959

- Yao, H., Brick, K., Evrard, Y., Xiao, T., Camerini-Otero, R. D., & Felsenfeld, G. (2010). Mediation of CTCF transcriptional insulation by DEAD-box RNA-binding protein p68 and steroid receptor RNA activator SRA. *Genes & Development*, *24*(22), 2543–55. doi:10.1101/gad.1967810
- Yeo, G. W., Coufal, N. G., Liang, T. Y., Peng, G. E., Fu, X.-D., & Gage, F. H. (2009). An RNA code for the FOX2 splicing regulator revealed by mapping RNA-protein interactions in stem cells. *Nature Structural & Molecular Biology*, *16*(2), 130–7. doi:10.1038/nsmb.1545
- Zhang, X., Stappenbeck, T. S., White, A. C., Lavine, K. J., Gordon, J. I., & Ornitz, D. M. (1999). Reciprocal epithelial-mesenchymal FGF signaling is required for cecal development, 173–180. doi:10.1242/dev.02175
- Zhang, Y. E. (2009). Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Research*, *19*(1), 128–39. doi:10.1038/cr.2008.328
- Zheng, H., & Kang, Y. (2013). Multilayer control of the EMT master regulators. *Oncogene*, (February), 1–9. doi:10.1038/onc.2013.128
- Zidar, N., Boštjančič, E., Gale, N., Kojc, N., Poljak, M., Glavač, D., & Cardesa, A. (2011). Down-regulation of microRNAs of the miR-200 family and miR-205, and an altered expression of classic and desmosomal cadherins in spindle cell carcinoma of the head and neck--hallmark of epithelial-mesenchymal transition. *Human Pathology*, *42*(4), 482–8. doi:10.1016/j.humpath.2010.07.020
- Zonta, E., Bittencourt, D., Samaan, S., Germann, S., Dutertre, M., & Auboeuf, D. (2012). The RNA helicase DDX5/p68 is a key factor promoting c-fos expression at different levels from transcription to mRNA export. *Nucleic Acids Research*, *41*(1), 554–564. doi:10.1093/nar/gks1046