



HAL
open science

Rôle du facteur de terminaison de la traduction eRF3 (eukaryotic Release Factor 3) dans la stabilité des ARN messagers

Soumaya Jerbi Chaabnia

► To cite this version:

Soumaya Jerbi Chaabnia. Rôle du facteur de terminaison de la traduction eRF3 (eukaryotic Release Factor 3) dans la stabilité des ARN messagers. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066391 . tel-01292920

HAL Id: tel-01292920

<https://theses.hal.science/tel-01292920>

Submitted on 24 Mar 2016

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.

**THESE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**
En Biologie Moléculaire et Biochimie

École Doctorale «Complexité du vivant»

Équipe de recherche : **Traduction Eucaryote**

**Rôle du facteur de terminaison de la traduction
eRF3 (*eukaryotic Release Factor 3*)
dans la stabilité des ARN messagers**

Présentée par

Soumaya JERBI

Le 22 Septembre 2015

Devant le jury composé de :

Rapporteurs :

Pr. Bertrand COSSON
Dr. Olivier NAMY

Examineurs :

Dr. Micheline FROMONT-RACINE
Pr. Sébastien BLOYER
Pr. Thierry FOULON

Directeur de Thèse :

Dr. Olivier JEAN-JEAN

Table des matières

Table des matières.....	3
Préambule	6
Introduction.....	8
Chapitre I : La traduction des ARN messagers.....	8
I. L'ARN messenger	8
II. La traduction des ARN messagers.....	10
II.1. Les étapes de la traduction chez les eucaryotes	11
II.1.1. L'initiation.....	11
II.1.2. L'élongation	11
II.1.3. La terminaison.....	12
II.1.3.1. Mécanisme général	12
II.1.3.2. Le facteur de terminaison de la traduction eRF1	13
II.2. Le facteur de terminaison de la traduction eRF3	14
II.2.1. Historique de l'identification d'eRF3.....	14
II.2.2. Structure du facteur eRF3	15
II.2.3. Mécanisme d'action d'eRF3 dans la terminaison de la traduction.....	17
Chapitre II : Le facteur eRF3 en dehors de la terminaison de la traduction	19
I. Les gènes GSPT1 et GSPT2 humains.....	19
II. Les formes alléliques d'eRF3a.....	20
III. La traduction et le cancer	22
III.1. La susceptibilité génétique au cancer	22
III.2. Le cancer et la machinerie de la traduction	23
III.3. Le facteur eRF3a et le cancer.....	24
III.4. Rôle d'eRF3 dans l'apoptose	27
Chapitre III : La régulation de la stabilité de l'ARN messenger	28

I.	La protéine d'interaction à la queue Poly(A) : PABP.....	28
I.1.	Identification de PABP	28
I.2.	Structure et fonction de PABP	30
I.2.1.	Les domaines RRM de PABP.....	31
I.2.2.	La région " <i>linker</i> " de PABP	32
I.3.	Rôles de PABP	33
I.3.1.	Rôle dans la polyadénylation de l'ARNm.....	33
I.3.2.	Rôle dans la traduction.....	34
II.	Stabilité et dégradation de l'ARNm	36
II.1.	La dégradation par la voie de dégradation désadénylation-dépendante	37
II.1.1.	L'étape limitante de la dégradation : la désadénylation.....	37
II.1.2.	Les complexes de désadénylation PAN2-PAN3 et CCR4- NOT	37
II.2.	Le mécanisme général de dégradation des ARNm normaux.....	39
II.3.	La dégradation par miRNA.....	41
II.4.	La dégradation par la voie NMD	42
Chapitre IV : L'interaction eRF3-PABP et son implication dans la régulation de la stabilité des ARNm.....		
45		
I.	L'interaction eRF3-PABP.....	45
I.1.	Identification de l'interaction eRF3-PABP.....	45
I.2.	L'interaction MLLE-PAM2.....	46
I.2.1.	La reconnaissance PAM2-MLLE.....	48
I.2.2.	La stœchiométrie de l'interaction PABP-eRF3.....	49
II.	Le motif PAM2 dans d'autres protéines	50
III.	L'interaction MLLE de PABP et PAM2 d'eRF3 et la stabilité des ARN messagers..	53
IV.	L'interaction eRF3-Pab1 chez la levure <i>S. cerevisiae</i>	54
V.	Rôle des deux motifs PAM2 d'eRF3	55
Le projet de la thèse		58
Résultats.....		60
I.	Mise au point du système d'étude.....	60
I.1.	Surexpression des facteurs protéiques	61

I.2.	Mise au point des expériences de résonance plasmonique de surface (SPR).....	62
I.3.	Choix du <i>Sensor Chip</i> pour la réalisation des cinétiques d'interaction	63
I.4.	Choix de la densité et du flux d'injection de l'analyte eRF3.....	64
II.	Mesure des paramètres cinétiques de l'interaction eRF3-PABP sur <i>Sensor Chip</i> CM5..	65
II.1.	L'affinité de la forme 12-GGC d'eRF3a pour PABP est la plus faible par rapport aux autres formes alléliques d'eRF3	65
II.2.	La faible affinité de l'allèle eRF3a 12-GGC avec PABP est due essentiellement à la faible association du complexe.....	67
III.	Etude des interactions des formes alléliques d'eRF3a sur le complexe PABP-Poly(A) – <i>Sensor Chip</i> SA	68
III.1.	Etude de l'interaction PABP-Poly(A).....	69
III.2.	La forme 12-GGC d'eRF3a semble interagir plus faiblement avec le complexe PABP-Poly(A).....	70
IV.	Mesure des paramètres cinétiques par la stratégie ' <i>multiple cycles</i> '	70
VI.	Le motif PAM2-N est le plus impliqué dans l'interaction d'eRF3 avec PABP	72
VII.	Etude de la compétition entre les facteurs de désadénylation et eRF3	74
	Discussion et perspectives	78
	Bibliographie.....	85

Préambule

Les données bibliographiques et le travail expérimental décrits dans cette thèse concernent exclusivement les eucaryotes même si certaines notions générales se retrouvent dans les autres règnes du vivant, eubactéries et archae.

Chez les eucaryotes, la traduction est un processus qui permet à la cellule de s'adapter aux variations de son environnement et aux changements du programme d'expression des gènes. La dégradation de l'ARN messager (ARNm) est une étape essentielle dans l'expression des gènes. Elle sert à maintenir l'abondance de l'ARNm dans le cytoplasme.

La cellule coordonne la dégradation ou la stabilisation des ARNm qui codent pour des protéines requises pour leurs activités biologiques. Ainsi, des stimuli extrinsèques et intrinsèques activent les voies de transduction de signaux qui déclenchent la dégradation des ARNm et ont en conséquence des effets sur leur abondance. L'interaction de protéines avec des séquences ou des structures secondaires spécifiques de l'ARNm entraîne le recrutement de complexes enzymatiques qui effectuent le processus de dégradation.

La queue Poly(A) des ARNm a une influence importante sur la dynamique de l'expression des gènes. D'un côté, elle assure la stabilité de l'ARNm pour assurer sa traduction et la production de protéines. D'un autre côté, elle intervient dans son propre raccourcissement, ou désadénylation, pour réduire la traduction de l'ARNm. Sa suppression complète induit la dégradation de l'ARNm. La majorité des ARNm sont dégradés suivant la voie de dégradation désadénylation-dépendante. Autrement dit, le raccourcissement de la queue Poly(A) mène à la

dégradation du corps de l'ARNm. Ainsi la désadénylation joue un rôle majeur dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes : en réduisant le flux d'ARNm produit par la transcription, elle permet de maintenir stable le taux d'un ARNm dans la cellule.

Le facteur de terminaison de la traduction eRF3 semble jouer un rôle important dans le processus de la désadénylation. Mais jusqu'à ce jour ce rôle reste peu clair. L'équipe "Traduction Eucaryote" dans laquelle j'ai effectué mon travail de thèse s'intéresse à l'implication de la traduction et en particulier au rôle d'eRF3 dans différents processus cellulaires (différenciation et prolifération). Mon travail de recherche avait pour objectif d'éclaircir le rôle d'eRF3 dans la stabilité des ARNm.

Je commencerai par introduire mes travaux de recherche en présentant la traduction et de façon plus détaillée la terminaison de la traduction et le facteur de terminaison de la traduction eRF3. Ensuite, un chapitre est consacré aux rôles d'eRF3 en dehors de la traduction et en particulier à ses liens avec le cancer. Les deux derniers chapitres de l'introduction concernent la dégradation de l'ARNm et la protéine PABP (*poly(A) binding protein*), facteur 'star' de la stabilité de l'ARNm, pour l'un, et l'interaction eRF3-PABP et les études menées sur cette interaction. Les résultats que j'ai obtenus pendant ma thèse sont présentés sous forme d'une publication en préparation. Des résultats supplémentaires sont aussi présentés. Enfin je conclurai en replaçant les résultats obtenus dans le contexte de nos connaissances sur la stabilité de l'ARNm.

Introduction

Chapitre I : La traduction des ARN messagers

La traduction permet la synthèse des protéines à partir de l'information génétique. Ce processus qui se déroule dans le cytoplasme des cellules permet l'élaboration d'une séquence d'acides aminés à partir de la séquence de nucléotides d'un ARN messager (ARNm). Ce processus vital dans la cellule peut être décomposé en trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Chacune de ces étapes intervient dans la régulation de l'expression des gènes. La traduction de l'ARNm en protéine implique un grand nombre de facteurs protéiques qui interviennent dans les étapes d'initiation (eIF, pour « *eukaryotic Initiation Factor* »), d'élongation (eEF, pour « *eukaryotic Elongation Factor* ») et de terminaison (eRF, pour « *eukaryotic Release Factor* » ou facteur de libération eucaryote). Ces facteurs assurent le déroulement précis de chaque étape et sa régulation. Certains de ces facteurs ont une activité GTPase qui apporte l'énergie nécessaire à chaque étape du processus de traduction. Au cours de ce chapitre, je vais décrire, brièvement, dans un premier temps l'ARNm et par la suite je décrirai le processus de la traduction en insistant sur le facteur de terminaison de la traduction eRF3.

I. L'ARN messager

Le processus de la transcription est la transformation du matériel génétique d'ADN en ARN. Chez les eucaryotes, trois ARN-polymérases (ARNpol) interviennent dans la transcription : l'ARNpol I pour les ARN ribosomiques (ARNr) 28S, 18S et 5,8S transcrits dans le nucléole, l'ARNpol II pour les ARN messagers et l'ARNpol III pour les petits ARN comme les ARN de transfert (ARNt), l'ARNr 5S, et les petits ARN nucléaires (ARNsn).

En ce qui concerne la formation de l'ARNm, le transcrit primaire n'est pas utilisé tel quel pour la synthèse protéique (la traduction). Il subit des modifications qui permettent l'augmentation de sa demi-vie et la modification de sa séquence. Toutes ces modifications sont réalisées au fur et à mesure de la progression de la synthèse du préARNm dans le nucléoplasme. Il existe trois grands types de modifications : l'addition d'une coiffe en 5', l'excision des introns -épissage des exons et la polyadénylation en 3'.

Le **coiffage** consiste en l'ajout d'un nucléotide à guanine sur l'extrémité 5' de l'ARNm suivi de sa méthylation sur l'azote 7 de la base, ainsi que de la méthylation en 2' du ribose des un ou deux premiers nucléotides du transcrit primaire. Il en résulte que l'extrémité 5' de l'ARNm n'est pas porteuse des trois acides phosphoriques libres habituels, mais d'un GMP, ce qui limite la réactivité de cette extrémité et sa reconnaissance par les exonucléases (protection contre la dégradation). Cet ensemble sert de coiffe protectrice à l'extrémité 5' de l'ARNm. Elle est également nécessaire à l'exportation de l'ARNm vers le cytoplasme et à la liaison de ce dernier avec la petite sous-unité du ribosome lors de l'étape d'initiation de la traduction.

L'**excision-épissage** : les gènes sont constitués d'une alternance d'exons et d'introns qui sont d'abord intégralement transcrits en préARNm, qui subissent ensuite une opération d'excision des introns suivi d'un épissage (*splicing*), c'est à dire de la réunion bout à bout des exons restants qui constituent alors l'ARNm. Ce remaniement se déroule au fur et à mesure de la progression de la transcription.

La **polyadénylation** est l'addition d'une succession de résidus adényl sur l'extrémité 3' de l'ARNm pour former une **queue Poly(A)**. Le site de polyadénylation codé au niveau du gène est présent sur l'ARNm. Ce site est formé par une séquence hexanucléotidique AAUAAA et par une séquence nommée DSE (*Downstream Sequence Element*) riche en U ou en GU. La séquence AAUAAA est reconnue spécifiquement par un complexe protéique appelé CPSF (*Cleavage and Polyadenylation Specific Factor*), et la séquence DSE par le complexe CstF (*Cleavage Stimulation Factor*). Ces deux complexes et d'autres composants, comme l'ARN pol II et la Poly(A) polymérase (PAP), vont interagir en formant le complexe de clivage qui va cliver la molécule de préARNm au niveau du site de clivage. La PAP va alors ajouter environ 200 nucléotides adénine. Cette queue Poly(A) confère de la stabilité au futur ARNm (**Figure 1**). Des informations plus complètes sur la polyadénylation sont données dans le chapitre III.

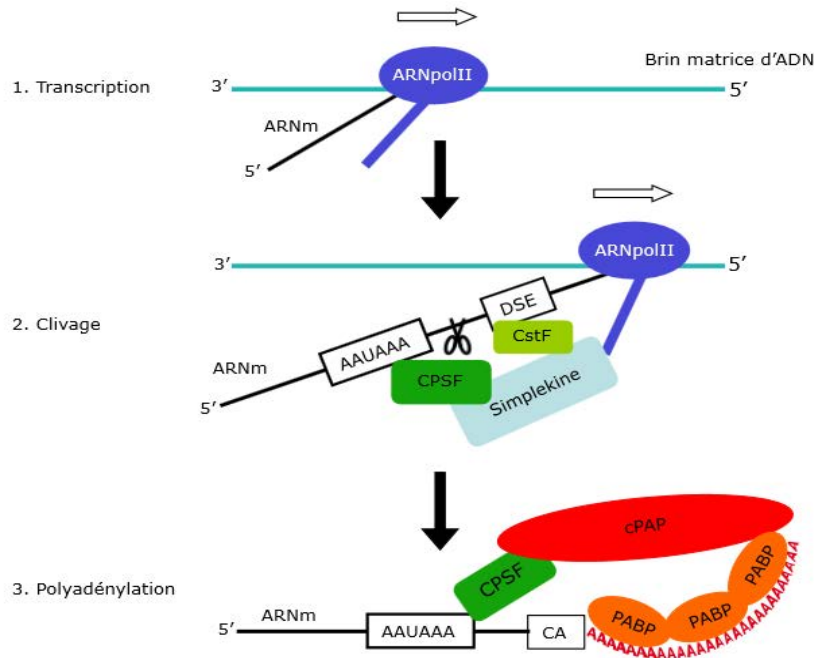


Figure 1 : La polyadénylation nucléaire des ARNm eucaryotiques chez les mammifères. Cette réaction se déroule en trois étapes : **1.** Le gène est transcrit à partir du brin matrice d'ADN par l'ARN polymérase II (ARNpolII). **2.** Après transcription de la séquence AAUAAA et de la séquence DSE, celles-ci sont respectivement reconnues par les facteurs de polyadénylation CPSF et CstF. Ces deux facteurs vont catalyser la coupure de l'ARNm entre ces deux séquences, généralement après un dinucléotide CA. **3.** CPSF recrute alors la PAP qui va synthétiser une queue poly(A) d'environ 200 résidus à l'extrémité 3' de l'ARNm. La synthèse de la queue poly(A) s'arrête lorsque l'encombrement stérique dû aux PABP '*Poly(A) Binding Protein*' empêche le contact entre la PAP et CPSF (D'après F. SEMENT, thèse de l'Université de Strasbourg).

II. La traduction des ARN messagers

La traduction correspond à la lecture des codons de l'ARNm par le ribosome. Elle se fait de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' de l'ARNm et se déroule en trois étapes: l'initiation, l'élongation, la terminaison. A la fin de la terminaison, le recyclage du ribosome permet le déclenchement d'un nouveau cycle de la traduction. L'initiation permet de définir le site de démarrage de la synthèse protéique où s'associent les deux sous unités du ribosome, l'élongation correspond à la synthèse de la chaîne polypeptidique constituant les protéines par décodage de l'ARNm. La terminaison permet la libération de la protéine néo-synthétisée et la dissociation des sous unités ribosomiques. Enfin le recyclage du ribosome permet la réinitiation de la traduction.

II.1. Les étapes de la traduction chez les eucaryotes

Je décrirai dans ce paragraphe très brièvement les étapes d'initiation et d'élongation pour approfondir celle de terminaison qui a fait l'objet de mon travail de thèse.

II.1.1. L'initiation

Le mécanisme d'initiation de la traduction chez les eucaryotes est décrit par le modèle du balayage ou «*scanning model*», proposé par Kozak en 1978 (Kozak, 1978). Selon ce modèle, l'initiation commence par la reconnaissance du complexe de coiffe (eIF4E-eIF4G) fixé sur l'extrémité 5' de l'ARNm par la sous unité 40S du ribosome chargée d'un ARNt méthionine initiateur et finit par la reconnaissance du codon d'initiation. La fixation de la grande sous-unité permet au ribosome ainsi constitué de débiter la synthèse protéique.

II.1.2. L'élongation

L'élongation correspond à un allongement de la chaîne polypeptidique par ajout d'acides aminés apportés au ribosome en cours de traduction par les aminoacyl-ARNt. Le processus d'élongation se fait de manière cyclique (Kapp and Lorsch, 2004). Au début de chaque cycle, le site A ribosomique est vide, le site P est occupé par l'ARNt chargé de la chaîne polypeptidique en cours de synthèse et le site E par l'ARNt déchargé. Un aminoacyl-ARNt est apporté au site A par le facteur d'élongation eEF1A lié au GTP. Le complexe eEF1A-GTP-aminoacyl-ARNt se place donc au site A. Il se produit un appariement entre le codon placé au site A du ribosome et la boucle anticodon de l'ARNt correspondant. Cette première étape est suivie d'une activation du centre peptidyl-transférase du ribosome. La chaîne polypeptidique portée par l'ARNt au site P est alors transférée sur l'acide aminé porté par l'ARNt au site A grâce à l'établissement d'une liaison peptidique dont la formation est catalysée par l'ARN ribosomique du centre peptidyl-transférase. La translocation de l'ARNt à l'intérieur du ribosome est alors amorcée. Ainsi l'ARNt déchargé de la chaîne peptidique est transféré du site P vers le site E du ribosome et l'ARNt chargé de la chaîne néosynthétisée est transféré du site A vers le site P, laissant libre le site A pour l'arrivée d'un nouvel aminoacyl-ARNt. Un nouveau cycle d'élongation peut ainsi se mettre en place et ce, jusqu'à ce qu'un codon stop soit rencontré.

II.1.3. La terminaison

II.1.3.1. Mécanisme général

La traduction s'achève lorsqu'un des trois codons stop, UAA, UAG ou UGA, entre au site A du ribosome. Chez les eucaryotes, la terminaison de la traduction est assurée par le facteur eRF1 et son partenaire eRF3. Les deux facteurs, eRF1 et eRF3 s'associent en un complexe qui se fixe au site A du ribosome. Le facteur eRF1 reconnaît les trois codons stop et active le centre peptidyl-transférase du ribosome. Celui-ci catalyse l'hydrolyse de la liaison ester entre la chaîne polypeptidique et l'ARNt du peptidyl-ARNt fixé au site P du ribosome, libérant ainsi la chaîne polypeptidique néosynthétisée (Frolova et al., 1994). Après cette étape, le ribosome 80S reste fixé à l'ARNm, avec un ARNt dans le site P et le facteur eRF1 dans le site A. Le facteur eRF1 doit alors être relâché du ribosome et le ribosome lui-même doit être dissocié afin de permettre un nouveau cycle de traduction. Un modèle proposé par Pisarev et coll. en 2010 montre que le recyclage du ribosome est médié par le complexe ABCE1 (Pisarev et al., 2010) ; Revue dans (Jackson et al., 2012). Le complexe ABCE1, une ATPase membre de la famille des protéines 'ATP-binding cassette' (ABC) vient s'associer au facteur eRF1 pour permettre la dissociation des sous unités ribosomiques (**Figure 2**).

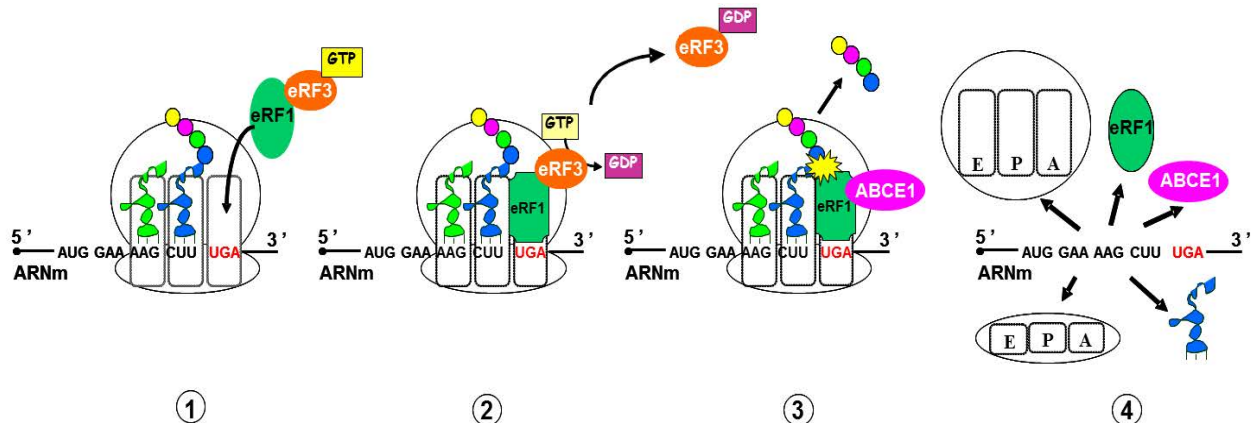


Figure 2 : Représentation schématique de la terminaison de la traduction chez les eucaryotes. (1) Fixation du complexe de terminaison eRF1-eRF3 quand un codon stop entre au site A du ribosome. **(2)** Reconnaissance du codon stop par eRF1 facilité par l'activité GTPase d'eRF3. **(3)** La GTPase eRF3 est libérée et vient, à la place, s'associer au complexe ABCE1 ce qui permet l'activation du centre peptidyl-transférase et libération du polypeptide néosynthétisé. **(4)** La dissociation du ribosome est induite suite à l'hydrolyse de l'ATP sous l'action d'ABCE1. En cas de ré-initiation, la sous unité 40S reste associée avec l'ARNm (figure inspirée de Jackson et al., 2012).

Le mode d'interaction du complexe ABCE1 à l'ARNm est similaire à celui des facteurs de la traduction. Cette dissociation commence par la sous unité ribosomale 60S, laissant le complexe 40S-ARNt fixé à l'ARNm. En se fixant à la sous unité 40S, les facteurs d'initiation assurent par la suite l'éjection de l'ARNt et la libération de la sous-unité 40S pour la préparer au prochain tour de traduction (Pisarev et al., 2010; Skabkin et al., 2010).

II.1.3.2. Le facteur de terminaison de la traduction eRF1

Le facteur eRF1 est responsable de la reconnaissance des codons stop. Sa structure tridimensionnelle montre qu'il mime un ARNt (**Figure 3A**) et se compose de trois domaines fonctionnels (Song et al., 2000). Le domaine N terminal d'eRF1 (en bleu sur la figure 3A) permet le décodage des différents codons stop. Il est formé d'une pointe qui imite la boucle anticodon de l'ARNt. Cette pointe porte le motif conservé NIKS impliqué dans le contact avec les codons stop.

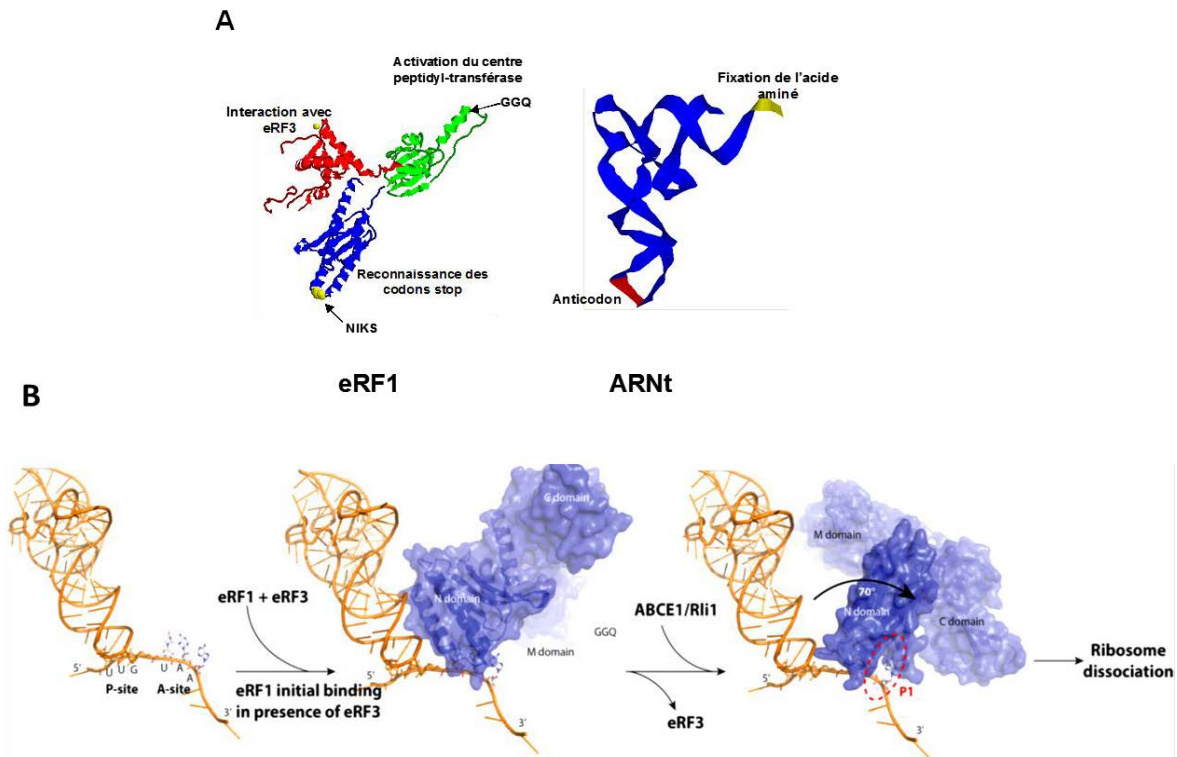


Figure 3 : Le facteur de terminaison de la traduction eRF1. (A) Structure tridimensionnelle d'eRF1, ses différents domaines et leurs relations avec le décodage des codons stop. (B) Terminaison de la traduction par eRF1. Le codon stop est reconnu par eRF1 associé à eRF3. Après hydrolyse du GTP, eRF3 est relâché et remplacé par ABCE1 ce qui induit des changements de la conformation du domaine N-terminal d'eRF1. Ces changements structuraux permettent au codon stop d'interagir avec la poche P1 et le motif GGQ d'eRF1. Ceci place le motif GGQ à proximité de l'extrémité CCA du peptidyl-ARNt au site P du ribosome et permet le déclenchement du relargage du polypeptide puis la dissociation du ribosome (Blanchet et al., 2014).

Il a été montré récemment qu'une cavité proche de ce motif participe à la reconnaissance du codon stop (Wada and Ito, 2014). Selon cette étude, les résidus R65 et K109 de cette cavité sont importants pour le positionnement de l'ARNm dans la cavité et les résidus S33 et S70 sont impliqués dans la reconnaissance du codon stop. Il a été montré par des études de cristallographie des complexes de terminaison eucaryotes que l'interaction d'eRF1 avec eRF3 entraîne un changement conformationnel d'eRF1 (Cheng et al., 2009). Selon le nouveau modèle présenté par Blanchet et coll., la reconnaissance se passerait en 2 étapes (**Figure 3B**) : d'abord eRF1 interagit avec le codon stop au niveau du motif NIKS puis la libération d'eRF3 induit des changements conformationnels qui permettent l'interaction de la cavité avec le codon stop (Blanchet et al., 2015). A l'extrémité du domaine médian (en vert sur la figure 3A) le motif GGQ très conservé est responsable de l'activation du centre peptidyl transférase du ribosome. Le domaine C-terminal (en rouge, figure 3A) est le domaine d'association à eRF3.

II.2. Le facteur de terminaison de la traduction eRF3

II.2.1. Historique de l'identification d'eRF3

Les premières études génétiques sur la terminaison de la traduction ont été réalisées chez *Saccharomyces cerevisiae* lors de l'étude de mutants capables d'affecter la suppression des mutations non-sens. Parmi les supprimeurs génétiques identifiés, deux mutants ont été isolés : les mutants *sup1* ou *sup45* et *sup2* ou *sup35* (Inge-Vechtomov et Andrianova, 1970). Ces mutants ont le même phénotype : suppression des trois codons stop (ils sont dits omnipotents), allosuppression, déficience de la chaîne respiratoire, hypersensibilité aux variations de température, osmosensibilité accrue, hypersensibilité aux antibiotiques aminoglycosides comme la paromomycine affectant la fidélité de la traduction, et le défaut de croissance.

A température non permissive, ces mutations sont létales, conduisant à une inhibition de la synthèse protéique *via* un blocage des ribosomes sur l'ARNm. Ces phénotypes suggéraient que les protéines Sup45p et Sup35p codées par ces gènes étaient impliquées dans la traduction, et plus particulièrement dans la fidélité du ribosome. En 1988, le groupe d'Inge-Vechtomov clone le gène SUP35 (ou SUP2) à partir de *S. cerevisiae*. Il montre que les mutations dans le gène SUP35 entraînent une augmentation du niveau d'ambiguïté de la traduction et suggère que la protéine

codée par ce gène pouvait être impliquée dans la fidélité de la traduction (Kushnirov et al., 1988). La même année, le groupe de Kikuchi au Japon isole un gène qu'ils nomment *gst1* pour G to S transition dans une souche mutante thermosensible de *S. cerevisiae* affectée dans la phase de transition des phases G1 à S du cycle cellulaire. Le produit du gène GST1 est une protéine de 76 kDa qui a une forte homologie avec le facteur d'élongation de la traduction EF1 α (renommé eEF1A) et contient une séquence caractéristique des GTPases (Kikuchi et al., 1988).

Une année plus tard, le groupe japonais clone le gène homologue humain de GST1 de la levure à partir d'une banque d'ADNc de cellules humaines et le nomme GSPT1. Il montre que ce gène code pour une GTPase et que son expression dépend de la prolifération cellulaire (Hoshino et al., 1989). En 1994, l'équipe de M. Philippe à Rennes identifie le facteur de terminaison de la traduction eucaryote eRF1 (Frolova et al., 1994) et l'année suivante montre que le produit du gène SUP35 s'associe avec eRF1 pour réaliser la terminaison de la traduction chez les eucaryotes, le produit du gène SUP35 (GST1) est alors nommé eRF3 pour son homologie de fonction avec le facteur de terminaison procaryote RF3 (Zhouravleva et al., 1995).

II.2.2. Structure du facteur eRF3

La protéine eRF3 est constituée de trois domaines principaux : le domaine amino-terminal N d'environ 200 résidus, le domaine médian M d'une cinquantaine d'acides aminés et le domaine carboxy-terminal C, constitué de 428 résidus. En 2004, Kong et collaborateurs ont déterminé la structure cristallographique des domaines M et C du facteur eRF3 de *Schizosaccharomyces pombe* (**Figure 4A**). Cette structure est fortement similaire à celle des facteurs d'élongation de la traduction EF-Tu bactérien et eEF-1A eucaryote (**Figure 4B**) même si des changements structuraux localisés entraînent des différences affectant la liaison aux nucléotides et au Mg²⁺ (Kong et al., 2004). Ainsi, le complexe de terminaison de la traduction eRF3-eRF1 a une structure similaire à celle du complexe eEF1A-ARNt (**Figure 4, C et D**) et comme lui, il peut se fixer dans le site A du ribosome.

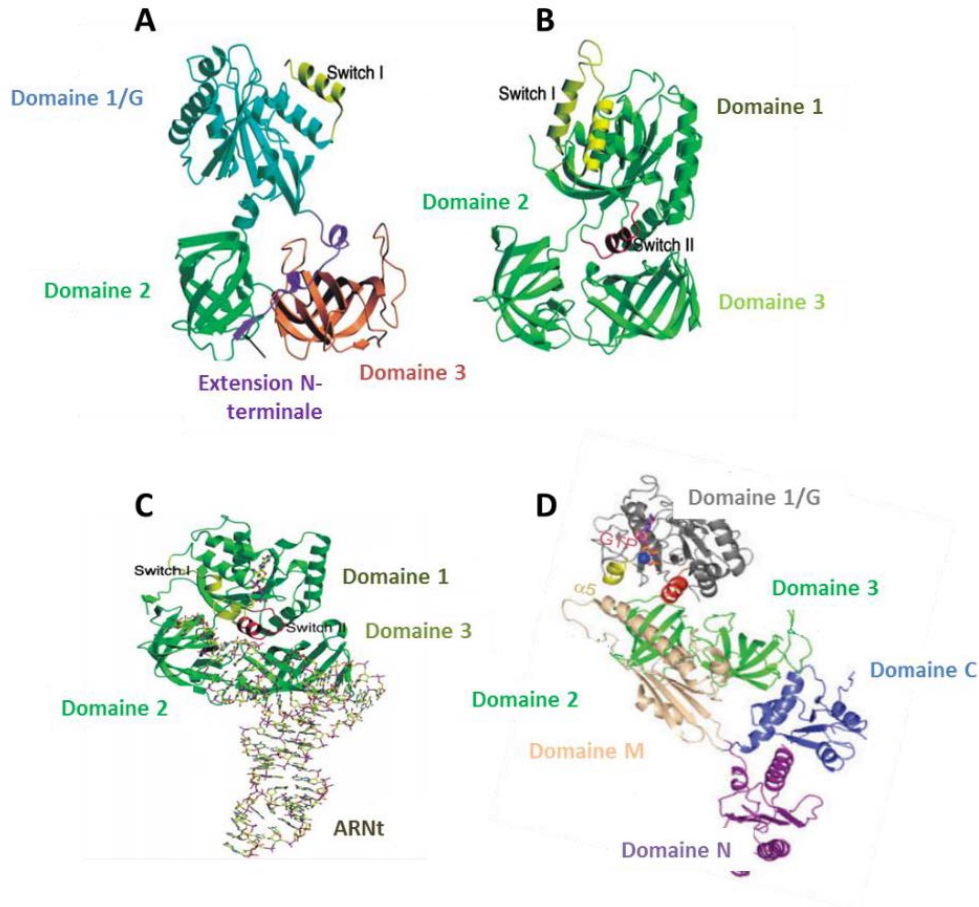


Figure 4 : Comparaison des structures cristallographiques d'eRF3 et eEF1A, du complexe EF-Tu-ARNt et eRF1-eRF3 (A) Structure cristalline des domaines M (extension N-terminale) et C d'eRF3 ; les sous-domaines 1/G, 2, et 3 du domaine C sont représentés (B) Structure des domaines 1, 2, et 3 d'eEF1A. (C) Structure du complexe EF-Tu-ARNt. (D) Structure du complexe eRF1-eRF3-GTP ; les domaines N, M et C d'eRF1 sont représentés ainsi que les sous-domaines 1/G, 2 et 3 du domaine C d'eRF3.

Le domaine N-terminal est très variable en longueur et en séquence selon les espèces. Chez les mammifères, ce domaine est riche en acides aminés acides proline, sérine et glycine et très peu structuré. Il n'a pas été cristallisé. Il porte le site de fixation à la protéine de liaison des queues poly(A) des ARN messagers, PABP (voir plus loin).

Le domaine M est relativement bien conservé et riche en acides aminés chargés. Aucune fonction ne lui est connue jusqu'à présent.

La séquence en acides aminées du domaine C d'eRF3 est très conservée chez tous les eucaryotes. Ce domaine contient les quatre motifs canoniques de liaison au GTP communs aux protéines de la superfamille des GTPases.

Une sous-famille des protéines G est constituée d'eRF3 (les 2 isoformes humaines eRF3a et eRF3b sont présentées sur la **Figure 5**), Hbs1, Ski7, GTPBP1 et GTPBP2. Le domaine C-terminal peut être divisé en 3 sous-domaines. Un premier sous-domaine I qui contient les quatre motifs de fixation de la GTP, G1 à G4, conservés entre les membres de la superfamille des GTPases. Les deux autres, sous-domaines 2 et 3, présentent un arrangement similaire à celui du domaine d'eEF1A qui interagit avec l'ARNt et permettent à eRF3 et Hsb1 d'interagir avec leurs partenaires respectifs, eRF1 et Dom34 (van den Elzen et al., 2010).

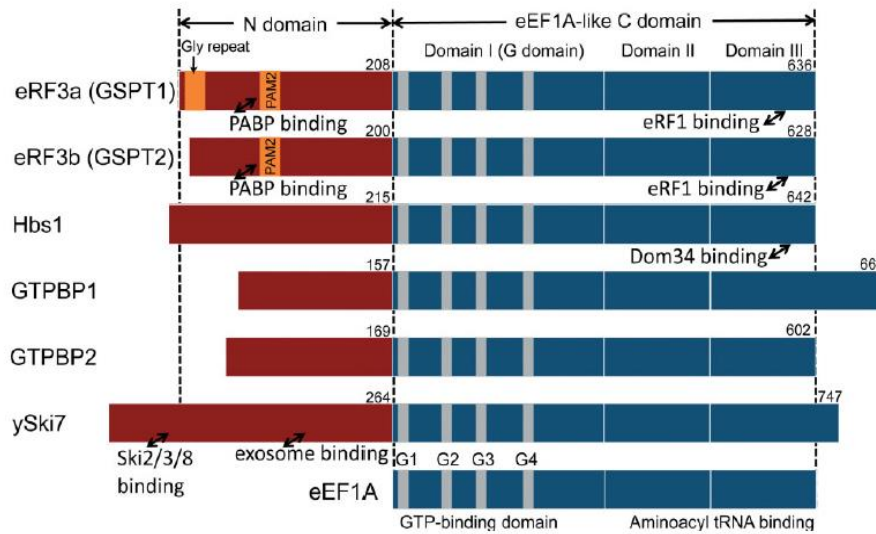


Figure 5 : Famille des protéines G à laquelle appartient eRF3. Les membres de la famille partagent un domaine structural commun C-terminal ayant une structure similaire à celui du facteur d'élongation eEF1A avec un domaine N-terminal d'une longueur d'environ 200 acides aminés unique pour chaque membre de la famille (Hoshino, 2012).

II.2.3. Mécanisme d'action d'eRF3 dans la terminaison de la traduction

L'étude *in vitro* des interactions du GTP et GDP, avec eRF3 seul ou avec le complexe eRF3-eRF1, montre que le GTP et eRF1 se lient à eRF3 avec une forte coopérativité qui dépend de la présence du Mg^{2+} . Aux concentrations physiologiques en Mg^{2+} , l'affinité du complexe eRF1-eRF3 pour le GTP est un peu plus haute que pour le GDP et la dissociation du GTP du complexe est beaucoup plus lente que celle du GDP. Ainsi, dans les cellules eucaryotes eRF3 est en majorité sous la forme d'un complexe ternaire eRF1-eRF3-GTP à longue durée de vie. Lorsque le facteur eRF3 n'est pas associé à eRF1, il est sous sa forme liée au GDP à courte durée de vie

(Hauryliuk et al., 2006; Pisareva et al., 2006). Ainsi, la dissociation rapide du GDP d'eRF3 ne nécessite pas de facteur d'échange GDP/GTP (GEF) contrairement à la plupart des facteurs liant le GTP.

Le facteur eRF3 a une influence sur l'interaction d'eRF1 avec le ribosome. Il joue le rôle d'escorte d'eRF1 jusqu'au ribosome (Eyler et al., 2013) et stimule son activité. Des travaux sur la relation entre l'activité GTPase d'eRF3 et la terminaison ont montré que l'activité GTPase est essentielle pour la terminaison de la traduction. Chez la levure, des mutations dans un des sites GTPase qui réduisent l'hydrolyse du GTP ont montré que l'activité GTPase d'eRF3 est indispensable pour coupler la reconnaissance des codons stop avec le relargage de la chaîne peptidique (Salas-Marco and Bedwell, 2004).

Dans des cellules humaines déplétées en une des isoformes d'eRF3 (eRF3a) responsable de la terminaison de la traduction, il a été montré qu'eRF1 est dégradé lorsqu'il n'est pas associé à eRF3. Ceci explique la forte corrélation entre l'abondance d'eRF1 et celle d'eRF3a, observée dans différentes lignées de cellules humaines (Chauvin et al., 2005). En utilisant des formes d'eRF3a portant des mutations dans le site de liaison à eRF1, il a été montré que le facteur eRF3a était ubiquitinylé et dégradé par le protéasome lorsqu'il n'était pas associé à eRF1 (Chauvin and Jean-Jean, 2008). L'ensemble de ces résultats suggèrent que la formation du complexe de terminaison est contrôlé par des mécanismes de dégradation protéolytique qui permettent d'adapter l'abondance des facteurs de terminaison aux modifications du taux global de synthèse protéique qui surviennent lors du passage des cellules de l'état quiescent à l'état de prolifération et inversement.

Chapitre II : Le facteur eRF3 en dehors de la terminaison de la traduction

Il est évident qu'eRF3 a pour rôle principal la terminaison de la traduction, c'est même décrit comme étant son rôle canonique. Mais le rôle d'eRF3 dans la cellule ne s'arrête pas à la terminaison de la traduction. Par son interaction avec d'autres protéines qu'eRF1, eRF3 est aussi impliqué dans d'autres processus tels que la régulation de la stabilité des ARNm, l'apoptose et dans la survenue de certains cancers. Ces rôles d'eRF3 ont surtout été étudiés dans les cellules de mammifères. Je ne décrirai dans ce chapitre que les rôles d'eRF3 dans l'apoptose et le cancer, le rôle d'eRF3 dans la stabilité des ARNm fera l'objet d'un chapitre à part.

Nous allons voir ci-dessous que chez les mammifères, eRF3 possède deux isoformes eRF3a et eRF3b. L'isoforme eRF3a possède des formes alléliques et un lien entre une de ces formes alléliques et le cancer. Si eRF3 est un facteur clé dans la stabilité de l'ARNm, serait-il aussi impliqué dans le risque de développement du cancer ? C'est une des questions posées par mon travail de thèse.

I. Les gènes GSPT1 et GSPT2 humains

En 1998, un gène homologue à GSPT1 est isolé dans des cellules humaines et nommé GSPT2. Le produit de ce gène s'associe à eRF1 (Hoshino et al., 1998) et la protéine codée par ce gène possède une activité de terminaison de la traduction (Jakobsen et al., 2001). La protéine codée par le gène GSPT1 est alors nommé eRF3a et celle codée par GSPT2, eRF3b. Ces deux isoformes d'eRF3 ne sont trouvées que chez les mammifères.

Le gène GSPT1 est localisé sur le chromosome 16 (16p13.1), il possède 15 exons et s'étend sur 47,79 kb alors que GSPT2 est localisé sur le chromosome X (Xp11.21-23), n'a qu'un seul exon de 2,84 kb (génom NCBI37, août 2010). Il a été supposé que GSPT2 a été généré par retrotransportation de l'ARN messager du gène GSPT1 (Zhouravleva et al., 2006). La différence la plus importante entre les deux gènes GSPT1 et GSPT2 est la présence d'une expansion de triplet GGC dans le premier exon codant du gène GSPT1. Cette expansion est absente dans GSPT2.

Pour ce qui concerne les ARNm, GSPT1 et GSPT2 diffèrent par leur distribution tissulaire et par leur expression au cours de la prolifération cellulaire (Hoshino et al., 1989, 1998). En effet, l'ARNm de GSPT1 est abondant dans tous les tissus testés, le cœur, le cerveau, la rate, le poumon, le foie et le rein, alors que l'ARNm d'eRF3b est nettement plus faiblement exprimé dans tous ces tissus, sauf le cerveau. De plus, l'ARNm d'eRF3a est exprimé assez faiblement dans les cellules en quiescence et son niveau augmente après stimulation de l'entrée des cellules en phase G1 du cycle cellulaire. A l'inverse, l'abondance de l'ARNm d'eRF3b est faible et ne varie pas au cours du cycle cellulaire (Hoshino et al., 1998). Au niveau des protéines, eRF3a est abondante dans tous les tissus alors qu'eRF3b est très faiblement exprimée voire absente dans la majorité des cellules humaines (Chauvin et al., 2005). Ainsi, eRF3a a un rôle majeur dans la cellule, non seulement dans la terminaison de la traduction mais dans les autres fonctions qui lui sont attribuées. Même si des expériences de complémentation ont montré qu'eRF3b peut assurer les mêmes fonctions qu'eRF3a (Chauvin et al., 2005, 2007), le rôle d'eRF3b est encore inconnu. Les protéines isoformes eRF3a et eRF3b des mammifères présentent une homologie de séquence de 88%. La grande majorité des différences se situe dans le domaine N (**Figure 6**).

II. Les formes alléliques d'eRF3a

L'extrémité du domaine N terminal d'eRF3a comprend une expansion stable de polyglycine qui est codée par une répétition de codons GGC présente dans le premier exon du gène GSPT1 (**Figure 6**). En 2005, une étude sur le polymorphisme de la répétition des trinuécléotides GGC sur une population portugaise a permis de détecter la présence de 5 allèles d'eRF3a; 7-GGC, 9-GGC, 10-GGC, 11-GGC et le 12-GGC (**Figure 7**). Cette étude a permis de mettre en évidence

l'association entre la répétition de trinuécléotide polymorphe dans le facteur eRF3a et la susceptibilité au cancer (Brito et al., 2005).

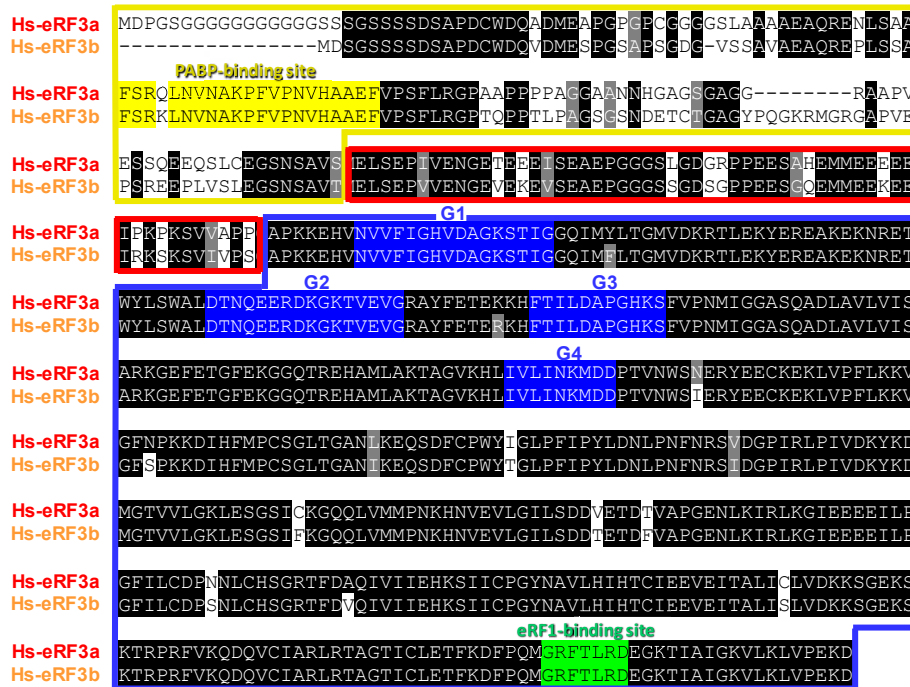


Figure 6 : Alignement des deux isoformes eRF3a et eRF3b du facteur eRF3 humain. Les deux protéines sont identiques à 88%. Les différences majeures se situent au niveau des régions N-terminales (encadrée en jaune). L'isoforme eRF3b est dépourvue d'une expansion polyglycine.

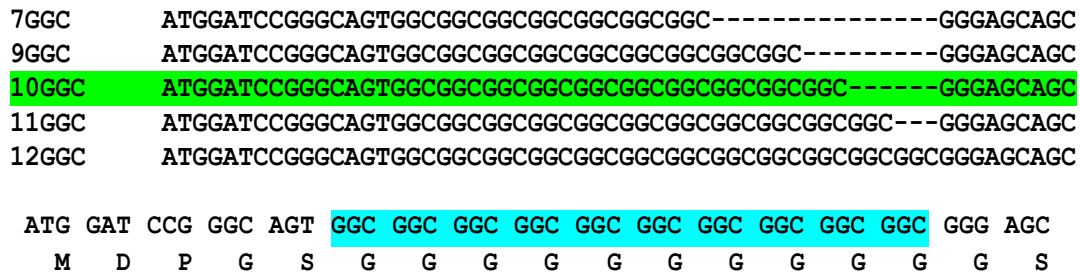


Figure 7 : Les allèles de l'exon 1 du gène GSPT1/eRF3a humain. L'allèle le plus fréquent est l'allèle 10-GGC en vert.

III. La traduction et le cancer

III.1. La susceptibilité génétique au cancer

Dans le développement d'un cancer deux ensembles distincts de gènes jouent un rôle essentiel. Ils interviennent directement dans le contrôle de la division des cellules. **Les oncogènes** stimulent la division cellulaire. Le premier oncogène a été isolé en 1976. En 20 ans, une centaine d'oncogènes ont été isolés et la liste n'est pas close. L'action des oncogènes est dominante, c'est à dire qu'une mutation sur une seule copie du gène suffit à déclencher une division cellulaire anormale. **Les gènes suppresseurs de tumeur** ou anti-oncogènes ont pour fonction de freiner le déclenchement de la division cellulaire. Contrairement à la situation des oncogènes, ces gènes ont une action dite récessive, c'est à dire que les deux copies du gène doivent être mutées pour qu'il n'y ait plus la fonction de frein à la division cellulaire. On connaît une vingtaine de gènes qui sont des suppresseurs de tumeurs. Le plus connu, le gène p53, est muté dans la moitié des cancers humains.

Durant ces dernières années, un effort important a été entrepris dans l'identification des sources de la susceptibilité génétique du cancer. Dans ce contexte des projets internationaux ont été menés tels que the *Human genome Sequencing* et le projet *HapMap*. Ces projets ont généré de nombreuses informations sur la localisation, la quantité, le type et la fréquence des variants génétiques dans le génome humain. Un grand nombre d'études sur l'association entre les variants des gènes candidats et le risque de cancer a été réalisé. Compte tenu de leurs abondances et de leurs stabilités, les polymorphismes d'un seul nucléotides ou SNP (*single nucleotide polymorphism*) sont des marqueurs intéressants pour cartographier les loci de susceptibilité au développement de maladies tels que le cancer. Ainsi, il a pu être montré que certains cancers sont d'origine monogénique comme par exemple le cancer du sein et de l'ovaire provoqués par les variations des gènes BRCA1 et BRCA2 (Narod and Foulkes, 2004), le cancer colorectal héréditaire provoqué par Mlh1 et Mlh2 (Silva et al., 2009).

III.2. Le cancer et la machinerie de la traduction

Des progrès remarquables ont été réalisés dans la compréhension du rôle de la traduction de l'ARNm dans le développement du cancer humain. Le contrôle de la traduction est un élément crucial dans le développement et la progression du cancer. Ce contrôle permet d'une part de diriger la synthèse globale des protéines mais aussi la traduction d'ARNm spécifiques qui favorisent la survie des cellules tumorales, l'angiogenèse, l'invasion et le développement des métastases. Le contrôle de la traduction dans le cancer présente de multiples facettes. Il a été montré qu'il implique l'altération des facteurs de la traduction et de leurs activités dans différents stades de la maladie (Silvera et al., 2010).

La synthèse des protéines est un processus cellulaire vital qui régule la croissance et le métabolisme de la cellule. Elle est sous le contrôle de réseaux de signalisation qui répondent à des changements de l'environnement de la cellule. La plupart des cancers sont dus à un dérèglement des voies de signalisation qui contrôlent la croissance et la prolifération des cellules. Ces voies affectent aussi la traduction. Le cancer est associé à des modifications dans les taux des facteurs d'initiation et de régulation de la traduction. Une relation cause-effet a été établie pour le facteur eIF4E dont la surexpression provoque la transformation maligne des cellules humaines en culture (Sonenberg and Hinnebusch, 2009). Sur le plan clinique, la surexpression du facteur de l'initiation de la traduction eIF4E est corrélée avec la progression de certains cancers et avec la résistance à la chimiothérapie. De plus, la phosphorylation d'eIF4E est élevée durant les premiers stades de développement des cancers de sein, de l'estomac et du poumon et diminuée dans les cancer de prostate (Bhat et al., 2015). D'autres facteurs de l'initiation de la traduction sont mutés, ont subi des modifications post-traductionnelles ou sont exprimées différemment et agissent comme des oncogènes dans les cellules cancéreuses. Ces altérations de la traduction font augmenter le taux de la synthèse des protéines et aussi la traduction des ARNm spécifiques codant pour des protéines qui favorisent la progression du cancer (Grzmil and Hemmings, 2012).

Par ailleurs, des études ont mis en évidence une association entre l'expression des facteurs de terminaison de la traduction et le développement du cancer. Il a été montré que l'expression de l'isoforme eRF3b est augmenté dans le cancer du sein (Thakur et al., 2005). De plus, une étude récente a montré qu'eRF3b dont l'expression est différente dans l'hépatite B chronique, le

carcinome hépatocellulaire et la cirrhose du foie, serait un marqueur important de l'hépatite B chronique (Li et al., 2014). Il a été montré une augmentation de l'expression de l'ARNm d'eRF3a dans la forme histologique intestinale du cancer gastrique mais pas dans la forme diffuse (Malta-Vacas et al., 2005).

III.3. Le facteur eRF3a et le cancer

Les répétitions de GGC dans l'exon 1 du gène GSPT1 peut être considéré comme un microsatellite. Les microsatellites aussi appelés '*Short Tandem Repeats*' (STR) sont des séquences nucléiques composées d'une répétition de di, tri ou tétranucléotides qui sont très abondants dans certaines régions du génome humain. Des changements dans ces séquences répétitives peuvent engendrer des effets délétères sur l'expression des gènes et leur présence peut induire certaines maladies, comme par exemple les maladies par expansions instables de trinuécléotides (maladies à triplets) qui regroupent certaines maladies neurodégénératives dont l'autisme, l'arriération mentales. Une étude a montré la relation entre le polymorphisme de la répétition CAG et GGC au niveau de l'exon 1 du gène du récepteur aux androgènes (RA) et la variation de l'activité transcriptionnelle du gène RA. Le risque de cancer de la prostate est considérablement augmenté lorsque la longueur des répétitions CAG et GGC augmente (Silva Neto et al., 2008). Afin de discerner les effets des variants du gène Reelin (RELN) sur les troubles du spectre de l'autisme (TSA), une étude récente sur la relation entre les variants du RELN dans la répétition GGC et la TSA a montré qu'un seul des variants étudiés pouvait significativement contribuer à la TSA (Wang et al., 2014).

En ce qui concerne le facteur eRF3a, l'étude menée sur des patient présentant un cancer de l'estomac par Brito et coll. en 2005 a permis de mettre en évidence l'association entre la répétition stable du trinuécléotide GGC et la susceptibilité au cancer. Cette étude montre d'une part que l'allèle 10-GGC est le plus fréquent dans la population portugaise étudiée et d'autre part que l'allèle 12-GGC est présent seulement dans la population malade avec une fréquence de 5 % (**Figure 8**). Ce résultat révèle une corrélation entre l'allèle 12-GGC et le cancer de l'estomac : les personnes porteuses de l'allèle 12-GGC ont un risque de cancer gastrique 20 fois plus élevé (Malta-Vacas et al., 2005). Les auteurs suggèrent qu'une altération de la conformation d'eRF3a

due à la présence des 12 répétitions du triplet GGC pourrait avoir un effet sur la fonction de la protéine et son rôle dans l'efficacité de la traduction.

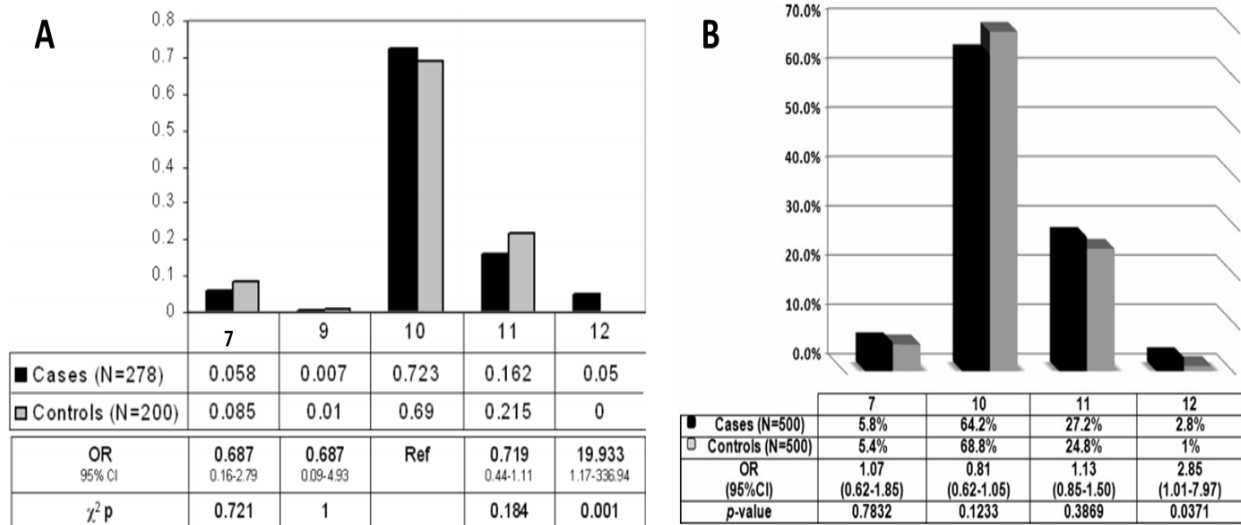


Figure 8 : Les allèles d'eRF3a et le cancer. (A) Fréquences alléliques des variants d'eRF3a/GSPT1 chez les patients atteints de cancer de l'estomac et des individus contrôles dans une population portugaise. (B) Fréquences alléliques des variants d'eRF3a/GSPT1 chez les patients atteints de cancer du sein et des individus contrôles dans une population iranienne.

Depuis cette découverte, une autre étude a été réalisée par la même équipe sur des patientes atteintes de cancer du sein. Cette étude montre aussi une susceptibilité accrue des porteuses de l'allèle 12-GCC à certaines formes de cancer du sein. L'allèle 12-GGC est présent seulement chez les personnes malades avec une fréquence de 2,5% ce qui induit un risque de cancer du sein 11 fois plus élevé (Malta-Vacas et al., 2009). Une étude plus récente sur le polymorphisme de la répétition GGC d'eRF3a et son association avec le cancer de sein a été réalisée sur une population iranienne. Le premier point en commun entre les deux populations portugaise et iranienne est que l'allèle 10-GGC est le plus fréquent. En revanche, il y a des différences dans les distributions alléliques des répétitions GGC (**Figure 8**). L'allèle 9-GGC est totalement absent dans la population iranienne. La fréquence de l'allèle 12-GGC est de 1% dans la population iranienne contrôle alors que cet allèle n'a pas été détecté dans la population portugaise contrôle. La fréquence de l'allèle 12-GGC dans la population malade est de 2,8% avec un risque d'environ 3 fois plus élevé de cancer du sein. Ce même groupe suggère aussi que, chez les femmes de moins 50 ans, la présence des 2 allèles 7-GGC (homozygotes 7-GGC) induit un risque élevé de

développement de cancer (Miri et al., 2012). Afin de comprendre le rôle d'eRF3a dans le développement de ces types de cancer (estomac et sein) et d'établir les causes de la susceptibilité des porteurs de l'allèle 12-GGC à certaines tumeurs, la première approche qui a été menée par notre équipe était de voir s'il y avait un lien entre cette répétition GGC et la terminaison de la traduction. La quantification des ARNm d'eRF3a dans les tissus tumoraux a montré une surexpression d'eRF3a dans 44% des cas analysés. En revanche le facteur eRF1 n'a montré aucune variation entre les tissus normaux et les tissus tumoraux. L'allèle 12-GGC a été retrouvé uniquement chez les patients dont l'ARNm d'eRF3a est surexprimé. Cependant, il a été montré que, dans des cellules humaines en culture déplétées en eRF3a et surexprimant à la place les variants 7-GGC, 9-GGC, 10-GGC, 11-GGC et 12-GGC d'eRF3a, l'efficacité de la terminaison de la traduction n'est pas changée quel que soit le variants d'eRF3a exprimés dans les cellules (**Figure 9A**).

L'analyse par western blot ont montré que le niveau d'expression des variants d'eRF3a (7-GGC, 9-GGC, 10-GGC, 11-GGC et 12-GGC) est le même dans les échantillons analysé (**Figure 9B**). Ces résultats suggèrent que le nombre de répétition des Glycine dans le domaine N-terminale d'eRF3a n'a pas d'effet sur l'activité de terminaison de la traduction (Malta-Vacas et al., 2009).

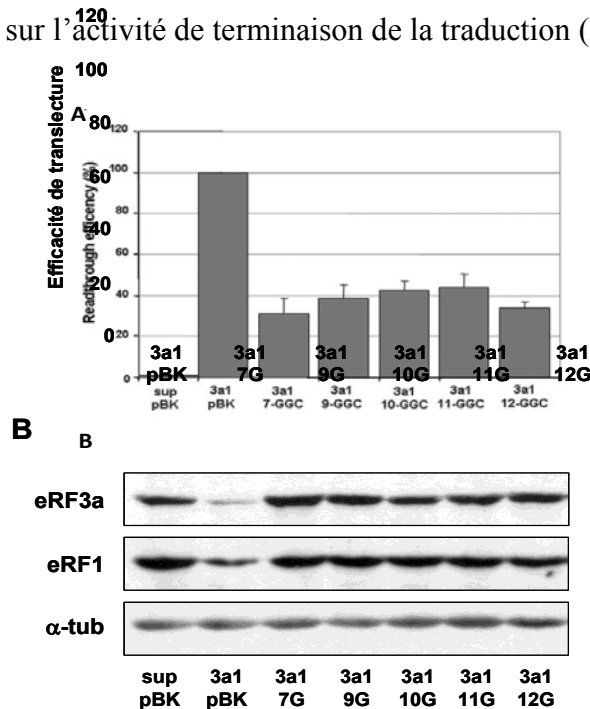


Figure 9 : L'activité de la terminaison de la traduction des différents variant d'eRF3a. (A) l'efficacité de la translecture traductionnelle calculée en divisant l'activité de β -galactosidase de chaque échantillon par rapport au échantillon contrôle (3a1/Sup pBK). (B) Analyse du Western Blot sur les extraits de cellules exprimant les variants d'eRF3a (7-GGC, 9-GGC, 10-GGC et 12-GGC) en utilisant des anticorps anti-eRF1 et anti eRF3a (Malta-Vacas et al., 2009).

On peut maintenant se demander si la longueur de la répétition de glycine n'affecte pas la structure et la fonction de l'extrémité N-terminale d'eRF3a.

III.4. Rôle d'eRF3 dans l'apoptose

L'apoptose (ou la mort cellulaire programmée) est le processus par lequel des cellules déclenchent leur auto-destruction en réponse à un signal. C'est l'une des voies possibles de la mort cellulaire, génétiquement programmée, nécessaire à la survie des organismes multicellulaires.

Les protéines qui se lient aux inhibiteurs de l'apoptose (IAP) Smac/Diablo et HtrA12/Omi sont relâchées de la mitochondrie dans les cellules humaines durant l'apoptose pour la réguler en libérant des caspases (**Figure 10**). Une isoforme d'eRF3 ayant une forme tronquée a été identifiée comme une protéine interagissant avec les IAPs à travers son motif AKPF qui se situe dans la région N-ter. Son interaction avec les IAPs fait activer la caspase et l'apoptose (Hegde et al., 2003). Le facteur a été décrit aussi comme étant un régulateur du facteur ASK1 (*Apoptosis Signal Kinase1*). L'interaction d'eRF3 avec ASK1 induit une activité apoptotique via l'activation de la caspase-3. eRF3 augmente l'autophosphorylation d'ASK1 et de son activité kinase. D'un autre côté, eRF3 inhibe l'interaction d'ASK1 avec son inhibiteur la protéine 14-3-3. Cependant, eRF3 n'a pas d'effet sur l'interaction d'ASK1 avec son activateur TRAF2. Ces résultats montrent que eRF3 a un rôle dans la régulation de l'apoptose médiée par ASK1 (Lee et al., 2008).

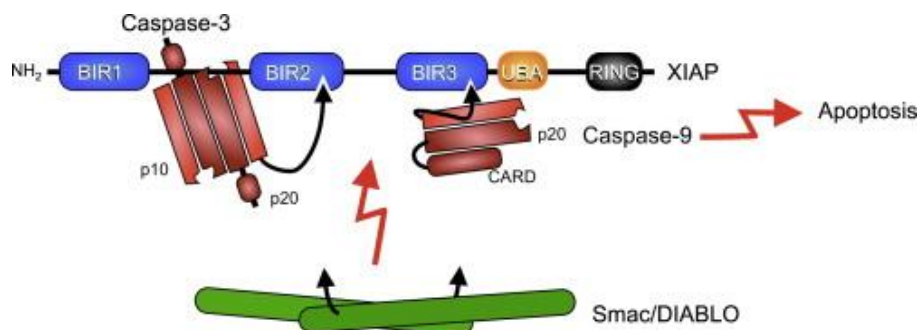


Figure 10 : Représentation schématique du rôle des protéines Smac/DIABLO dans l'induction de l'apoptose.

Chapitre III : La régulation de la stabilité de l'ARN messenger

I. La protéine d'interaction à la queue Poly(A) : PABP

Les protéines qui interagissent avec l'ARN sont vitales pour le fonctionnement de l'ARN. Parmi ces protéines, la protéine *Poly(A) Binding protein* PABP (Pabp1, chez la levure) qui interagit fortement avec la queue Poly(A) des ARNm. En plus de son interaction avec la queue Poly(A), PABP interagit avec de nombreuses autres protéines et est impliquée dans des processus cellulaires variés. Dans le noyau, PABP est impliquée dans la détermination de la taille de la queue Poly(A) et pourrait jouer un rôle dans l'exportation de l'ARNm vers le cytoplasme. Dans le cytoplasme, PABP participe à la régulation de l'initiation de la traduction. Elle protège la queue Poly(A) de la désadénylation mais en même temps elle recrute les complexes protéiques responsables de la désadénylation.

La première partie de ce chapitre est consacrée à la présentation de la protéine PABP, sa structure et ses fonctions. La deuxième partie est consacrée à la présentation des voies de dégradation de l'ARNm et à la régulation de sa stabilité.

I.1. Identification de PABP

Les protéines PABP forment une classe de protéines d'interaction avec l'ARN qui sont hautement conservées et reconnaissent spécifiquement la séquence polyadénilique de l'extrémité 3' de l'ARNm des eucaryotes.

Les membres de cette classe sont dépourvus d'activité catalytique mais sont capables d'interagir avec plusieurs protéines partenaires et avec tous les ARNm eucaryotes. Ces capacités font des protéines PABP, des participants clé dans différents événements cellulaires. La PABP a été découverte 1972 comme étant une protéine majoritaire du cytoplasme qui avait une affinité élevée pour la queue Poly(A) des ARNm (Blobel, 1972). Depuis, il a été montré que PABP accompagne les ARNm depuis leur synthèse jusqu'à leur dégradation : à travers son interaction avec la queue Poly(A) naissante, PABP intervient dans la détermination de sa longueur, elle participe au transport de l'ARNm du noyau au cytoplasme et bien sûr, elle joue un rôle majeur dans le contrôle de la demi-vie de l'ARNm menant celui-ci à la dégradation en fonction des conditions de la croissance cellulaire. Enfin, par son interaction avec les ARN viraux, PABP participe à la réplication de certains virus (revue dans Eliseeva et al., 2013).

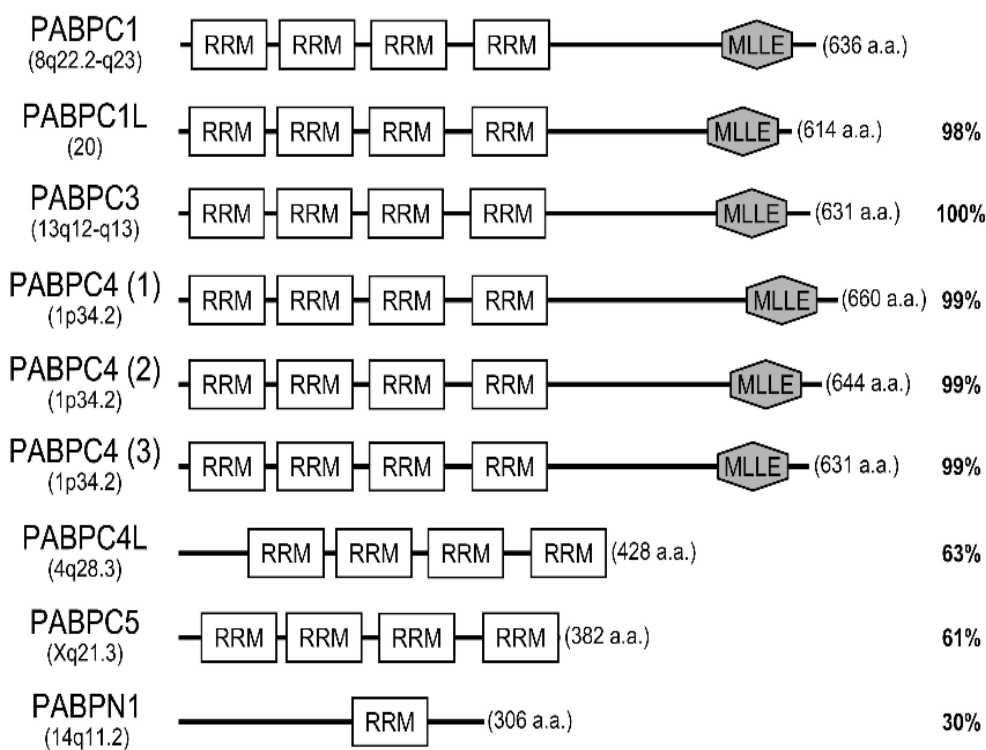


Figure 11 : Organisation structurale des protéines PABP humaines. La position sur le gène, la taille des séquences en acides aminés et l'homologie par rapport à PABPC1 est indiquée en pourcentage. Les trois isoformes de PABPC4 sont représentés (figure issue de Eliseeva et al., 2013).

Chez les mammifères, il existe 9 types de protéine PABP qui peuvent être groupées en : PABP cytoplasmiques (PABPC1 et C1L, PABPC3, PABPC4 et C4L), nucléaire (PABPN1) et, à part,

PABPC5 qui est encodée par le chromosome X (**Figure 11**). Parmi ces protéines, PABPC1 et PABPN1 sont les plus étudiées. Dans mon travail, je me suis intéressée spécifiquement à la forme cytoplasmique PABPC1 qui est couramment appelée PABP.

I.2. Structure et fonction de PABP

Les membres de la famille des PABP diffèrent par leur taille, l'organisation de leurs domaines et l'homologie de leur séquence en acides aminés. Les protéines PABP sont composées de trois parties. Une partie N terminale de 90-100 acides aminés structurée en 2 feuillets β et en 2 hélices α formant un domaine globulaire, une région "linker" et un domaine C-terminal contenant un domaine appelé MLE. La structure et la fonction de ce domaine C-terminal est détaillé dans le chapitre IV. Comme présenté dans la **Figure 12**, la partie N-terminale est caractérisée par la présence de 4 domaines d'interactions à l'ARN, 'RNA Recognition Motif' ou RRM.

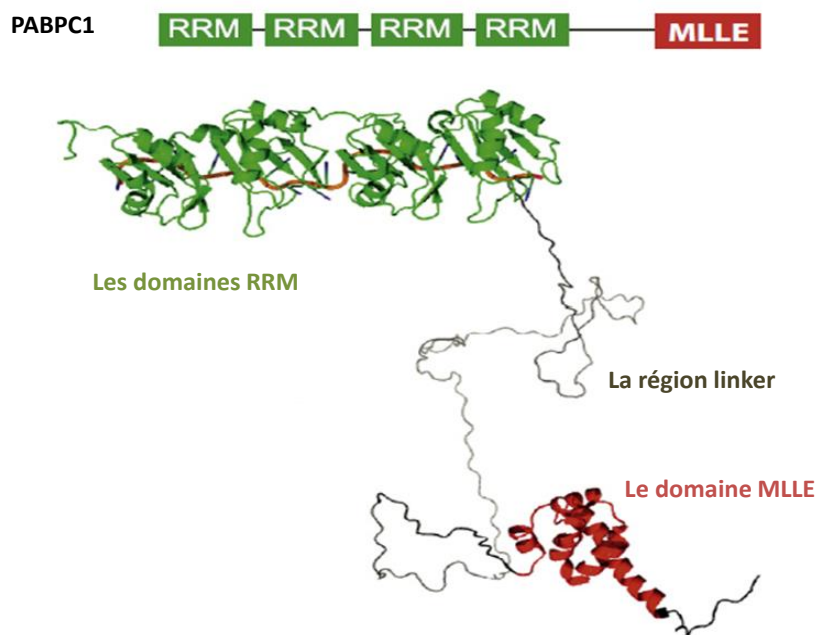


Figure 12 : Structure de PABPC1 cytoplasmique. Le domaine N-terminal est constitué de 4 domaines RRM d'interaction avec l'ARN et à d'autres protéines partenaires. Le domaine C-terminale appelée domaine MLE interagit avec des protéines partenaires portant un site PAM2. Une région linker non structurée permet à PABP de se multimériser (Xie et al., 2014).

Il a été montré, chez l'homme, que les deux derniers RRM, RRM3 et RRM4 possèdent la plus grande affinité pour la queue Poly(A) (Mullin et al., 2004), alors que les deux premiers ne présentent ni spécificité d'interaction, ni une forte affinité pour les répétitions poly(A). La PABPN1 nucléaire, contrairement à PABPC1, est composée d'un seul domaine RRM et son domaine N-terminal est constitué d'acides aminés chargés négativement ; elle présente aussi une extrémité C-terminale courte et riche en arginine.

I.2.1. Les domaines RRM de PABP

La protéine PABP interagit, via ses domaines RRM avec des partenaires protéiques tels que Paip1 (*PABP interacting protein1*), Paip2 (*PABP interacting protein2*), GW182 une protéine des granules à ARN et le facteur d'initiation de la traduction eIF4G (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Les protéines d'interaction avec PABP au niveau de ses domaines RRM.

Protéines	Description	Domaine d'interaction dans PABP	Références
eIF4G	Protéine impliquée dans la circularisation de l'ARNm.	RRM1-2	(Imataka et al., 1998)
GW182	Protéine impliquée dans l'inhibition de la traduction et la dégradation des ARNm par micro ARN.	RRM4	(Huntzinger et al., 2010)
Paip1	Protéine de stimulation de la traduction.	RRM1-2	(Roy et al., 2002)
Paip2	Protéine d'inhibition de la traduction.	RRM2-3	(Berlanga et al., 2006)
Crm1	Protéine de transport.	RRM1	(Brune et al., 2005)
Sxm1/Kap108	Karyophérine : protéines de transport des macromolécules biologiques.	RRM4	(Brune et al., 2005)

Son interaction avec certaines de ces protéines peut influencer son interaction avec la queue Poly(A). Par exemple, l'interaction RRM-eIFG4 induit l'augmentation de l'affinité de PABP pour la queue Poly(A) (von Der Haar et al., 2000). Il a été montré, par différentes méthodes (cristallographie aux rayons X, microcalorimétrie et analyse d'électromobilité) que l'interaction eIF4G-PABP induit des changements conformationnels des domaines RRM et qu'elle est régulée de façon allostérique par l'interaction PABP-Poly(A) (Safaei et al., 2012). Au contraire, l'interaction Paip2-PABP induit une baisse de l'affinité de PABP pour la queue Poly(A). Cela est dû au fait que Paip2 et la queue Poly(A) interagissent avec les mêmes domaines RRM2-3 de PABP (Safaei et al., 2012).

I.2.2. La région "*linker*" de PABP

La région "*linker*" fait partie du domaine C-terminal de PABP, elle est riche en acides aminés proline et méthionine et permet à PABP de se multimériser. Cependant le mécanisme moléculaire mis en place lors de la multimérisation n'est pas encore connu (Simón and Séraphin, 2007). Des expériences de spectroscopie de force par nanopore et de retard sur gel ont montré récemment que l'interaction entre les domaines C-terminaux de deux PABP voisines augmente la coopérativité de l'interaction à la queue Poly(A) (Lin et al., 2012). Selon leur positionnement, les protéines PABP auraient deux façons de se fixer sur la queue Poly(A) : soit avec un mode non coopératif qui correspond à un détachement progressif des PABP de la queue Poly(A), soit sur un mode coopératif qui correspond à un détachement simultané des molécules PABP et à un temps de dissociation plus long. Ces expériences ont aussi montré que ces domaines C-terminaux consécutifs de PABP sont responsables de cette interaction coopérative entre les PABP et la queue Poly(A) (**Figure 13**). De plus, les auteurs proposent qu'environ 50% des complexes Poly(A)-PABP présentent une conformation de liaison non coopérative ce qui serait concordant avec le fait que leurs domaines C-terminaux puissent être engagés dans d'autres liaisons (Lin et al., 2012). Cependant, ces expériences ont été réalisées avec une queue Poly(A) d'une longueur de 50 A qui ne portait qu'une ou deux PABP au maximum.

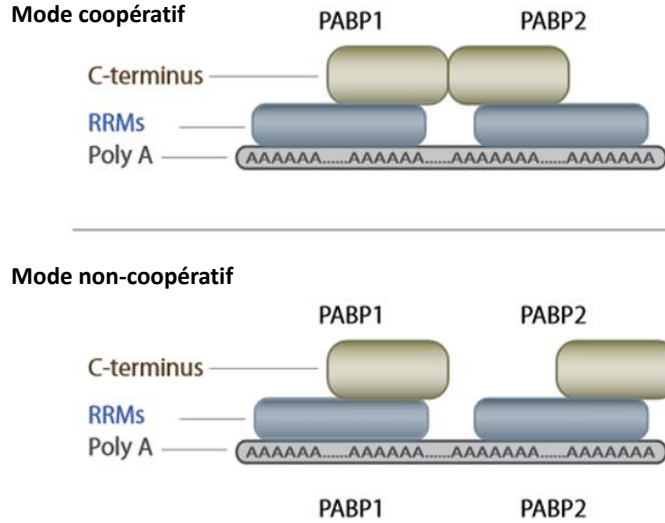


Figure 13 : Illustration schématique du mode d'interaction de deux molécules PABP et d'un Poly(A) de façon coopérative et non coopérative. Le mode coopératif permettrait la stabilisation de l'interaction PABP-PABP à travers le contact des domaines C-terminaux (figure adaptée de Lin et al., 2012).

I.3. Rôles de PABP

Les premières expériences sur la fonction de la queue Poly(A) chez la levure, avaient montré que la déplétion ou l'inactivation de Pabp1 résulte en une augmentation de la taille de la queue Poly(A) des ARNm et une réduction de la traduction (Sachs and Davis, 1989). Ces résultats laissaient supposer que l'élimination de la queue Poly(A) et l'initiation de la traduction sont stimulés par Pabp1. Plus tard, il a été montré que PABP, en fonction de ses interactions avec ses partenaires, est impliqué, d'une part dans l'initiation de la traduction (Tarun and Sachs, 1996) et, d'autre part, dans la régulation de la dégradation de l'ARNm (Boeck et al., 1996). Mais initialement, au moment de la synthèse de l'ARNm dans le noyau, PABP a un rôle dans l'ajout de la queue Poly(A) des ARNm.

I.3.1. Rôle dans la polyadénylation de l'ARNm

La queue Poly(A) se trouve dans l'extrémité 3' de l'ARNm de tous les eucaryotes. Elle est contrôlée par deux PABP, PABPN1 dans le noyau et PABPC1 dans le cytoplasme. PABPN1 est impliqué dans la synthèse des queue Poly(A) en augmentant l'activité de la Poly(A) polymérase

nucléaire (PAP) par stimulation de sa synthèse et elle contribue ainsi à la définition de la longueur des queues Poly(A) fraîchement synthétisés (Kühn and Wahle, 2004). PABPN1 protège aussi la queue poly(A) naissante contre la dégradation. Les interactions consécutives de PABPN1 induit la formation d'une sphère signifiant que la taille requise de la poly(A) est atteinte. Par ailleurs, PABPC1 a été détectée dans le noyau en complexe avec PAP et l'ARN non épissé (Hosoda et al., 2006). Il a été considéré que la substitution de PABPN1 par PABPC1 provoque la terminaison de la polyadénylation et ainsi l'exportation de l'ARNm du noyau vers le cytoplasme. Récemment, il a été montré que des cellules déplétées en PABPN1 ne montrent pas de perturbation dans la transcription ni dans la polyadénylation. Ce qui signifie que sa fonction est assurée par ses homologues cytoplasmiques. La déplétion de PABPN1 entraîne une translocation nucléaire de PABPC4 qui joue le rôle de PABPN1 et le taux de PABPC5 augmente dans le cytoplasme afin de compenser le rôle de PABPC4. Ce qui suggère que les PABP cytoplasmiques sont transférés au noyau pour participer à la maturation de l'ARNm. De plus, la déplétion de PABPN1 provoque une augmentation des cellules apoptotiques ce qui prouve son rôle anti-apoptotique (Bhattacharjee and Bag, 2012).

PABP utilise les domaines RRM pour son interaction avec la queue Poly(A). La taille minimale pour qu'un Oligo(A) porte une molécule de PABP est de 12 nucléotides mais la mesure de la densité de PABP sur du poly(A) a montré que PABP occupait environ 25 nucléotides (Sachs et al., 1987).

I.3.2. Rôle dans la traduction

Il a été supposé que la PABP cytoplasmique s'associe avec la queue Poly(A) et stimule l'initiation de la traduction. Dans le cytoplasme, PABPC1 interagit avec la coiffe m⁷GppG et l'extrémité 5' de l'ARNm. PABP interagit avec le facteur d'initiation de la traduction eIF4G à travers les domaines de reconnaissance RMM1-2 (Gray et al., 2000). La protéine eIF4G est membre du complexe eIF4F (coiffe, eIF4E et l'ARN hélicase eIF4A), agit comme un lien pour permettre l'association d'autres membres à ce complexe. Le facteur eIF4G interagit aussi avec eIF3 qui lui-même recrute la sous unité ribosomique 40S. L'interaction de PABP avec eIF4E par l'intermédiaire eIF4G augmente ainsi son affinité pour la coiffe d'environ un ordre de

grandeur (von Der Haar et al., 2000) et contribue à la formation d'une structure circulaire de l'ARNm (**Figure 14**).

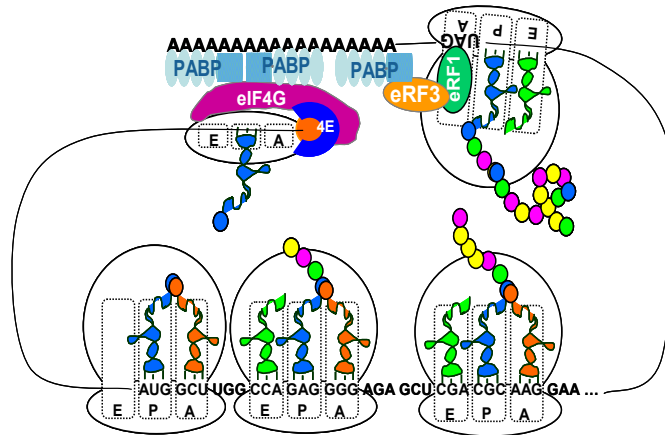


Figure 14: Représentation schématique d'un ARNm en cours de traduction. La circularisation de l'ARNm est établie grâce à l'interaction entre PABP et eIF4G lui-même fixé à eIF4E.

L'interaction eRF3-PABP pourrait apporter un support supplémentaire à cette conformation (Uchida et al., 2002). Tout cela suggère que l'initiation de la traduction est stimulée par PABP localisé dans l'extrémité 3'. L'interaction de PABP avec eIF4A entraîne le déroulement de la partie 5'UTR de l'ARNm ce qui facilite le balayage "*scanning*" de la région 5'UTR par le complexe de pré-initiation 43S (Imataka et al., 1998).

La régulation de la traduction est aussi médiée par l'interaction de PABP avec Paip1 et Paip2. Ces protéines s'associent avec PABP de la même façon mais avec des affinités différentes (voir plus loin). Elles ont cependant des effets opposés sur la traduction. L'interaction Paip1-PABP maintient la stimulation de la traduction car PABP acquiert de l'affinité pour eIF4A et favorise le déroulement des structures secondaires de la partie 5'UTR (Craig et al., 1998). La traduction semble aussi être stimulée par la formation du complexe PABP-Paip1-eIF3 (Martineau et al., 2008). En revanche, l'interaction Paip2-PABP réduit la capacité de PABP d'interagir avec eIF4G ce qui résulte dans l'inhibition de la traduction (Khaleghpour et al., 2001).

Par ailleurs, dans certains cas, l'interaction de PABP avec des protéines associées à la région 3'UTR entraîne l'inhibition de la traduction. C'est le cas des ARNm de p21_{WAF1}, de c-mos, et de la doublecortine qui contiennent l'élément [G/A]U(1-3)AGU. Ces ARNm sont la cibles de la

protéine Msi1 (Musashi 1) qui se fixe sur cet élément et bloque l'interaction de PABP avec eIF4G et provoque donc l'inhibition de la traduction (Ohyama et al., 2012). PABP est aussi un membre des complexes de régulation de certains ARNm tels que ceux de PRE, Tim (Lim et al., 2011), et de l'insuline (Kulkarni et al., 2011). Mais le rôle de ces complexes reste encore obscur.

Ces exemples montrent que PABP est une protéine 'médiateur' dans différents processus de la traduction. Chez les eucaryotes, l'addition d'une queue Poly(A) aux ARNm nucléaires assure leur stabilisation et leur export, et dans le cytoplasme elle assure leur traduction. Rappelons que la queue Poly(A) des ARNm peut porter jusqu'à dix molécules de PABP et que les cycles de désadénylation et de polyadénylation cytoplasmiques jouent un rôle clé dans la régulation de la traduction et dans la dégradation des ARNm (Wiederhold and Passmore, 2010). La protéine PABP est avant tout un protecteur de la queue Poly(A) contre la désadénylation et donc un élément clé dans la stabilité de l'ARNm.

II. Stabilité et dégradation de l'ARNm

Il était clair, dès les premières études sur la production des ARNs, que la cellule produit plus d'ARN qu'elle n'en accumule. Ce qui impliquait l'existence d'un système de dégradation des ARN. Une vision sommaire de cette dégradation était que l'ARN est dégradé à la fin de sa vie, c'est à dire après avoir rempli sa fonction. Ainsi, la durée de vie d'un ARN ribosomique est longue, le ribosome étant un édifice macromoléculaire stable, alors que celle de l'ARNm est plus courte et liée à sa traduction. Cependant, la découverte de multiples voies de dégradation de l'ARN, de l'ARNm en particulier, et les nombreux processus de régulation qui contrôlent ces voies de dégradation ont largement modifié cette vision. La dégradation des ARN est aujourd'hui un élément à part entière de la régulation de l'expression des gènes. Elle est omniprésente dans toutes les cellules, et doit être soigneusement être contrôlé pour cibler précisément des gènes spécifiques. En plus de contrôler le taux de chaque ARN pour le maintenir au niveau voulu par la physiologie cellulaire, la dégradation se charge de l'élimination des molécules d'ARNm présentant des défauts de séquence, d'épissage, de repliement, ou même portant une altération des nucléotides qui les constituent (Simms et al., 2014). Ces molécules

sont identifiées puis rapidement dégradées par des mécanismes de surveillance/dégradation tels que la NMD (*Non-sense Mediated Decay*) quand un ARNm contient un codon stop prématuré dû à une mutation ou un défaut d'épissage, le NSD (*Non Stop Decay*) quand un ARNm ne porte pas de codon stop (ARNm tronqué) et le NGD (*No go Decay*) quand l'élongation de la traduction est bloquée par un nucléotide aberrant ou une structure secondaire (Mazzoni and Falcone, 2011).

Je ne décrirai pas toutes les voies de dégradation de l'ARN pour me concentrer sur celles qui concernent l'ARNm et, principalement, la voie de dégradation désadénylation-dépendante.

II.1. La dégradation par la voie de dégradation désadénylation-dépendante

II.1.1. L'étape limitante de la dégradation : la désadénylation

La queue Poly(A) des ARNm joue un rôle important dans la stabilité de l'ARNm et dans l'efficacité de la traduction. Après sa synthèse et son export dans le noyau, l'ARNm porte une queue Poly(A) d'une taille de 200 à 250 nucléotides (nt). L'élimination cytoplasmique de la queue Poly(A) des ARNm se fait sous l'action d'exonucléase 3'→5', cette désadénylation est l'étape limitante du processus de dégradation des ARNm normaux. Deux complexes exonucléases contribuent majoritairement à l'activité de désadénylation chez les eucaryotes : les complexes PAN2-PAN3 et CCR4-Caf1-NOT (plus couramment nommé CCR4-NOT). Ces complexes sont très conservés des levures aux mammifères. Le processus de désadénylation est réversible et serait un point de contrôle permettant de réguler l'expression de certains ARNm intervenant dans la croissance cellulaire et la différenciation au moment de l'embryogenèse (Standart and Minshall, 2008).

II.1.2. Les complexes de désadénylation PAN2-PAN3 et CCR4- NOT

Les complexes PAN2-PAN3 et CCR4-NOT sont des complexes exclusivement cytoplasmiques. La nucléase Poly(A) (PAN) est la première enzyme de désadénylation qui a été découverte

(Sachs and Deardorff, 1992). Chez les mammifères comme chez la levure, PAN est constituée de deux sous unités PAN2 et PAN3 où PAN2 porte l'activité enzymatique de désadénylation. La désadénylase PAN2 contient un domaine nucléase de DEDD/RNaseD de la famille des exonucléases 3'→5'. PAN3 est une sous-unité régulatrice qui interagit à la fois avec PAN2 et avec PABP. La sous-unité PAN3 contient un motif nommé 'PAM2' afin pour le domaine C-terminal de PABP (Siddiqui et al., 2007). L'activité désadénylase de PAN2 est stimulée par PABP en présence de PAN3 (Uchida et al., 2004).

La désadénylation résulte cependant de l'action consécutive des deux désadénylases PAN2 et CCR4-Caf1 (Yamashita et al., 2005). Le complexe CCR4- Caf1-NOT a été décrit comme le complexe de désadénylation majoritaire dans la cellule. Ce complexe contient plusieurs sous-unités. Les deux seules sous-unités catalytiques sont CCR4 et Caf1. Elles ont une activité exonucléase 3'→5'. NOT est une protéine qui s'associe au complexe mais n'a pas d'activité catalytique.

Ces deux complexes peuvent être recrutés à la queue Poly(A) des ARNm par deux mécanismes indépendants : un premier mécanisme général où les complexes sont recrutés à l'ARNm via les interactions avec PABP (par l'intermédiaire de PAN3 et TOB) et un mécanisme alternatif de désadénylation où le recrutement se fait via les interactions avec des protéines interagissant sur des séquences spécifiques en 3'UTR de l'ARNm ou bien à travers la machinerie de microARN (Figure 15).

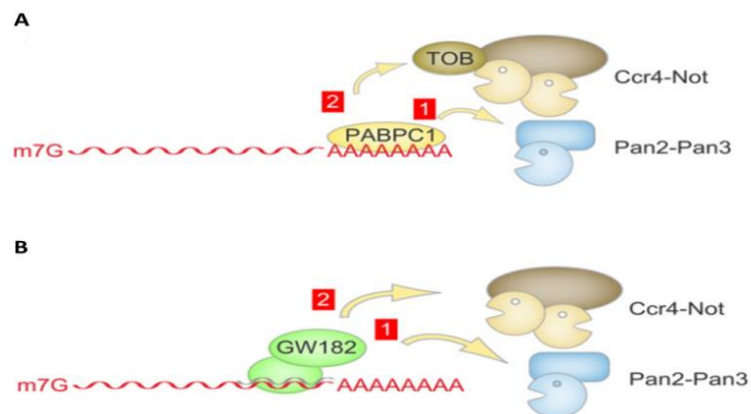


Figure 15 : Représentation schématique du recrutement des désadénylases. (A) recrutement général des complexes Pan2-Pan3 et TOB-Ccr4-Not à travers les interactions avec PABP et le motif PAM2 de Pan3 et TOB. (B) Recrutement spécifique de Pan2-Pan3 et TOB-Ccr4-Not à travers l'interaction avec GW182 de la machinerie de microARN (Winkler and Balacco, 2013).

II.2. Le mécanisme général de dégradation des ARNm normaux

La queue Poly(A) à l'extrémité 3' de l'ARNm subit la désadénylation dès que l'ARNm mature arrive dans le cytoplasme. Elle se réalise indépendamment du fait que le transcrit contienne ou pas des éléments de déstabilisation. Chez la levure, le complexe PAN2-PAN3 qui intervient dans un premier temps nécessite la Pab1 pour la suppression de la queue Poly(A). De même, le complexe humain homologue est aussi fortement stimulé par PABP. Il est généralement admis que PABP est exigé pour le recrutement du complexe *in vivo*, donc cela suggère que PAN2-PAN3 n'est actif que sur un complexe Poly(A)-PABP. L'activité enzymatique de désadénylation de PAN2 est distributive (Yamashita et al., 2005). Son action réduit la longueur de la queue Poly(A) à une centaine de nucléotides. Dans une seconde étape, le complexe CCR4-NOT dégrade le reste de la queue Poly(A), ne laissant subsister qu'une dizaine de nucléotides. L'action de ce complexe est processive. Quand la queue est suffisamment courte (quelques résidus adénosine), l'ARNm peut être dégradé à partir de son extrémité 3' par un complexe exonucléasique 3'→5', l'exosome. Cette voie de dégradation par l'exosome n'est cependant pas la voie la plus fréquemment utilisée. Il est généralement admis que les ARNm désadénylés sont majoritairement sujet au décoiffage de leur extrémité 5' qui est assuré par le complexe Dcp1-Dcp2 (*Decapping protein 1/2*). Une fois la coiffe mG⁷ enlevée, l'extrémité 5' de l'ARNm est accessible à l'exoribonucléase XRN1 qui dégrade l'ARNm à partir de son extrémité 5' (revue dans Garneau et al., 2007) (**Figure 16**). L'étape de décoiffage est sous le contrôle de l'interaction PABP-eIF4G. PABP semble à lui seul gêner les protéines Lsm1p-7p qui activent les enzymes de décoiffage (Parker and Song, 2004).

Par ailleurs, il a été décrit que les facteurs TOB/BTG peuvent avoir une influence importante sur la désadénylation. Ces protéines appartiennent à la famille des protéines antiprolifératives dont l'expression est altérée dans différents cancers. Les protéines TOB ont la capacité d'inhiber la prolifération cellulaire (Wahle and Winkler, 2013) et régulent le cycle cellulaire (Winkler and Balacco, 2013). Elles peuvent interagir, d'une part, avec la désadénylase Caf1 ((Mauxion et al., 2009) et, d'autre part, avec PABP par l'intermédiaire de leur motif PAM2 (Ezzeddine et al., 2007). Il a été montré que les protéines TOB/BTG peuvent activer la désadénylation des ARNm des cellules en culture (Ezzeddine et al., 2007, 2012). Cette activation est due à 2 rôles de TOB : d'une part, le recrutement de Caf1 par TOB augmente son

activité désadénylase et, d'autre part, le recrutement sur PABP lié à la queue Poly(A) du complexe TOB-CCR4-NOT initie la désadénylation de l'ARNm (Funakoshi et al., 2007). L'affinité de TOB pour PABP n'affecte pas son interaction avec Caf1 (Ruan et al, 2010). D'après ces descriptions, TOB fait partie des éléments importants pour la régulation globale des ARNm par la désadénylation. Ainsi TOB est intégré dans le mécanisme du recrutement général des désadénylases sur la queue Poly (A).

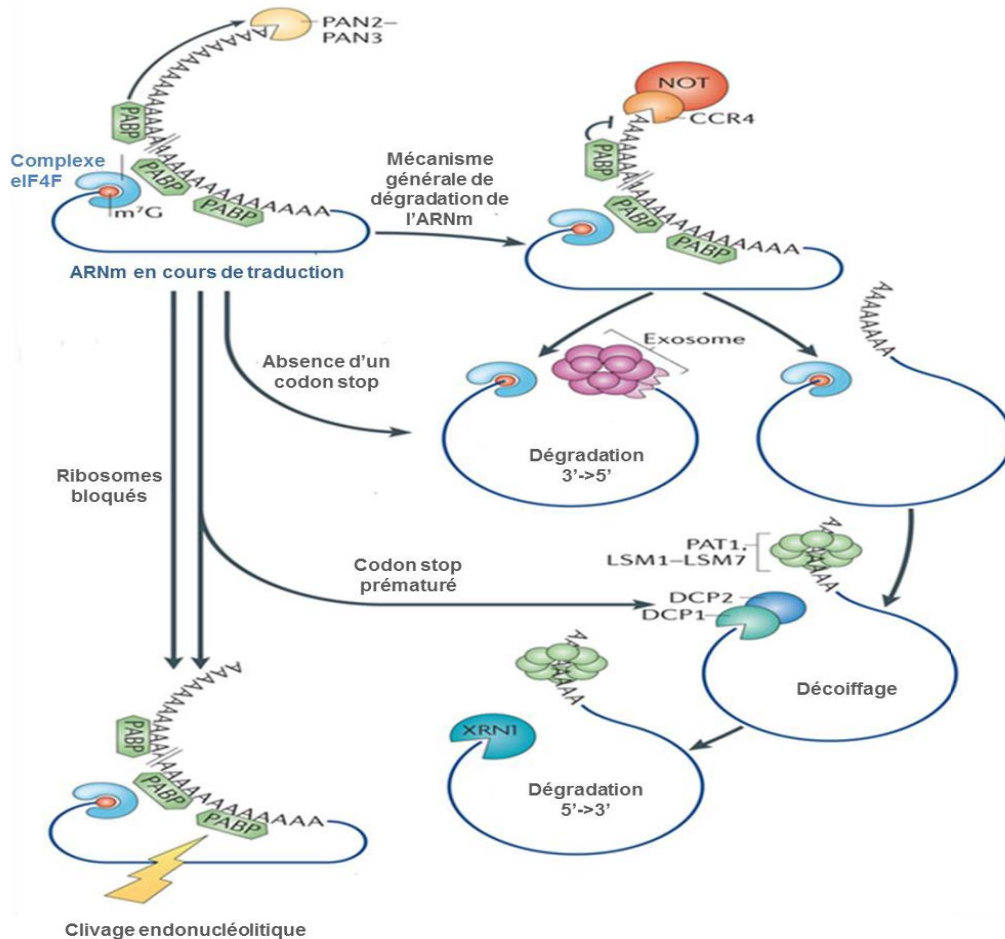


Figure 16 : Les voies de dégradation de l'ARNm. La 1^{ère} étape de la désadénylation est assurée par le complexe PAN2-PAN3 stimulé par PABP. La seconde étape est une désadénylation sous l'action du complexe CCR4-NOT qui est inhibé par PABP mais peut être stimulé par les protéines fixées aux éléments de régulation de la région 3'UTR. Une fois que la queue Poly(A) résiduelle a atteint une taille de 12 nucléotides ou moins, PABP ne peut plus se fixer. Deux voies de dégradation sont mises en place : la dégradation 3'→5' exonucléolytique sous l'action du complexe exosome ou plus fréquemment il y a recrutement du complexe Dcp1-Dcp2 qui retire la coiffe en 5' des ARNm. Lsm7 qui stimule le décoiffage par le complexe Dcp1-Dcp2. Il y a ensuite une dégradation 5'→3' de l'ARNm sous l'action de l'exonucléase XRN1. L'absence de codon stop et de terminaison de la traduction court-circuite le mécanisme général de dégradation en stimulant la voie de dégradation 3'→5' médiée par l'exosome (*non-stop-decay* NSD). En revanche, quand la traduction est bloquée et que les ribosomes sont arrêtés, un clivage endonucléolytique de l'ARNm est déclenché (voie *no-go-decay* NGD). La présence d'un codon stop prématuré entraîne non seulement un clivage endonucléolytique de l'ARNm mais aussi une désadénylation et un décoiffage (voie *non-sens-mediated decay* NMD). (Norbury, 2013).

Récemment, il a été montré que la protéine TOB régule le recrutement des complexes désadénylases CCR4–NOT pour des ARNm spécifiques, tels que celui de l'oncogène *myc*, sur le 3'UTR desquels les protéines CPEB (*cytoplasmic polyadenylation element-binding protein*) peuvent interagir. CPEB recrute la désadénylase Caf1 à travers son interaction avec TOB et régule négativement l'expression de *myc* en dégradant son ARNm (Ogami et al., 2014).

La **Figure 16** récapitule les différentes voies de dégradation des ARNm normaux ou aberrants et les différentes situations pouvant déclencher cette dégradation.

II.3. La dégradation par miRNA

Dans les cellules mammifères, 60% des ARNm sont régulés par des microARN (Friedman et al., 2009). Le participant majeur de cet événement est le complexe RISC. Ce complexe comprend le micro-ARN, la protéine Ago (Argonaute) et la protéine GW182. Il interagit avec l'ARNm cible, conduisant à l'inhibition de la traduction et éventuellement à la dégradation de l'ARNm. La protéine GW182 interagit avec PABP et recrute les complexes de désadénylation CCR4–NOT, PAN2-PAN3 et l'ubiquitine ligase E3. Les protéines PAN3, NOT et PABP peuvent interagir au niveau du domaine C-terminal de GW182. GW182 interagit avec PABP, en particulier par son site PAM2, mais le rôle de cette interaction reste peu clair. (Fabian and Sonenberg, 2012). GW182 semble aussi stimuler l'activité des désadénylases (Fabian et al., 2011). Certains auteurs pensent que PABP joue le rôle d'un médiateur de la répression de la traduction par micro-ARN (Moretti et al., 2012). Il pourrait apporter à l'ARNm les protéines du complexe RISC à travers son interaction avec la protéine GW182. La protéine GW182 pourrait entrer en compétition avec eIF4G et probablement avec la queue Poly(A) pour se fixer à PABP, interférant avec la circularisation de l'ARNm et menant à sa dégradation (Zekri et al., 2009). L'interaction du complexe RISC avec l'ARNm pourrait aussi entraîner le déplacement de PABP ce qui déclencherait le mécanisme de répression de la traduction et la dégradation (revue dans Eliseeva et al., 2013). Le recrutement du complexe CCR4-NOT par GW182 pourrait enfin perturber l'interaction de PABP et la conformation circulaire de l'ARNm et donc inhiber l'initiation de la traduction et conduire à la dégradation de l'ARNm (Zekri et al., 2013)(**Figure 17**).

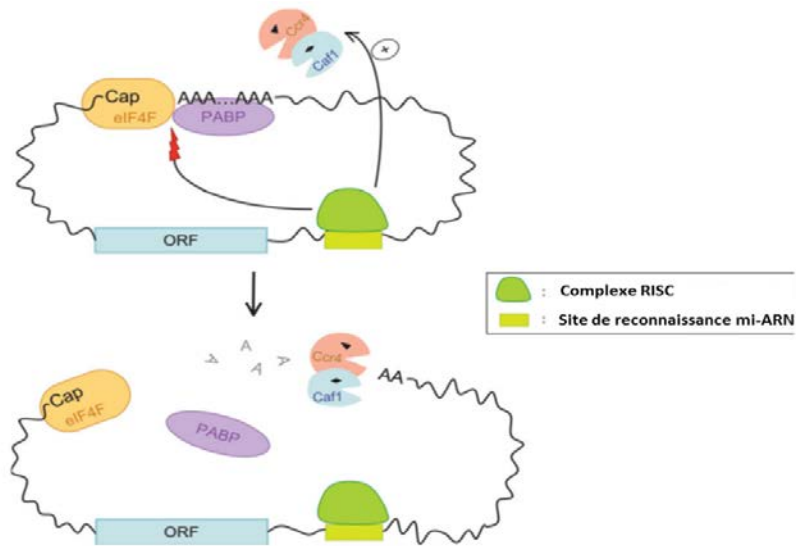


Figure 17: Représentation schématique du mode de la désadénylation sous l'action du complexe RISC. Le complexe RISC interagit avec le site de reconnaissance des micro-ARN et induit le recrutement direct du complexe Ccr4-Caf1 qui dégrade la queue Poly(A) et provoque la destruction de l'interaction PABP-eIF4F et la perte de la forme circulaire de l'ARNm (Chen and Shyu, 2011).

II.4. La dégradation par la voie NMD

La voie NMD (*Nonsense-Mediated mRNA Decay*) est un mécanisme de surveillance qui dégrade les ARNm contenant un codon stop prématuré (PTC). La terminaison prématurée de la traduction rend les ARNm cibles de la NMD (revue dans Amrani et al., 2006). Dans les cellules mammifères, la reconnaissance des PTCs nécessite la présence du complexe EJC (*Exon Junction Complex*) sur l'ARNm. La présence de ce complexe en aval d'un codon stop va permettre de discriminer entre un codon stop naturel et un codon stop prématuré. Le facteur Upf1, une ATPase/hélicase ARN-dépendante et la protéine kinase SMG1 (*phosphatidylinoditol kinase-related serine/threonine*) s'associent avec le complexe de terminaison eRF1 et eRF3 pour former le complexe SURF. (Kashima et al., 2006). Une fois la terminaison de la traduction achevée au codon stop prématuré, Upf1 est phosphorylé par SMG1 et recrute le complexe SMG6, 5 et 7 sur l'ARNm. L'ARNm est dégradé d'abord par l'action endonucléolytique de SMG6 et les fragments résiduels sont dégradés par les complexes exonucléasiques décrits plus haut: exosome 3'->5' et XRN1 5'->3' (**Figure 18**).

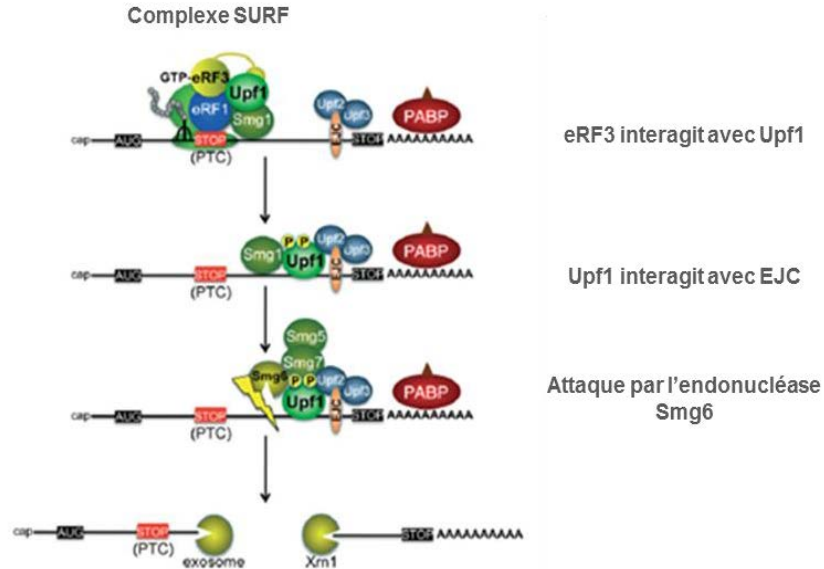


Figure 18 : Mécanisme de la NMD chez les mammifères. Quand le ribosome arrive au codon de terminaison de la traduction prématuré, les facteurs de terminaison de la traduction eRF3 et eRF1 sont en complexe avec Upf1 et Smg1. eRF1 reconnaît le codon de terminaison de la traduction dans le site A ribosomique. La SMG1 catalyse la phosphorylation d'Upf1. Le complexe EJC, qui habituellement est déplacé par le ribosome, reste associé à l'ARNm et déclenche la phosphorylation d'Upf1. Upf1 phosphorylé, recrute l'endonucléase SMG6 (d'après Hoshino, 2012).

Le facteur eRF3 est très impliqué dans la NMD. Certaines mutations de eRF3 entraînent l'accumulation de transcrits contenant des PTC tels que les ARNm his7-1 et CYH 2. Ces mutations diminuent l'efficacité de la traduction mais, paradoxalement, augmentent la stabilité de ces ARNm (Murina et al., 2010). Cet effet serait dû à un défaut du complexe SURF.

Plus généralement, l'interaction PABP-eRF3 serait impliquée dans le processus déterminant si l'ARNm va être dégradé par la voie normale ou par la NMD. En effet, la longueur de la partie 3'UTR est déterminante pour la NMD et la distance entre le codon de terminaison et la queue Poly(A) est cruciale pour déterminer si l'ARNm va être dégradé par la voie NMD ou la voie générale de dégradation-désadénylation-dépendante.

La voie NMD permet donc d'éliminer non seulement les ARNm portant un codon stop prématuré mais aussi ceux ayant une longue région 3'UTR (Kebaara and Atkin, 2009; Zaborske et al., 2013). Pour expliquer cela, les modèles récents de la NMD suggèrent que une grande distance physique entre la queue Poly(A) et le codon de terminaison de la traduction réduit l'interaction entre PABP et eRF3 pendant la traduction. Ce qui mène eRF3 à recruter le facteur de la NMD Upf1 et la NMD est déclenchée, le codon stop naturel étant reconnu comme un

codon stop prématuré. Dans le cas où la distance codon stop-queue Poly(A) favorise l'interaction d'eRF3 avec PABP, la dégradation désadénylation-dépendante est déclenchée. Etant donné que PAN3 comme eRF3 est une protéine qui interagit avec PABP, l'absence d'une interaction entre eRF3 et PABP peut augmenter l'interaction de PAN3 avec PABP, ce qui favorise le recrutement des complexes de désadénylation PAN2-PAN3 et CCR4-NOT au complexe PABP-Poly(A). Ainsi, la protéine PABP a été définie comme un facteur bloquant la NMD (Singh et al., 2008). Autrement dit, Upf1 entre en compétition avec PABP pour l'interaction avec eRF3. Par ailleurs, il a été montré que l'interaction de PABP avec eIF4G (qui permet la circularisation de l'ARNm) est essentielle pour l'inhibition de la NMD par la PABP. De plus, le recrutement d'eRF3 ou d'eIF4G à proximité du codon stop prématuré bloque la NMD. eIF4G est un antagoniste à la NMD, ce qui suggère un lien entre la terminaison de la traduction, la circularisation de l'ARNm et le blocage de la NMD (Fatscher et al., 2014).

Pour conclure ce chapitre, les protéines PABP, eRF3, PAN3 et TOB sont impliquées dans le mécanisme général de désadénylation. La capacité des deux complexes PAN2-PAN3 et CCR4-NOT à interagir avec PABP peut induire le mécanisme général de la désadénylation qui pourrait également être impliqué dans la terminaison de la traduction (Funakoshi et al, 2007).

La terminaison de la traduction à elle seule ne déclenche pas la dégradation des ARNm. eRF3 serait un médiateur qui, par son interaction avec PABP, fait transiter le signal de la terminaison vers la dégradation (Kobayashi et al., 2004). Comment est formée l'interaction de PABP avec eRF3 ? Comment cette interaction est-elle impliquée dans la stabilité des ARNm? Ces questions feront l'objet du chapitre suivant.

Chapitre IV : L'interaction eRF3-PABP et son implication dans la régulation de la stabilité des ARNm

A travers son interaction avec PABP, le facteur de terminaison de la traduction eRF3 est aussi impliqué dans la dégradation des ARNm. L'hypothèse sur le rôle d'eRF3 comme intermédiaire entre la dégradation des ARNm et la désadénylation est apparue avec Hosoda et collaborateurs en 2003. Les auteurs postulent que le processus de dégradation de l'ARNm désadénylation-dépendante est couplé à la terminaison de la traduction (Hosoda et al., 2003). Depuis, plusieurs modèles décrivant le rôle d'eRF3 dans le processus de régulation de la dégradation des ARNm ont été proposés, principalement sur la base d'expériences décrivant l'interaction entre PABP, eRF3 et les complexes de désadénylation. Ce chapitre est consacré à la définition de l'interaction eRF3-PABP et à la présentation de ces modèles.

I. L'interaction eRF3-PABP

I.1. Identification de l'interaction eRF3-PABP

Dans le cadre de la recherche sur la fonction du site N-terminal d'eRF3 (qui n'est pas impliqué dans son interaction avec eRF1), un système de levure double hybride a été utilisé pour identifier les partenaires d'interaction à eRF3 au niveau de sa région N-terminale. Une banque d'ADNc de lymphocytes T humains a été criblée dans ce système. Le résultat du criblage a montré que PABP interagit avec eRF3. Des analyses complémentaires ont montré que l'interaction se fait entre le domaine N-terminal d'eRF3 et le domaine C-terminal de PABP. De plus, des expériences de retard sur gel suggéraient que l'interaction de PABP avec eRF3

empêchait l'interaction de PABP avec un autre PABP (Hoshino et al., 1999). Même si l'interprétation de ces résultats était très spéculative, on voyait apparaître pour la première fois dans cet article la notion d'un lien entre la terminaison de la traduction et la longueur de la queue Poly(A).

L'interaction eRF3-PABP a été confirmée ensuite par les travaux de Cosson et collaborateurs en 2002. Cette équipe a montré qu'eRF3 interagit avec PABP *in vivo* à travers des expériences d'immuno-précipitation en utilisant des cellules humaines et des cellules de *Xenopus laevis*. De plus, des expériences de levure double hybride ont montré précisément que les 39 derniers acides aminés de la région C-terminale de PABP étaient nécessaires pour son interaction avec eRF3 (Cosson et al., 2002).

I.2. L'interaction MLLE-PAM2

La protéine PABP interagit avec des partenaires protéiques qui portent un motif PAM (*PABP interacting Motif*). La mise en évidence de cette interaction a débuté avec Khaleghpour et collaborateurs en 2001. Ils ont montré que le facteur Paip2 possède un premier motif PAM situé dans son domaine N-terminal (nommé PAM1) et qui interagit fortement avec les motifs RRM2-3 de PABP et un deuxième motif dans son domaine C-terminal (nommé PAM2) qui interagit plus faiblement avec le domaine C-terminal de PABP (Khaleghpour et al., 2001). Peu après, dans le cadre de l'étude de l'interaction de Paip1 avec PABP, des expériences de Far-Western montrent que les protéines Paip1 et PABP interagissent aussi par 2 sites différents. Des expériences de GST-Pull down montrent que le premier site, PAM1, de Paip1 interagit avec les motifs RRM1-2 de PABP et que le deuxième site, PAM2, de Paip1 interagit avec le domaine C-terminal de PABP (Roy et al., 2002).

Afin de mieux définir le site PAM2, des expériences de spectroscopie RMN sur des fragments peptidiques de la région C-terminale de Paip1, de Paip2 et de la région N-terminale d'eRF3 en présence du domaine C-terminal de PABP ont été réalisées pour identifier les séquences de chacun des motifs PAM2. Concernant Paip1 et Paip2, leurs motifs PAM2 sont constitués chacun de 15 résidus. Pour eRF3, du fait de la présence de 2 sites PAM2, nommés PAM2-N et

PAM2-C, chevauchant dans le N-terminal d'eRF3 (voir plus loin), il a été difficile de délimiter les extrémités des sites PAM2 (Kozlov et al., 2004).

D'un autre côté, des expériences de spectroscopie RMN ont permis d'identifier les acides aminés du domaine C-terminal de PABP qui sont en interaction avec son partenaire Paip2 (Kozlov et al., 2001). Il a ainsi été montré que la région de PABP qui interagit avec le site PAM2 de Paip2, est constituée de 70 résidus et forme 5 hélices α (**Figure 19**). L'alignement de ce domaine entre différentes espèces, montre la présence de quatre acides aminés (M, L, L, E) conservés situés au cœur du site de reconnaissance du peptide. Il est alors nommé domaine 'MLLE' ("mademoiselle").

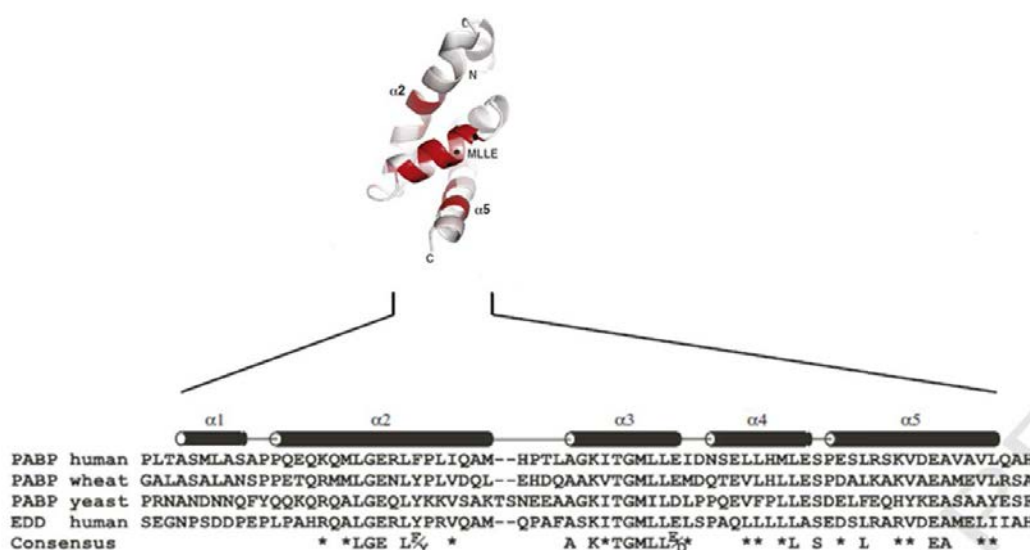


Figure 19 : Représentation schématique du domaine MLLE de PABP montrant les résidus conservés qui composent le site d'interaction aux motifs PAM2. Les motifs les plus conservés qui donnent la séquence du domaine MLLE sont dans l'hélice 3 colorés en rouge. Alignement des séquences du domaine MLLE de PABP chez l'homme, le blé et la levure (Xie et al., 2014).

Par ailleurs, la comparaison par alignement des quatre peptides PAM2 (de Paip1, Paip2 et eRF3) a révélé la présence de quatre résidus conservés sur un ensemble de 15 résidus. Les résidus leucine L3, asparagine N6, alanine A7 et Phénylalanine F10 apparaissent comme importants pour l'interaction de PAM2 à PABP (**Figure 20**). Les autres résidus sont variables (Kozlov et al., 2001).

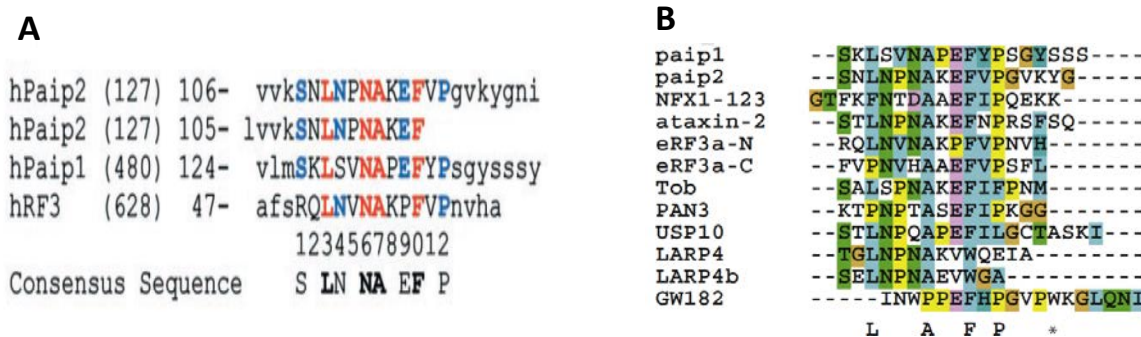


Figure 20: Les sites PAM2 de Paip1, Paip2, eRF3 et d'autres protéines interagissant avec PABP. (A) Alignement des 4 séquences des peptides d'interaction avec PABP et les séquences consensus déduites. Les peptides proviennent des facteurs humain Paip1, Paip2 et eRF3. Les résidus en commun sont en rouge (Kozlov et al., 2001). (B) Alignement de séquences PAM2 qui interagissent avec le domaine MLLE de PABP. Le domaine C-terminal de PABP nommé MLLE reconnaît une séquence peptidique conservée (L/P/F)(P/V)XAXX(F/W)XP nommé aussi motif d'interaction à PABP (PABP-interacting Motif 2) ou PAM2. Les résidus consensus qui contribuent à cette interaction sont présentés. L'Astérisque marque le tryptophane dans la protéine GW182 qui interagit avec le MLLE (Xie et al., 2014).

1.2.1. La reconnaissance PAM2-MLLE

Les structures cristallines du domaine MLLE seul ou en présence du motif PAM2 ont été déterminées. Ces structures mettent en évidence des interactions intermoléculaires hydrophobes entre le domaine MLLE et PAM2 et révèlent de nouvelles interactions polaires (Kozlov et al., 2010). Des structures cristallines du domaine MLLE en complexe soit avec les peptides PAM2 de Paip2, de GW182 ou de l'Ataxine-2 (Kozlov et al., 2010) ou d'eRF3 (Kozlov and Gehring, 2010) ont permis de montrer que les liaisons hydrophobes sont responsables de l'interaction du domaine MLLE avec le motif PAM2. Le domaine MLLE ne subit aucun changement conformationnel suite à l'interaction du PAM2, ce qui suggère que la reconnaissance vient du motif PAM2 (Kozlov et al., 2010). Les motifs PAM2 interagissent avec le domaine MLLE en s'engageant dans deux poches hydrophobes localisées autour de l'hélice centrale $\alpha 3$ (**Figure 21**). Ces deux poches fournissent les interactions les plus importantes et engagent les résidus conservés leucine et phénylalanine du motif PAM2. La phénylamine est retrouvée dans toutes les protéines portant le motif PAM2 sauf la protéine LARP4 où à la place de la phénylalanine il y a un tryptophane. Afin de lier les deux poches, le peptide PAM2 entoure l'hélice $\alpha 3$ centrale en comblant l'espace créé par le résidu glycine central qui se trouve sur la séquence conservée

‘KITGMLLE’ de l'hélice $\alpha 3$. L'alanine centrale du motif PAM2 interagit avec cette glycine du domaine MLLE (Figures 19, 20 et 21).

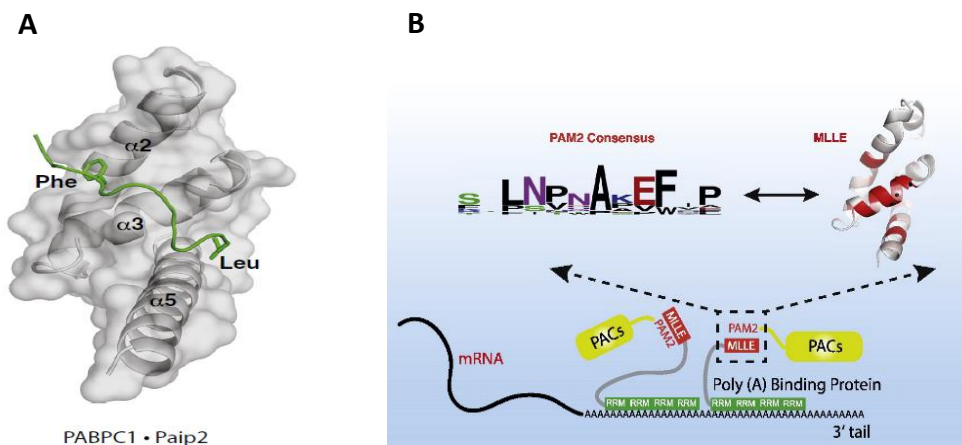


Figure 21 : l'interaction PAM2-PABP. (A) Le complexe MLLE du domaine C-terminal de PABP et le motif PAM2 de Paip2. Le peptide enveloppe l'hélice $\alpha 3$ grâce aux résidus Phe (F) et Leu (L) liés à des poches hydrophobes formés par les hélices $\alpha 2$ et $\alpha 5$. (B) Schéma récapitulant l'interaction entre le domaine MLLE de PABP porté par l'hélice $\alpha 3$ et le motif PAM2, les acides aminés conservés et les plus importants dans cette interaction en grande lettres.

I.2.2. La stœchiométrie de l'interaction PABP-eRF3

Il a été montré par des expériences de microcalorimétrie que la présence simultanée d'eRF3, eRF1 et PABP conduit le système à la formation du complexes eRF1-eRF3-PABP (Kononenko et al., 2010).

Afin de visualiser l'interaction eRF3-PABP, des expériences de cristallographie ont été réalisées sur des fragments peptidiques des motifs PAM2-N et PAM2-C d'eRF3 et un peptide du domaine MLLE. Ces expériences montrent, d'après la formation des deux complexes PAM2-N:MLLE et PAM2-C:MLLE que la stœchiométrie du complexe eRF3:PABP serait de 1:1 et que la phénylalanine 76 d'eRF3 est essentielle pour l'interaction de deux complexes (Figure 22). L'addition d'un site PAM2 chevauchant entraîne l'augmentation de l'affinité sans changer la stœchiométrie (Kozlov and Gehring, 2010).

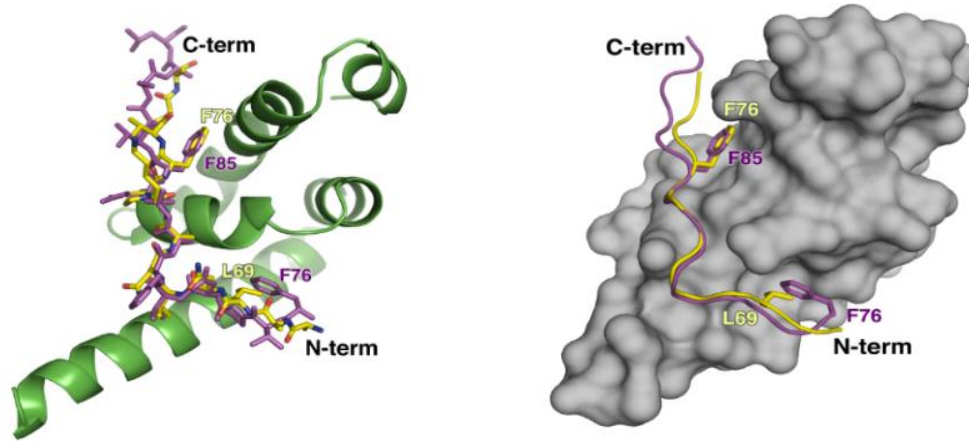


Figure 22 : Superposition des structures des complexes eRF3 PAM2-N (jaune) et PAM2-C (magenta) interagissant avec le domaine MLE (gris et vert en ruban) de PABP. La Phe76 dans eRF3 change de position et interagit soit avec les hélices $\alpha 2/\alpha 3$ dans le complexe PAM2-N-MLLE ou bien avec les hélices $\alpha 3/\alpha 5$ dans le complexe PAM2-C-MLLE, les résidus Leu69 (PAM2-N) ou Phe85 (PAM2-C) occupent les sites hydrophobes vacants (Kozlov and Gehring, 2010).

Une étude ultérieure a confirmé la valeur de cette stœchiométrie par des expériences de microcalorimétrie et en utilisant des fragments peptidiques d'eRF3 et de PABP. En plus, ces expériences montrent que la stœchiométrie devient 1:2 en présence d'un peptide contenant les 2 motifs PAM2 non chevauchant et séparées par quelques résidus. Ce qui signifie que les deux motifs n'interagissent pas simultanément avec PABP mais seulement grâce à leur chevauchement (Osawa et al., 2012). Dans cette même étude, les auteurs déduisent que la stœchiométrie de l'interaction eRF3-PABP ne change pas même quand les molécules de PABP sont multimérisés sur une queue Poly(A). Cependant la taille de la queue Poly(A) utilisée est de 1000 adénine (5 fois la taille de la queue Poly(A) dans la cellule) ce qui rend difficile la saturation et la multimérisation de PABP. Il faut aussi signaler que PABP n'est pas utilisée sous sa forme entière mais sous la forme de peptides interagissant avec PAM2.

II. Le motif PAM2 dans d'autres protéines

Depuis leurs identifications, les motifs PAM2 ont été retrouvés dans 20 protéines humaines. Une partie de ces protéines est rassemblée dans le **Tableau 2**. Beaucoup d'études ont montré l'implication de ces protéines dans différent processus impliquant les ARN messagers via leurs interactions avec PABP. Citons parmi ces protéines, PAN3 et TOB (décrites précédemment) qui

sont impliquées dans la désadénylation des ARNm (**Figure 23**). TOB possède deux motifs PAM2 séparés, un PAM2-N dans son domaine N-terminal et un deuxième PAM2-C dans son domaine C-terminal. Des analyses par microcalorimétrie montrent qu'avec un K_D de 20 μ M, le motif PAM2-N de TOB contribue majoritairement à l'interaction avec PABP alors que le motif PAM2-C a une affinité pour PABP 6 fois plus faible (Ruan et al., 2010).

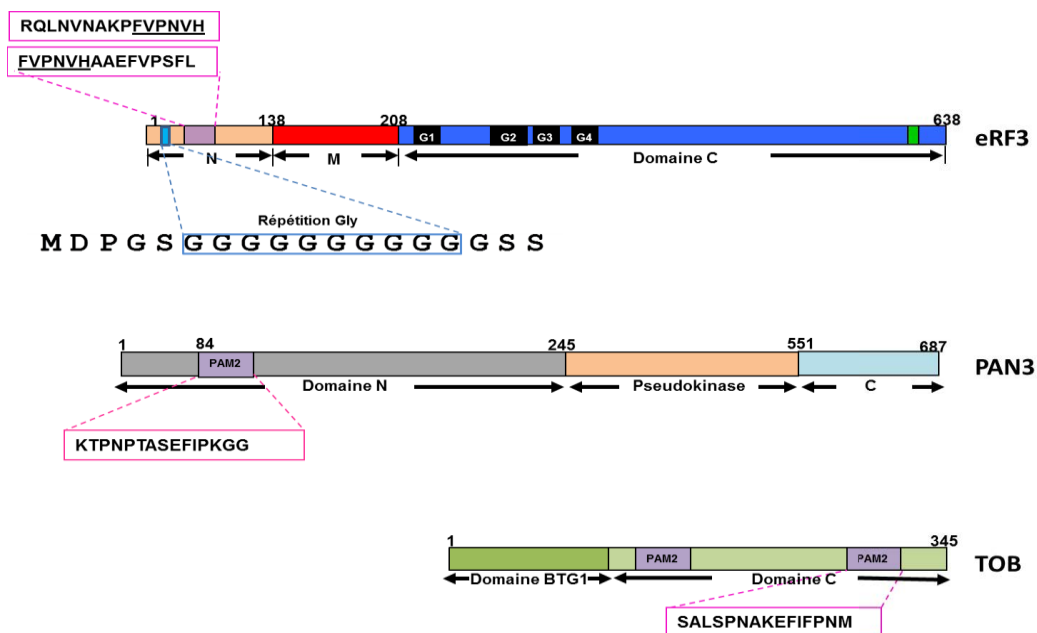


Figure 23 : Représentation schématique de la structure des protéines eRF3, PAN3 et TOB.

L'Ataxine-2 est devenue la protéine porteuse de site PAM2 la plus connue depuis la découverte de son implication dans le rythme circadien et dans l'ataxie spinocérébelleuse (ASC) de type 2, une maladie neurodégénérative génétique causée par une extension de résidus de glutamine dans la protéine Ataxine-2. Cette protéine a été identifiée comme un facteur génétique de risque de la maladie la sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Lee et al., 2011). Chez les patients atteints de SLA, des agrégats d'Ataxine-2 et de PABP ont été observés dans les neurones moteurs (Kim et al., 2014). De tels agrégats liés à la présence de granules de stress cytoplasmiques peuvent déclencher la dégénérescence des neurones (Ramaswami et al., 2013). Une étude récente a montré que PABP, à travers son interaction avec le site PAM2 de l'Ataxine-2 module la toxicité de la protéine TDP-43, une protéine associée à la SLA (Kim et al., 2014). Par ailleurs, plusieurs autres protéines à motif PAM2 ont été trouvées associées aux granules de stress et aussi à d'autres granules cytoplasmiques contenant des ARNm tels que les *P-bodies*.

Les protéines Paip1 et Paip2 possèdent deux effets opposés sur la traduction : Paip1 augmente la traduction (Roy et al., 2002) alors que Paip2 l'inhibe (Khaleghpour et al., 2001). Paip2 inhibe la traduction en empêchant PABP de s'associer à la queue Poly(A) de l'ARNm et déstabilise la circularisation de l'ARNm (Karim et al., 2006; Khaleghpour et al., 2001). D'autre part, Paip2 inhiberait aussi la traduction en entrant en compétition avec le facteur Paip1 (Khaleghpour et al., 2001). En revanche il n'est pas encore très claire comment les motifs PAM1 et PAM2 de Paip1 stimulent la traduction.

L'hydrolase Ubiquitine USP10 interagit avec la protéine de granule de stress G3BP (*Ras-GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein*) et régule la stabilité des ARNm (Kedersha et al., 2005). L'ubiquitine ligase E3 TTC3 impliquée dans le syndrome neurodégénératif de Down (Tsukahara et al., 1998) contient aussi un motif PAM2. En revanche l'implication de son interaction avec PABP et l'effet de cette interaction sur sa fonction reste toujours inconnue.

Dans mon projet de thèse, je me suis intéressée aux protéines PAN3, TOB et eRF3 qui contiennent toutes un motif PAM2.

Tableau 2 : Liste des protéines portant un motif PAM2

Protéines	Fonctions	Interaction à PABP	Références bibliographiques
Paip1	Augmentation de la traduction	PAM1/PAM2	(Roy et al., 2002)
Paip2	Inhibition de la traduction	PAM1/PAM2	(Khaleghpour et al., 2001)
Ataxin-2	Régulation du <i>gene silencing</i> par microARN	1 site PAM2	(Kim et al., 2014)
eRF3	Terminaison de la traduction et la déadénylation des ARNm	2 sites PAM2	Osawa et al., 2012 Kozlov et al., 2004
GW182	Déadénylation	1site PAM2	(MR et al., 2012 ; Nishihara et al., 2013)
TOB1/2	Déadénylation	2 sites PAM2	(Ezzedine et al., 2007)
PAN3	Déadénylation	1 site PAM2	(Yamashita et al., 2005).
LARP4	La stabilité des ARN m	1 site PAM2	(Yang et al., 2011)
USP10	La stabilité des ARN m	PAM2	(Kedersha et al., 2005)

III. L'interaction MLE de PABP et PAM2 d'eRF3 et la stabilité des ARN messagers

Du fait de son interaction, d'une part avec PABP à travers son motif PAM2, et d'autre part, avec le facteur de terminaison de la traduction eRF1, eRF3 est supposé être un intermédiaire entre la terminaison de la traduction et la désadénylation. PABP a été décrit comme régulateur de la désadénylation de l'ARNm en recrutant les complexes de désadénylation et permettant ainsi la désadénylation.

L'impact d'eRF3 dans la dégradation des ARNm par désadénylation n'est pas encore complètement élucidé. Il a été montré que l'association d'eRF3 à PABP diminuait la multimérisation de PABP sur la queue Poly(A) des ARNm, ce qui suggère qu'eRF3 faciliterait l'accès des désadénylases à la queue poly(A) et lierait la terminaison de la traduction à la dégradation des ARNm (Hoshino et al., 1999). Plus récemment, il a été suggéré que PAN3 ou TOB entrent en compétition avec eRF3 pour s'associer avec PABP. Après terminaison de la traduction, l'interaction eRF3-PABP serait remplacée par l'interaction PAN3-PABP qui initierait la première phase de désadénylation (Funakoshi et al., 2007). Ces résultats posent le problème du rôle de l'interaction d'eRF3-PABP : eRF3 joue-t-il un rôle protecteur de la queue poly(A) ou au contraire favorise-t-il l'action des désadénylases ? De plus, le rôle des 2 sites PAM2 d'eRF3a dans l'interaction avec PABP n'est pas clairement défini.

Comme nous venons de le voir, les 2 motifs PAM2 d'eRF3 interagissent avec PABP et présentent des conformations identiques. Une synergie est créée quand les deux motifs sont combinés (Kozlov and Gehring, 2010). Un premier modèle suppose que, lorsque la terminaison de la traduction est achevée, le complexe de terminaison de la traduction est libéré et un complexe de désadénylation prend sa place sur PABP (Funakoshi et al., 2007). Dans une autre étude réalisée avec des peptides portant les motifs PAM2, il a été montré que les motifs PAM2 d'eRF3 se lient à PABP avec une affinité 30 fois supérieure aux motifs PAM2 de PAN3 et TOB (Kozlov & Gehring, 2010). Le modèle proposé est que les complexes PAN2-PAN3 et CCR4-CAF1-NOT-TOB interagissent avec PABP de façon compétitive avec eRF3 (Kozlov and Gehring, 2010) (**Figure 24**).

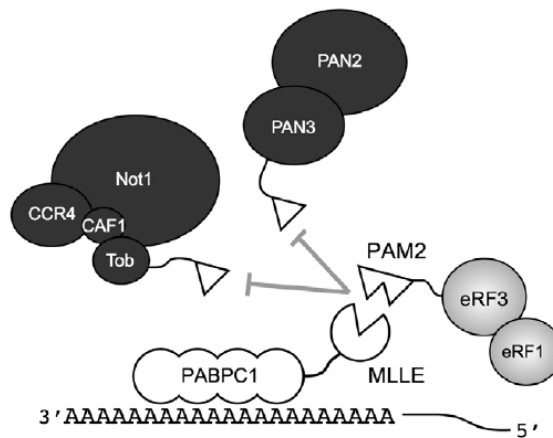


Figure 24 : Modèle montrant les interactions de PABP avec les protéines de la terminaison de la traduction et de la désadénylation. La poly(A) de l'ARNm fixe plusieurs molécules de PABP à travers les domaines RRM1-4 de PABPC1. Le domaine MLE interagit avec les protéines portant les motifs PAM2. L'affinité élevée entre PABPC1 et eRF3 empêche le recrutement des deux complexes de désadénylation, PAN2-PAN3 et TOB-CCR4-Caf1 (Figure issue de Kozlov and Gehring, 2010).

Des expériences utilisant la cycloheximide, inhibiteur de la traduction, montrent que l'inhibition de la traduction inhibe la fixation des désadénylases sur PABP. Ce qui suggère qu'à l'issue du relargage du complexe eRF1-eRF3 de PABP, pendant ou après la terminaison de la traduction, les complexes de désadénylation prennent sa place et interagissent avec PABP. Ils sont ainsi directement activés par PABP et conduisent donc au raccourcissement de la queue poly(A) (Funakoshi et al., 2007; Ruan et al., 2010).

IV. L'interaction eRF3-Pab1 chez la levure *S. cerevisiae*

L'association eRF3-Pab1 dans la levure semble différente de celle des métazoaires. Il n'existe pas de site PAM2 canonique dans la région N-terminale d'eRF3 de *S. cerevisiae* (Roque et al., 2015). D'autre part, l'association eRF3-Pab1 mettrait en jeu une plus grande région d'eRF3, c'est à dire les 250 premiers acides aminés de la protéines contenant les domaines N et M et non pas le domaine N seul comme chez les métazoaires (Cosson et al., 2002; Roque et al., 2015). De plus, chez *S. cerevisiae*, les domaines N et M d'eRF3 semblent avoir un effet sur l'efficacité de terminaison de la traduction qui n'a jamais été observé chez les métazoaires. En effet, il a été montré par plusieurs laboratoires travaillant avec différentes souches mutantes d'eRF3 que la délétion des domaines N et M a un effet anti-suppresseur correspondant à une augmentation de

l'efficacité de traduction (Roque et al., 2015; Volkov et al., 2007). Cet effet semble indépendant du phénotype [PSI+] qui dépend aussi du domaine N d'eRF3. De façon étonnante, il a aussi été observé que chez *S. cerevisiae*, la surexpression de Pab1 a un effet anti-suppresseur (Cosson et al., 2002). L'effet antisuppresseur de la délétion de la région N-terminale d'eRF3 et de la surexpression de Pab1 semble impliquer l'interaction eRF3-Pab1 dans le contrôle de l'efficacité de terminaison de la traduction (Cosson et al., 2002; Roque et al., 2015).

En ce qui concerne le rôle de l'interaction eRF3-Pab1 dans la stabilité des ARNm, des résultats contradictoires ont été obtenus. Certains suggèrent que l'interaction eRF3-Pab1 est impliquée dans la désadénylation des ARNm (Hosoda et al., 2003), d'autres montrent que l'interaction eRF3-Pab1 n'a pas d'influence sur la stabilité des ARNm, Pab1 régulant la dégradation des ARNm de manière indépendante d'eRF3 (Roque et al., 2015). Ces différences pourraient être expliquées par les différences entre les souches de levure et les méthodes utilisées.

V. Rôle des deux motifs PAM2 d'eRF3

Le facteur eRF3 est la seule protéine qui porte deux motifs PAM2 chevauchants. On peut se demander qu'elle est le rôle d'une telle conformation. Afin d'évaluer l'importance des résidus conservés des motifs PAM2, des mutants de ces motifs ont été étudiés. Les mutations au niveau du motif PAM2-N (mutations des résidus Leucine, Asparagine, Alanine et Phénylalanine) diminuent l'affinité pour PABP sans l'abolir totalement alors que des mutations au niveau du motif PAM2-C (mutations des résidus Histidine, Alanine et Phénylalanine) inhibent totalement l'interaction avec PABP. Ces résultats suggèrent que le motif PAM2-C est indispensable pour l'interaction d'eRF3 à PABP (Kononenko et al., 2010). Ces résultats ont été obtenus par microcalorimétrie en l'absence d'une queue Poly(A). Une deuxième étude sur le rôle des motifs PAM2 d'eRF3 propose des résultats différents. Ainsi, en 2012, Osawa et collaborateurs montrent que l'affinité de PAM2-N pour PABP est plus grande que celle de PAM2-C. Les études d'interaction en présence de la queue Poly(A) montrent que l'affinité d'eRF3 pour PABP est augmentée d'un facteur 100 quand plusieurs molécules de PABP sont associées à la queue poly(A), ce qui favoriserait la re-fixation d'eRF3 sur PABP. La plus faible augmentation (5 fois au lieu de 100) de cette affinité en présence d'un eRF3 muté dans son motif PAM2-C amène les

auteurs à suggérer que c'est le motif PAM2-C qui contribue à cette re-fixation. Ainsi, eRF3 pourrait se déplacer sur les PABP fixés sur la queue Poly(A) et les 2 motifs PAM2 chevauchant d'eRF3 permettent non seulement d'augmenter l'affinité d'eRF3 à PABP mais aussi de pouvoir déplacer eRF3 sur les complexes PABP-Poly(A). Les auteurs suggèrent un modèle décrivant un couplage entre la terminaison de la traduction et désadénylation (Osawa et al., 2012). Le déplacement d'eRF3 sur les molécules de PABP faciliterait l'accès des complexes de désadénylation à PABP au niveau d'un site MLE qui deviendrait disponible après la libération d'un complexe eRF3-eRF1. Une fois le complexe de désadénylation fixé à PABP, l'activité de désadénylation est déclenchée (**Figure 25**).

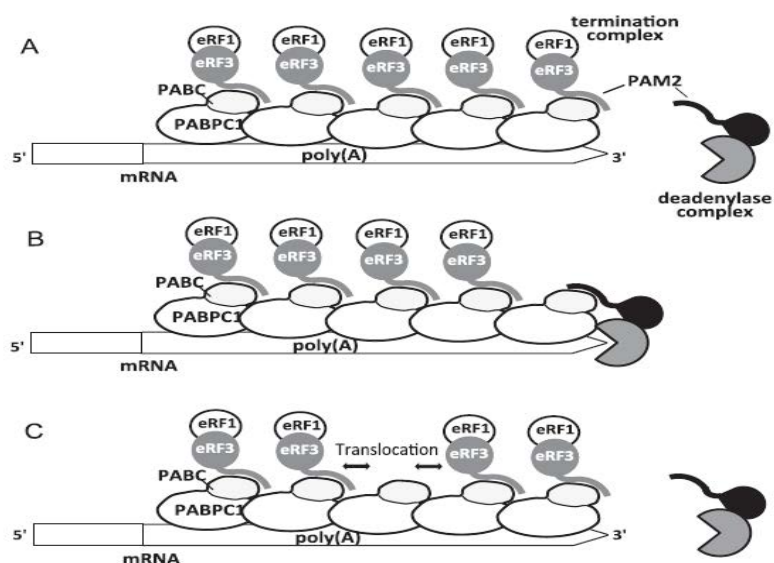


Figure 25 : Schématisation du couplage de la terminaison de la traduction et de la régulation des complexes de désadénylation par eRF3. (A) Suppression de l'activité des désadénylases quand eRF3 est associé à PABP (B) Départ du complexe de terminaison au moment de la terminaison de la traduction et activation des désadénylases portant le motif PAM2 suite à l'interaction avec PABP (C) Rôle des 2 motifs chevauchant d'eRF3 : suite au recrutement d'un complexe eRF1-eRF3 sur le ribosome, un autre complexe eRF1-eRF3 est délocalisé et se déplace sur les molécules de PABP associées au Poly(A). Ainsi PABP devient disponible pour une interaction avec les désadénylases (Figure issue d'Osawa et al., 2012).

Pour conclure, il faut remarquer que nombre de ces expériences ont été réalisées avec des peptides portant les motifs PAM2 d'eRF3 et non la protéine entière, et en absence de queue Poly(A), hormis l'expérience d'Osawa qui utilise un poly(A)₁₀₀₀. Ainsi, les résultats parfois divergents des publications décrites ci-dessus montrent que l'étude de l'interaction eRF3-PABP

n'est pas encore achevée et que le rôle d'eRF3 dans la désadénylation reste un mystère. Jusqu'à aujourd'hui, cette interaction n'a pas été étudiée en utilisant les protéines eRF3 et PABP sous leurs formes entières. De plus, le détail de cette interaction d'un point de vue cinétique n'a pas été examiné jusque-là.

Le projet de la thèse

Le projet de thèse que j'ai débuté à mon arrivée dans l'équipe porte sur l'étude de l'interaction eRF3-PABP et son influence sur la stabilité de l'ARNm chez les eucaryotes. Nous nous intéressons en particulier au processus de la désadénylation qui fait intervenir les complexes de désadénylation PAN2-PAN3 et CCR4-NOT-TOB mais aussi le complexe de terminaison de la traduction eRF1-eRF3. Le point en commun entre ces trois complexes est leurs capacités d'interagir avec la protéine PABP mais le rôle d'eRF3 n'est pas clairement établi. Notre objectif au début de ma thèse était d'améliorer notre compréhension du rôle d'eRF3 dans le processus de couplage terminaison de la traduction-désadénylation.

Plusieurs études ont été réalisées tant sur l'interaction de PABP avec la queue Poly(A) des ARNm que sur l'interaction d'eRF3 avec PABP. Chacune de ces études a été réalisée avec des molécules différentes (protéines PABP et eRF3 entières ou fragments de celles-ci, un Oligo (A) de taille courte (25 nt) ou au contraire de taille très longue (1000 nt) et par des méthodes aussi très variées (microcalorimétrie, résonance plasmonique de surface (SPR), retard sur gel, co-immunoprécipitation). Aucune des expériences réalisées jusqu'à présent n'a étudié les interactions entre les différents partenaires (eRF3, PABP, queue Poly(A) des ARNm et les facteurs de désadénylation) par la même technique. Mon travail était d'étudier les interactions entre eRF3 et les facteurs de désadénylation avec PABP en mettant en place un modèle plus proche de la réalité et en utilisant un OligoA qui mime la queue Poly(A) des ARNm et sur lequel plusieurs molécules de PABP peuvent se fixer.

Par ailleurs, une corrélation a été établie entre certains types de cancer et la présence de l'allèle 12-GGC d'eRF3 chez les malades. Afin de comprendre l'implication de la partie N-terminale d'eRF3a et en particulier de l'expansion glycine dans cette corrélation, nous avons utilisé notre modèle d'étude pour comprendre l'effet de cette expansion sur l'interaction eRF3-PABP. En

étudiant les formes alléliques d'eRF3, notre objectif était de savoir si la variation de la longueur de l'expansion de polyglycine avait un effet sur l'interaction d'eRF3 avec PABP.

L'ensemble de mes travaux nous permet de mieux comprendre le rôle moléculaire d'eRF3 dans la stabilité de l'ARNm et d'envisager le mécanisme par lequel il est impliqué dans le développement du cancer.

Résultats

Les travaux que j'ai menés au cours de ma thèse peuvent être divisés en deux parties. Mon premier projet concerne l'étude de l'effet de la partie N-terminale d'eRF3 sur l'interaction d'eRF3 avec PABP (qui a fait l'objet d'un article soumis). Le deuxième projet concerne l'étude de la compétition entre eRF3, PAN3 et TOB pour la fixation sur PABP. Je commencerai, dans ce chapitre, par décrire les techniques utilisées et les mises au point effectuées pour la réalisation de mon étude. Je présenterai par la suite les résultats des expériences du premier projet. Dans la dernière partie du chapitre, je présenterai les résultats qui n'ont pas été intégrés dans l'article.

I. Mise au point du système d'étude

Dans un premier temps, j'ai mis au point un système d'étude *in vitro* en utilisant la technique de SPR (Biacore) qui permet d'étudier en temps réel les interactions entre deux partenaires protéiques. La nouveauté de mon travail est que j'ai réalisé cette étude lorsqu'un des deux partenaires interagit en même temps avec l'ARN. Nous avons choisi pour cette étude la méthode de résonance plasmonique de surface (SPR) parce qu'elle permet de caractériser les interactions d'eRF3a avec PABP fixé ou non sur un modèle de queue poly(A) des ARNm. J'ai utilisé pour mes expériences un Oligo ARN biotinylé en 5' que j'ai allongé en 3' d'environ 120 adénosines grâce à la poly(A) polymérase d'*E. coli* (voir le manuscrit de l'article). Ainsi, contrairement aux études précédentes qui ne prenaient pas en compte la queue Poly(A) ni la multimérisation de PABP, notre modèle tient compte du fait que plusieurs PABP peuvent être liés à la queue poly(A), 5 à 7 PABP avec notre OligoA₁₂₀.

I.1. Surexpression des facteurs protéiques

Mon premier souci a été de mettre au point l'expression et la purification de protéines sous leurs formes entières. J'ai surexprimé les protéines recombinantes portant une étiquette 6His à l'extrémité N-terminale sous leur forme entière chez *E. coli*. Grâce à l'étiquette 6His, je les ai purifiées sur résine Ni-NTA. J'ai ainsi purifié, outre PABP et eRF3a (allèle 10-GGC), des formes mutées d'eRF3a au niveau de l'un ou de l'autre des 2 sites PAM2, les différentes formes alléliques 7-GGC, 11-GGC, 12-GGC d'eRF3a, l'isoforme eRF3b et un mutant de délétion d'eRF3b, Δ N-eRF3b, qui ne possède pas toute la partie N-terminale et donc les sites PAM2. Toutes les protéines utilisées sont présentées dans le **Tableau 3**.

Tableau 3: Les protéines recombinantes produites au cours de ma thèse.

Protéines	Structure	Taille (Da)
PABP		73978
eRF3a (10-GGC)		71939
eRF3a KAKA		
eRF3a AKA		
12GGC		72053
12GGC KAKA		
12GGC AKA		
eRF3b		71334
Δ N-eRF3b		58160
7-GGC	6-his eRF3a-7GGC	71768
11-GGC	6-his eRF3a-11GGC	71996

La concentration de chaque échantillon protéique a été déterminée par la méthode BCA et la pureté des échantillons protéiques a été analysée par la technique Experion (Bio-Rad) qui est un

système de micro-électrophorèse automatisée sur puces. Le pourcentage de pureté est pris en compte dans la concentration finale de chaque échantillon (**Figure 26**). La forme allélique 10-GGC d'eRF3a qui est la plus commune est notée eRF3a dans le texte.

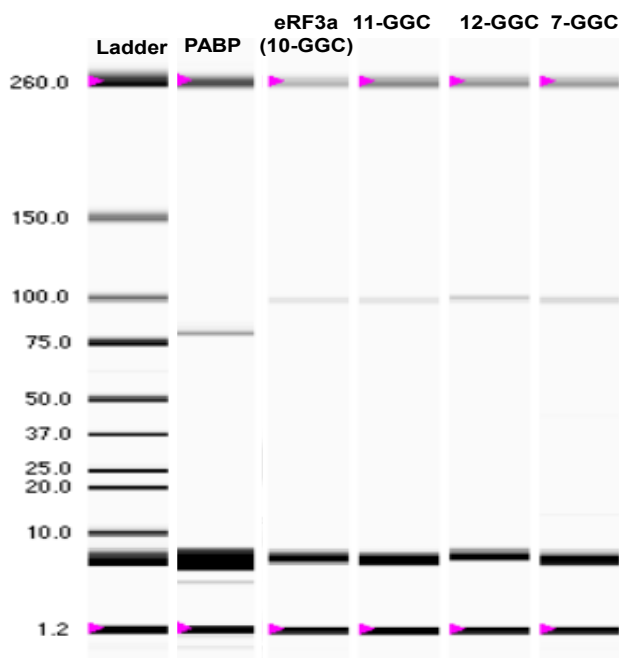


Figure 26 : Analyse de la pureté des protéines sur Experion Pro260 (Bio-Rad). La première voie correspond aux marqueurs de poids moléculaire (ladder, de 260 kDa à 1.2 kDa). Les puretés de PABP et des protéines eRF3a 10-GGC, 11-GGC, 12-GGC, 7-GGC sont respectivement de 90%, 68% ,62%, 50%.

I.2. Mise au point des expériences de résonance plasmonique de surface (SPR)

Les expériences de SPR ont été réalisées avec le Biacore 3000 de la plate-forme Interactions Moléculaires de l'IBPS à l'UPMC. En bref, la technologie 'Biacore' permet de visualiser en temps réel des interactions entre biomolécules non marquées dans un débit continu de tampon. Un des réactifs, le ligand, est retenu de manière spécifique sur une interface spécifique appelée biocapteur ou *Sensor Chip*. L'analyte dilué dans un tampon circule à flux constant à la surface du *Sensor Chip*. Les changements de masse induits par son association au ligand modifient l'indice de réfraction du milieu et décalent la position de l'angle de résonance, entraînant une modification du signal de résonance qui est exprimé en unités de résonance (RU).

L'enregistrement des modifications du signal de résonance ou sensorgramme permet l'analyse des cinétiques d'interaction entre molécules par la mesure des constantes d'association (k_a), de dissociation (k_d), de dissociation à l'équilibre (K_D).

Pour notre étude, nous avons mis au point deux modèles pour étudier les interactions des différentes formes alléliques d'eRF3a avec PABP. Un premier modèle en absence de la queue Poly(A) des ARNm et un deuxième en présence de la queue Poly(A) des ARNm. Ces deux modèles permettent non seulement de confirmer les résultats obtenus mais aussi d'évaluer l'influence, sur l'interaction eRF3-PABP, de la multimérisation de PABP sur la queue poly(A).

I.3. Choix du *Sensor Chip* pour la réalisation des cinétiques d'interaction

Dans le but de comparer les affinités des formes alléliques d'eRF3a avec PABP, nous avons voulu réaliser des cinétiques d'interaction de chacune de ces formes alléliques avec PABP. Nous avons utilisé, dans un premier temps, un modèle en absence de la queue Poly(A) et nous avons pour cela choisi d'utiliser PABP comme ligand. Ce dernier a été immobilisé sur la surface du *Sensor Chip* et eRF3 a été envoyé comme analyte. L'homogénéité de PABP est nécessaire. Donc il était important d'avoir une préparation de PABP qui soit pure et qui ne contienne pas d'autres formes protéiques. Une pureté de 80% est tolérable. Le *Sensor Chip* NTA était adéquat pour cette expérience car il permet l'immobilisation de PABP à travers son étiquette histidine et assure l'orientation des domaines C-terminale (MLLE) des molécules. Cependant ce type d'immobilisation a affecté l'intégrité de PABP ce qui nous a empêché d'observer une interaction avec eRF3. Donc, nous avons pris comme alternative un *Sensor Chip* CM5 pour immobiliser PABP. La surface de cette puce est composée de polymère de dextran carboxyméthylé permettant de fixer PABP de façon covalente via les groupements (-NH₂, -SH, -CHO, -OH, -COOH). Le groupement carboxyl de la surface de la puce est d'abord activé avec un mélange de 1-éthyl-3 (3 diméthyllaminopropyl) carbodiimide (EDC) à 0,2 M et N-hydroxysuccinimide (NHS) à 0,05 M pour donner un ester succinimide. Cette étape d'activation est suivie par l'injection de PABP dans un tampon d'immobilisation (10 mM acétate de potassium à pH 4,5). Une fois l'immobilisation terminée, une solution d'éthanolamine à 1 M est

injectée afin de désactiver les groupements qui sont restés actifs à la surface et permet d'éliminer les molécules de PABP qui ne se sont pas fixées covalamment. Cette méthode ne permet d'immobiliser PABP qu'avec une orientation aléatoire néanmoins cela nous a permis d'observer une interaction de PABP avec eRF3. Afin de vérifier la spécificité de cette interaction, j'ai injecté soit eRF3a soit une forme d'eRF3 dépourvue de son site d'interaction à PABP (Δ N-eRF3b). Comme attendu, Δ N-eRF3b ne montre pas d'interaction avec PABP et confirme la nécessité de la présence de l'extrémité N-terminale d'eRF3 portant les sites PAM2 (Figure 27).

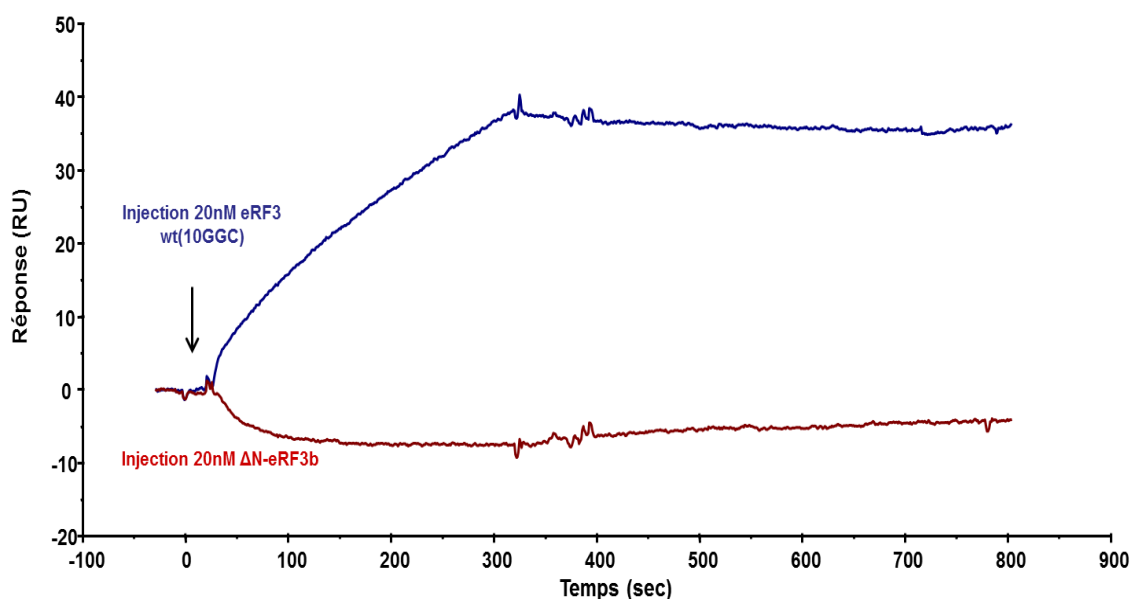


Figure 27: Contrôle de la spécificité de l'interaction eRF3-PABP sur Sensor Chip CM5. La forme Δ N-eRF3b (en rouge) est injectée à 20 nM sur une surface de 2500 RU de PABP et la forme eRF3a wt (10-GGC) (en bleu) est injectée à 20 nM.

I.4. Choix de la densité et du flux d'injection de l'analyte eRF3

Généralement, afin d'éviter le transfert de masse qui peut survenir en particulier au cours de l'étape de dissociation par recapture par le ligand des molécules dissociées, il est recommandé d'immobiliser une densité faible de ligand sur la surface de la puce ou bien de travailler avec un flux élevé de 40 μ l/min (un flux élevé nécessite une quantité élevée d'analyte injecté). Donc, pour nos expériences, nous avons choisi d'immobiliser entre 1000 et 2500 RU de PABP sur la

surface CM5 et j'ai utilisé un flux de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. J'ai cependant contrôlé l'absence de limitation par transfert de masse. Pour cela, j'ai injecté une même concentration de l'analyte eRF3 à trois flux différents (5 $\mu\text{l}/\text{min}$, 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ ou 50 $\mu\text{l}/\text{min}$). Les résultats montrent que les niveaux d'interactions dans les trois cas sont rapprochés et que l'allure de l'association et de la dissociation sont fortement similaires. Ce qui prouve qu'il n'y a pas de limitation de l'interaction par transfert de masse. Donc l'utilisation d'un flux d'injection de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ sur une surface jusqu'à 2500 RU sont des conditions adéquates pour étudier l'interaction de PABP avec eRF3 sur CM5.

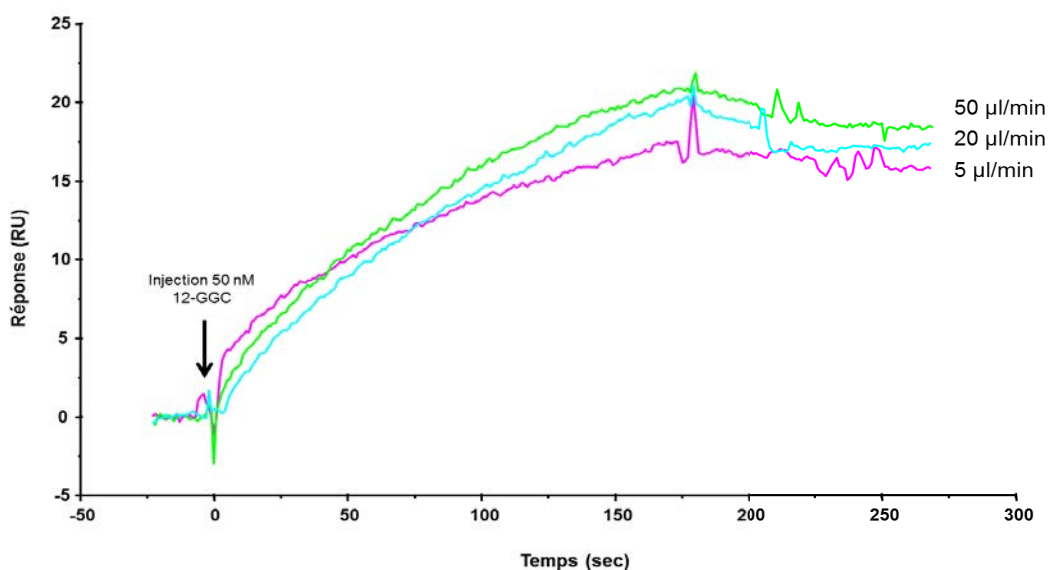


Figure 28 : Contrôle du transfert de masse sur la surface de PABP immobilisé à 2500 RU sur un Sensor Chip CM5.

II. Mesure des paramètres cinétiques de l'interaction eRF3-PABP sur *Sensor Chip* CM5

II.1. L'affinité de la forme 12-GGC d'eRF3a pour PABP est la plus faible par rapport aux autres formes alléliques d'eRF3

Une fois ces conditions établies, j'ai réalisé les cinétiques d'interaction d'eRF3-PABP grâce au suivi des différentes concentrations d'eRF3 injectées sur la surface immobilisée de PABP. Pour

qu'une cinétique soit exploitable, il faut au moins cinq points et la gamme d'injection allant de 0 nM jusqu'à, idéalement, une concentration saturante. Le 0 nM ou le 'blanc' correspond à l'injection du tampon de course. Le choix de la gamme est important dans le sens où les points ne doivent être ni trop rapprochés ni trop écartés. Dans nos expériences, la gamme de concentration eRF3a (10-GGC) est de 0 à 50 nM (de même pour les 7-GGC et 11-GGC) et pour le 12-GGC est de 0 à 100 nM étant donné que les réponses d'interaction du 12-GGC sont inférieures à celles d'eRF3a (10-GGC). Ces séries ont été envoyées à un flux de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ avec un temps d'association de 5 min et un temps de dissociation de 8 min pour chaque concentration. Le tampon NaCl 1M, NaOH 30 mM a été utilisé pour la régénération entre les différentes injections.

Les sensorgrammes obtenus sont intégrés grâce au modèle mathématique Langmuir 1:1 (*global fitting*) ce qui permet de décrire l'interaction et de déterminer les paramètres cinétiques de l'interaction. La phase d'association, qui correspond à l'injection de l'analyte, contient des informations sur l'association et sur le complexe d'interaction formé. La constante d'association k_a décrit le taux de complexes PABP-eRF3 formés par seconde et par mole de PABP et d'eRF3. L'unité du k_a est en $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$. Une fois l'injection arrêtée, les complexes formés se dissocient. Cette dissociation est décrite par la constante k_d qui décrit la stabilité des complexes c'est-à-dire la dissociation du complexe par seconde. L'unité du k_d est en s^{-1} . En ce qui concerne la constante de dissociation à l'équilibre K_D , elle correspond au rapport de k_d / k_a et elle est exprimée en M. Plus la valeur de cette constante est grande, plus l'affinité du complexe est faible.

Chacune des cinétiques d'interaction a été au moins tripliquée. L'analyse des cinétiques se fait via le logiciel BiaEval. Les cinétiques sont par la suite sélectionnées selon leur niveau d'ajustement et donc selon leur fiabilité. L'ajustement des points des cinétiques expérimentales a été fait suivant le modèle Langmuir 1:1 et les constantes cinétiques ont été déterminées dans ce contexte. Généralement, pour évaluer la signification des constantes rapportées, il faut évaluer le rapprochement de l'ajustement entre les courbes théoriques et les courbes expérimentales (ou les '*Residuals*'). L'inspection visuelle de la superposition des courbes ajustées et des courbes expérimentales donne une information sur le niveau de l'ajustement. Idéalement la dispersion des '*Residuals*' est autour de zéro et sur une plage de point allant de -2

à +2 RU. De plus la valeur du Chi2 ‘*Chi square*’ est une mesure quantitative de l’ajustement. Une valeur de Chi2 inférieur à 10 signifie que l’ajustement est fiable. Les paramètres cinétiques retenus pour les interactions d’eRF3a (10-GGC), 12-GGC, 7-GGC, 11-GGC et eRF3b avec PABP sont rassemblés dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des valeurs moyennes de K_D et de k_a des cinétiques d’interactions de chacune des formes alléliques d’eRF3a (10-GGC/12-GGC/11-GGC/7-GGC) et de l’isoforme eRF3b avec PABP sur *Sensor Chip* CM5.

Paramètres	eRF3a (10-GGC) (Réf)	12-GGC	7-GGC	11-GGC	eRF3b
K_D (nM)	1,45±0,15	11,96±3,26	4,19±0,63	2,93±0,39	0,54±0,08
k_a ($\times 10^5$) ($M^{-1} s^{-1}$)	1,61±0,38	0,34±0,11	1,02±0,22	1,26±0,16	9,66±0,44

L’analyse statistique globale des valeurs de K_D obtenues montre que les différences observées entre les cinq formes alléliques d’eRF3a sont significativement différentes (P-value = 0.0017). Nous avons choisi l’allèle eRF3a (10-GGC), la forme la plus fréquente chez l’homme, comme référence pour la comparaison des résultats des cinétiques. La valeur du K_D de l’interaction eRF3a-PABP est de 1,45 nM ce qui montre la forte affinité du complexe. Les valeurs des K_D mesurés avec les formes 11-GGC et 7-GGC se rapprochent de celle d’eRF3a (2,93 et 4,19 nM, respectivement). Cependant la valeur de K_D de l’interaction PABP avec l’allèle 12-GGC d’eRF3a est de l’ordre de 12 nM (P = 0,001). Autrement dit, l’affinité de la forme 12-GGC pour PABP est significativement plus faible (environ 9 fois) comparée à celle d’eRF3a. En revanche, l’affinité pour PABP de l’isoforme eRF3b (qui ne possède pas d’expansion glycine) est environ 3 fois plus élevée que celle d’eRF3a ($K_D = 0,54$ nM).

II.2. La faible affinité de l’allèle eRF3a 12-GGC avec PABP est due essentiellement à la faible association du complexe

Les résultats des cinétiques montrent que les valeurs des constantes de dissociation k_d sont identiques pour les cinq formes d’eRF3a (de l’ordre de $2 \times 10^{-4} s^{-1}$). La dissociation semble se dérouler de la même manière durant toutes les cinétiques. En ce qui concerne les valeurs de la

constante d'association, nous trouvons que notre référence eRF3a a une forte association avec PABP ($1,61 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). L'isoforme eRF3b présente une valeur de $k_a \sim 6$ fois plus élevée que eRF3a ($9,66 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Les constantes d'association des formes 7-GGC et 11-GGC se rapprochent de celle d'eRF3a. En revanche, la valeur du k_a de la forme allélique 12-GGC avec PABP est significativement ~ 5 fois plus faible que celle d'eRF3a ($0,34 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Ces résultats montrent que les différences d'affinité sont essentiellement dues aux variations des constantes d'association k_a . (**Figure 29**). Nous montrons, ainsi, que les variations de l'expansion glycine dans la région N-terminale d'eRF3a (codé par la répétition de GGC dans l'exon 1 du gène) auraient une influence sur l'affinité d'eRF3a avec PABP et en particulier celle de la forme 12-GGC dans laquelle la présence d'une glycine supplémentaire (par rapport à la forme 11-GGC) jouerait un rôle important dans l'association avec PABP.

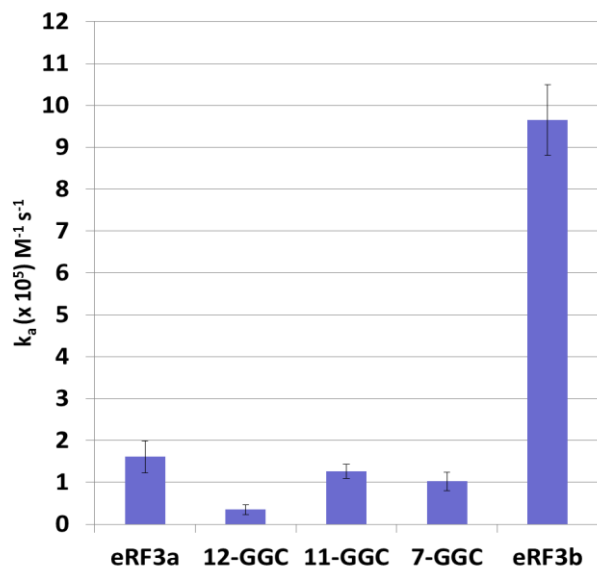


Figure 29 : Comparaison des valeurs des constantes d'association des formes alléliques d'eRF3a et de l'isoforme eRF3b avec PABP sur *Sensor Chip* CM5.

III. Etude des interactions des formes alléliques d'eRF3a sur le complexe PABP-Poly(A) – *Sensor Chip* SA

Notre deuxième modèle nous permet d'étudier les interactions d'eRF3 avec PABP en présence d'un OligoA₁₂₀ mimant la queue Poly(A) des ARNm. Pour ce faire, j'ai utilisé un *Sensor Chip*

SA dont la surface est composée de polymère de dextran carboxyméthylé et sur laquelle est pré-immobilisée de la streptavidine. Cette puce a servi pour l'immobilisation de l'oligoA₁₂₀ grâce à son extrémité 5' biotinylée. L'interaction streptavidine-biotine est la plus forte des interactions biologiques non-covalentes que l'on connaisse ($K_D \sim 10^{-14}$ M).

Dans un premier temps, le canal du *Sensor Chip* a été préparé pour l'immobilisation par l'injection d'une solution NaCl 1 M, NaOH 50 mM (trois fois). Une fois l'OligoA₁₂₀ immobilisé, une solution de NaCl 1 M, NaOH 50 mM est envoyée afin d'éliminer ce qui n'a pas été lié à la streptavidine. Avant d'entamer la réalisation de nos cinétiques et pour vérifier la spécificité de notre modèle, j'ai injecté PABP simultanément sur un premier canal sur lequel a été immobilisé l'OligoA₁₂₀ à 72 RU et sur un deuxième canal sur lequel a été immobilisé l'Oligo18 mer-biotinylé (n'ayant pas l'extension OligoA) à 68 RU. Les signaux enregistrés sont présentés dans la **Figure 30** où on voit bien que l'interaction se produit seulement au niveau du canal contenant l'OligoA₁₂₀. D'où la spécificité de l'interaction Poly(A)-PABP dans notre système.

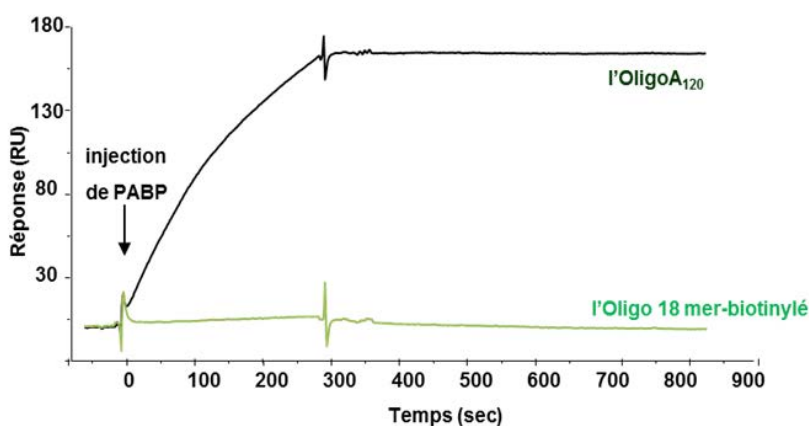


Figure 30 : Contrôle de spécificité de l'interaction de PABP avec l'OligoA120 sur Sensor Chip SA. PABP a été injecté soit sur un canal d'Oligo 18 mer immobilisé soit sur un canal d'OligoA120.

III.1. Etude de l'interaction PABP-Poly(A)

Nous avons voulu déterminer la valence de l'interaction PABP-OligoA₁₂₀. Pour ce faire, nous avons procédé à des expériences de saturation. Sur une surface d'OligoA₁₂₀, j'ai injecté des concentrations croissantes en PABP jusqu'à l'atteinte d'une réponse maximale (un plateau). La

valeur de RU maximale est appelé R_{max} . Il est ainsi possible de déterminer le nombre de molécules de PABP fixées sur l'OligoA₁₂₀. Nous trouvons une valeur de valence de 5 à 7 PABP fixés par OligoA₁₂₀. Cette valeur est proche de la valence théorique (si on prend en compte qu'un PABP interagit avec 20 à 25 adénosines). De plus, l'étude des paramètres cinétiques de l'interaction PABP-OligoA₁₂₀ (voir le manuscrit de l'article) montre une association relativement rapide, de l'ordre de $1,15 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ et dissociation très lente ($k_d = 1,75 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$). Il en résulte une constante de dissociation K_D de 1,5 nM. Nos résultats valident le modèle mis au point pour étudier les interactions d'eRF3 avec PABP en présence la queue Poly(A) des ARNm.

III.2. La forme 12-GGC d'eRF3a semble interagir plus faiblement avec le complexe PABP-Poly(A)

Afin de comparer les niveaux d'interaction de chacune des formes alléliques d'eRF3a, une injection manuelle de PABP sur l'OligoA₁₂₀ immobilisé jusqu'à 300RU (soit 5 à 6 PABP par OligoA₁₂₀) a été réalisée suivie d'une injection manuelle d'eRF3a ou des formes alléliques 11-GGC, 7-GGC, 12-GGC à 10 ou 20 nM. Les sensorgrammes obtenus montrent que les formes alléliques sont différentes au niveau de l'association et se ressemblent au niveau de la phase de dissociation. Le 12-GGC présente le niveau d'association le plus faible et nous retrouvons comme pour les expériences avec le *sensor ship* CM5 que les réponses du 11-GGC et du 7-GGC se rapprochent de celle du eRF3a. Ce résultat nous a amenés à étudier les cinétiques d'interaction d'eRF3a et d'eRF3a 12-GGC sur le complexe PABP-OligoA₁₂₀.

IV. Mesure des paramètres cinétiques par la stratégie 'multiple cycles'

La méthode 'multiple cycles' consiste en plusieurs cycles d'injection manuelle. Chaque cycle consiste à injecter d'abord PABP à une concentration saturante (flux de 5 $\mu\text{l}/\text{min}$) suivi rapidement d'une injection d'eRF3 à 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ pendant 5 min. A la fin de l'injection, on laisse 8 min de dissociation et puis une régénération avec une solution de SDS 0.1% qui permet

d'éliminer les complexes PABP-eRF3 sans affecter l'OligoA₁₂₀. Les cycles suivants sont identiques mais avec des concentrations croissantes en eRF3. Des concentrations d'eRF3a et de l'allèle 12-GGC allant, respectivement, de 0 à 10 nM et de 0 à 30 nM ont été injectées. Cette méthode permet d'étudier la dynamique du système et de déterminer les paramètres cinétiques d'interaction k_a et k_d pendant l'association et la dissociation du complexe eRF3-PABP quand PABP est multimérisé sur l'OligoA₁₂₀. Il est, par ailleurs, possible de déterminer les valeurs des K_D quand le système est à l'équilibre.

Les cinétiques sont par la suite traitées via le logiciel BiaEval et en intégrant les sensorgrammes expérimentaux obtenus au modèle mathématiques *Langmuir 1:1*. Comme pour les résultats obtenus sur le *Sensor Chip* CM5, nous retrouvons une grande affinité de eRF3a pour PABP (1,3 nM) et une constante d'association k_a élevée ($1,64 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Nous retrouvons de plus que l'association de la forme 12-GGC est ~20 fois plus faible avec une valeur de K_D de l'ordre de 56 nM. Ces résultats confirment la diminution de l'affinité avec la forme 12-GGC. Nous remarquons aussi que les valeurs des constantes de dissociation k_d pour les deux formes eRF3a et 12-GGC sont similaires ($2,37$ et $2,31 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) ce qui correspond à une dissociation ~10 fois plus élevée par rapport au complexe PABP-Poly(A). Ce qui suggère que la dissociation de PABP de l'OligoA₁₂₀ n'affecte que légèrement la dissociation du complexe eRF3-PABP.

**Studies on human eRF3-PABP interaction reveals
the influence of eRF3a N-terminal glycine repeat
on eRF3-PABP binding affinity
and the lower affinity of eRF3a 12-GGC allele
involved in cancer susceptibility**

Soumaya Jerbi¹, Béatrice Jolles¹, Tahar Bouceba²,
and Olivier Jean-Jean^{1*}

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), CNRS-UMR8256, 7 quai Saint Bernard, 75005 Paris, France

²Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), CNRS-FR3631, 7 quai Saint Bernard, 75005 Paris, France

*Corresponding author: olivier.jean-jean@upmc.fr

Studies on human eRF3-PABP interaction reveals the influence of eRF3a N-terminal glycine repeat on eRF3-PABP binding affinity and the lower affinity of eRF3a 12-GGC allele involved in cancer susceptibility

Soumaya Jerbi¹, Béatrice Jolles¹, Tahar Bouceba², and Olivier Jean-Jean^{1*}

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), CNRS-UMR8256, 7 quai Saint Bernard, 75005 Paris, France

²Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), CNRS-FR3631, 7 quai Saint Bernard, 75005 Paris, France

*Corresponding author: olivier.jean-jean@upmc.fr

Abstract

The eukaryotic release factor 3 (eRF3) has been involved in the control of mRNA degradation through its association with the cytoplasmic Poly(A) Binding Protein, PABP. eRF3 N-terminal domain contains two overlapping PAM2 motifs that specifically recognizes the MLLE domain of PABP. The N-terminus of human eRF3a also contains a repeat of Glycine residues encoded by a GGC codon repeat in the first exon of eRF3a/GSPT1 gene. There are five known eRF3a GGC alleles, encoding 7, 9, 10, 11 and 12 glycines, in human population and several studies have reported that the presence of the 12-GGC allele is correlated with an increase risk of cancer development. We have studied the interaction of the various allelic forms of eRF3a with PABP using surface plasmon resonance (SPR). Using either PABP alone or poly(A)-bound PABP as a ligand, our comparative analysis on eRF3a alleles reveals that the Glycine repeat at the N-terminal end of eRF3a influences the interaction of eRF3 with PABP. The measures of kinetic parameters show a ten fold loss of eRF3a 12-GGC allele binding affinity for PABP. These results indicate a role for the glycine repeat and suggest that the presence of eRF3a 12-GGC allele could modify cellular mRNA degradation process.

INTRODUCTION

The eukaryotic release factor 3 (eRF3) is a small GTPase which associates with eukaryotic release factor 1 (eRF1) to terminate translation when a stop codon enters the A site of the ribosome. In addition to its role in translation termination, eRF3 has been involved in the control of mRNA degradation through its association with the cytoplasmic poly (A) binding protein, PABP, also termed PABPC1 (Cosson et al., 2002; Hoshino et al., 1999). The C-terminal domain of eRF3 which carries the translation termination activity, is well-conserved in species ranging from yeast to mammals and contains the four canonical GTP binding motifs responsible for eRF3 GTPase activity and, at its extreme C-terminal end, the eRF1 binding site. In contrast, the unstructured eRF3 N-terminal domain is poorly conserved among eukaryotic species. It contains a PAM2 (for PABP-interacting motif 2) motif that specifically recognizes the MLL domain of PABP (Hoshino, 2012).

In a given cellular state, either proliferating or differentiated, the cytoplasmic degradation of mRNAs allows to maintain a constant level of mRNAs available for translation and thus plays a key role in the regulation of gene expression. The poly(A) tail of mRNAs is essential for maintaining their stability and the shortening of the poly(A) tail, referred to as deadenylation, is the first and rate-limiting step of the mRNAs degradation process (Burgess and Gray, 2010). Several molecules of PABP cover the length of the mRNA poly(A) tail (one PABP molecule interacts with ~20 adenosine residues) and have a protective effect against mRNA degradation (Bernstein et al., 1989). Furthermore, PABP binding to the eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) promotes the closed-loop mRNA structure and mediates the stimulatory effect of the poly(A) tail on translation initiation (Kahvejian et al., 2001). However, PABP also recruits the deadenylation complexes through its association with the PAM2 motif carrying proteins PAN3 and TOB (Ezzeddine et al., 2007; Siddiqui et al., 2007), that are partners of the PAN2-PAN3 and TOB-CAF1-CCR4 deadenylation complexes, respectively. In mammals, the mRNA poly(A) tail is of ~250 adenosine residues (Burgess and Gray, 2010). It has been proposed that deadenylation proceeds in two steps: the PAN2-PAN3 complex first degrades the 3' end of the poly(A) tail leaving ~100 adenosine residues that are then degraded by the TOB-CAF1-CCR4 complex (Yamashita et al., 2005).

Recent studies showed that both PAN3 and TOB compete with eRF3 for their interaction with PABP. From these observations, it was proposed that upon translation termination, the PABP-poly(A)-bound termination complex, eRF1-eRF3, is recruited to the ribosome and is replaced on

PABP by either PAN2-PAN3 or TOB-CAF1-CCR4 deadenylation complexes (Funakoshi et al., 2007; Osawa et al., 2012). Peptide binding studies showed that the eRF3 PAM2 motifs (there are two overlapping PAM2 motifs in eRF3 N-terminal domain) bind PABP MLLE domain with higher affinity than PAN3 and TOB PAM2 motifs (Kozlov and Gehring, 2010). It has also been shown that (i) PABP-eRF3 interaction does not require GTP (ii) PABP associates equally with either free eRF3-GDP form or eRF1-eRF3-GTP complex and (iii) PABP-eRF3 interaction does not modify eRF3 binding to GTP (Kononenko et al., 2010). Whereas kinetic studies show that eRF3-PABP interaction poorly influence the termination process, the competitive binding of eRF3 and deadenylation complexes suggests that eRF3 has a protective effect against deadenylation. However, the precise function of this competition in mRNA stability remains to be elucidated. Furthermore, it is not clearly understood whether deadenylation is coupled to translation and requires translation termination to proceed (Brook and Gray, 2012).

In mammals, two distinct genes, named eRF3a/GSPT1 and eRF3b/GSPT2, encode two proteins with translation termination activity, eRF3a and eRF3b, respectively (Hoshino et al., 1998; Jakobsen et al., 2001). eRF3a which is the major form of eRF3 in mammals, plays a key role in translation termination and its abundance regulates the formation of translation termination complex (Chauvin and Jean-Jean, 2008; Chauvin et al., 2005). eRF3b, which can complement eRF3a for its role in translation termination, is very poorly expressed in most tissues and likely does not play a major role in termination (Chauvin et al., 2005). eRF3a and eRF3b proteins differ only in their N-terminal domain. In particular, in eRF3a/GSPT1 gene, the sequence encoding the N-terminus of human eRF3a contains a repeat of GGC glycine codons (Jean-Jean et al., 1996), which is not present in eRF3b/GSPT2. Recently, the analysis of eRF3a/GSPT1 first exon encoding the glycine repeat at the extreme N-terminal end of eRF3a reveals that there are five known GGC alleles, encoding 7, 9, 10, 11 and 12 glycines, in human population (Brito et al., 2005). The most common allele is the 10-GGC allele. Intriguingly, in the Portugese population, the 12-GGC allele was detected exclusively in cancer patients. Regardless of the genotype, Portugese patients with the 12-GGC allele had a ~20-fold increased risk for gastric cancer (Brito et al., 2005) and a 13-fold increase risk for breast cancer (Malta-Vacas et al., 2009). Consolidating these observations, a recent study on eRF3a GGC repeat polymorphism in Iranian women with breast cancer showed that the presence of the 12-GGC allele is correlated with a 3 fold increase risk of cancer development (Miri et al., 2012). Complementation experiments in eRF3a-depleted cells were unable to detect differences in translation termination activity of eRF3a alleles including the 12-GGC allele (Malta-Vacas et al., 2009). Todate, the link between eRF3a 12-GGC allele and tumorigenesis remains unknown. Because the glycine repeat

is close to the binding site for PABP, one possibility is that the presence of the glycine stretch in eRF3a N-terminus influences eRF3a-PABP interaction and interferes with mRNA degradation.

Here we study the interaction of the various allelic forms of eRF3a with PABP using a surface plasmon resonance (SPR)-based biosensor (Biacore). This is a powerful approach that provides high-quality data describing the kinetics of protein-protein interactions as shown for Paip1 and Paip2 interacting with PABP (Khaleghpour et al., 2001; Roy et al., 2002). Whereas SPR was also used to measure the kinetics of RNA-protein interactions (Chaloin et al., 2005; Law et al., 2005; Park et al., 2000), it has never been applied to the study of protein complexes in which one of the partner is bound to RNA. In this report, we present a kinetic analysis of eRF3-PABP interaction when PABP is bound to a synthetic poly(A) oligoribonucleotide containing ~120 adenosine residues and hence can carry several PABP molecules therefore mimicking the mRNA poly(A) tail. Our comparative analysis on eRF3a alleles, eRFa 7-GGC, 10-GGC, 11-GGC, 12-GGC and eRF3b binding to PABP reveals that the glycine repeat at the N-terminal end of mammalian eRF3 influences the interaction of eRF3 with PABP. Whatever the model used as a ligand, PABP alone or poly(A)-bound PABP, the measures of kinetic parameters show a ten fold loss of eRF3a 12-GGC allele binding affinity for PABP. These results indicate a role for the Glycine repeat, which is conserved in mammalian eRF3a/GSPT1 genes, and suggest that the presence of the 12-GGC allele could modify the mRNA degradation process at least for some particular mRNAs and could therefore be involved in the promotion of carcinogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid constructions

Plasmids pCMV-eRF3a (Le Goff et al., 1997), pMCV-3a-7GGC, 3a-11GGC and 3a-12GGC (Malta-Vacas et al., 2009) contain the entire coding sequence of the human GSPT1 gene encoding eRF3a (10-GGC allele) and the other allelic forms of eRF3a containing GGC 7 GGC, 11 GGC and 12 GGC repeats, respectively. These plasmids were BamHI-SalI doubly digested and cloned into the similarly digested pET28b plasmid (Invitrogen). In the resulting plasmids, a 6His tag is preceding the eRF3a coding sequence and was used for affinity purification. Plasmid pET28-His-eRF3b expressing the entire human isoform eRF3b was constructed using the pBK-heRFb plasmid (Chauvin et al., 2005) as a template for PCR amplification with the oligonucleotides (eRF3b Fwd: GGACGCTAGCATGGATTCGGGCAGCAGCAGCA, and eRF3b Rev: TAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGG) containing *NheI* and *NotI* restriction sites for cloning within the *NheI* and *NotI* sites of pET28b. The plasmid pET-His-

eRFb Δ N in which the first 129 codons of eRF3b were deleted was obtained by ligating *Nco*I-klenow-filled-*Not*I fragment of pBK-heRF3b in *Nhe*I-klenow-filled-*Not*I fragment of pET28b-His-eRF3a vector. The plasmid pTrcHisBPABP (Sagliocco et al., 2006) encoding for the human full-length His-tagged PABP protein, was generously donated by Bertrand Cosson.

Poly (A) tail synthesis

A synthetic Poly(A) tail was synthesized by selectively adding adenosine residues to the 3' end of a chemically synthesized 18-mer oligoribonucleotide 5'-CUCUAUGUUACCUACCAUA-3' carrying a 5'-biotin tag (Cogenics). The 5' biotinylation allows immobilization of the RNA oligo onto streptavidin-coated SA sensor chips in SPR experiments (see below). In a typical 20 μ L reaction, 5 units of *Escherichia coli* poly(A) polymerase (Biolabs) were incubated with 200 pmoles of the 18-mer oligoribonucleotide and 1 mM ATP in the reaction buffer (1X) supplied by the manufacturer at 37°C for 30 minutes. The reaction was stopped by ethanol precipitation in the presence of 0.3 M sodium acetate. The RNA precipitate was recovered by centrifugation and resuspended in 20 μ L of water. The resulting poly(A)-elongated oligoribonucleotide (hereafter named OligoA₁₂₀) was analysed by electrophoresis onto a 10% polyacrylamide gel containing 7 M urea followed by Northern blotting onto a Hybond-N membrane (GE Healthcare). The membrane was then U.V. cross-linked and blocked for 1 h in Tris-buffered saline (TBS)-Tween solution (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 140 mM NaCl, 0.2% Tween 20) containing 3% bovine serum albumine. The membrane was then incubated for 1 h with HRP-conjugated streptavidin reagent (GE Healthcare) in TBS-Tween, washed five times for 10 min in TBS-Tween, and the biotinylated oligoribonucleotides were visualized by chemiluminescence and exposure to X-ray film (supp. Fig. S1). The size of the elongated oligoribonucleotide was estimated by ethidium bromide staining and U. V. exposure of oligonucleotides of known size loaded onto the same gel.

Protein expression and purification

For expression and purification of PABP and the different forms of mammalian eRF3, *Escherichia coli* BL21(λ DE3) cells were transformed with the bacterial expression vectors described above. After induction with 1 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) and incubation either at 37°C for 4 h (PABP) or 22 h at 25°C (eRF3), bacteria were harvested by centrifugation. The bacterial pellets were resuspended in lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.8, 10% Glycerol, 500 mM NaCl, 1 mg/ml lysozyme and 10 mM imidazole) and cells were lysed by sonication. The lysate was clarified by centrifugation at 13,000 x g for 30 min and incubated with

Ni²⁺ beads (Qiagen) for 20 min at room temperature. After binding, lysate and beads were loaded on a column and washed with 10 volumes of washing buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10% Glycerol, 500 mM NaCl) containing 20 mM imidazole. The proteins were eluted with the washing buffer containing increasing concentration of imidazole (50 mM to 250 mM). The fractions (250 µl) were collected and analysed by electrophoresis on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel and Coomassie blue staining. The purest fractions were dialyzed separately against HSBN buffer (10 mM Hepes, pH7.4, 150 mM NaCl). Protein concentrations of the dialysed fractions were carefully determined using a Micro BCA protein assay reagent kit (Pierce), bovine serum albumin being used as standard. The level of purity was assessed by analysis on Experion Pro260 (Bio-Rad), which also allowed the protein concentrations to be confirmed. Experion analysis of typical purified fractions of PABP and different eRF3a forms is shown in supplementary figure S1.

SPR method and analysis

To obtain quantitative kinetic measurements of the eRF3-PABP interactions, experiments were conducted on an SPR (surface plasmon resonance)-based Biacore 3000 biosensor (GE Healthcare). Two different sensor chips were used: a CM5 sensor chip for the experiments with immobilized PABP and a SA sensor chip for the experiments with immobilized RNAs.

SPR experiments on CM5 sensor chip: purified His-tagged full-length PABP was immobilized through primary amino groups to the carboxy-methylated dextran matrix of a CM5 sensor chip. A solution of 1 µg/ml PABP diluted in immobilization buffer (10 mM sodium acetate pH 4.5) was manually injected in order to obtain 1,000-2,500 RU of coupled PABP. The immobilization was followed by injection of 20 µl 1 M ethanolamine hydrochloride, pH 8.5, to saturate the free activated sites of the matrix. To minimize artifacts such as mass transport and rebinding effects, we coupled the minimum amount of PABP required to obtain an optimal signal-to-noise ratio when injecting eRF3a alleles or eRF3b. The absence of a mass transport step was verified by injecting the same eRF3a solution (1 nM) at flow rates ranging from 5 to 50 µl/min over the PABP surface. After data treatment, the interaction curves (sensorgrams) at the different flow rates were superimposable, indicating the absence of mass transport (data not shown). To subtract any background noise from each dataset, the same coupling procedure, but in the absence of PABP, was used to prepare a mock surface. Kinetic experiments were carried out at 25°C at a flow rate of 5 µl/min. Buffer HBS-P (20 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% surfactant P20) was used as the running buffer and for diluting all the injected proteins. Different concentrations of analyte (eRF3a alleles or eRF3b) were injected over the PABP

surface and mock surface for 300 s, followed by a 600 s-long buffer injection unless indicated otherwise. The surface was regenerated by 5 μ l injection of 1 M NaCl, 50 mM NaOH solution for 30 sec.

SPR experiments on SA sensor chip: 5' biotinylated RNA with Poly(A) tail (OligoA₁₂₀) diluted to a final concentration of 2 nM in SA running buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.8, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 5% glycerol and 0.005% Surfactant P20) was allowed to interact with streptavidin until a response of 20 to 220 RU was obtained. We prepared either low density (20-40 RU) or intermediate density (200-250 RU) OligoA₁₂₀ surfaces as indicated in the figure legends. These small amounts of RNA minimized mass transport effects and yielded sufficient signal. No target RNA was captured on a parallel flow cell, which was used as a reference surface. To measure the kinetic parameters of eRF3-PABP interaction, His-tagged full-length PABP (80 nM in SA running buffer) was manually injected at a flow rate of 5 μ l/min for 5 min and allowed to dissociate for 2 min at 5 μ l/min flow rate in SA running buffer. In these conditions, a stable signal was obtained due to the very low dissociation rate ($k_d = 1.72 \times 10^{-5}$) of PABP from OligoA₁₂₀ surface (see Results). For kinetic parameter measurements on PABP-bound OligoA₁₂₀ surface, the proteins (eRF3a 10-GGC and 12-GGC alleles) were serially diluted in SA running buffer and injected over the sensor chip surface at 5 μ l/min for 5 min at 25°C. The surface is regenerated with an SDS 0.1% solution. In order to subtract any background noise from each dataset, all samples were run over an unmodified sensor chip surface, used as a reference.

Biacore data analysis.

Sensorgrams obtained with the BIAcore 3000 system were prepared and each set was subjected to curve fitting with numerical integration methods using the BIAevaluation software, Version 4.1 (GE Healthcare). The data were processed by fitting the binding profiles to a 1:1 Langmuir interaction model. The quality of the fit was assessed by the statistical chi² value provided by the software (chi² values < 10 were considered as acceptable) and by visual inspection of the shape of residual plots (deviation between experimental and fitted data) that is a good indication of the goodness of fit (BIAevaluation Software Handbook, GE Healthcare). Residual should be minimal (residuals of +/- 2 RU are considered as good) and randomly distributed around a zero value (Drescher et al., 2009). The fitting of each dataset yielded rates for association (k_a) and dissociation (k_d), from which the equilibrium dissociation constant was calculated ($K_D = k_d / k_a$). The k_a , k_d and K_D from 2 to 5 experiments (number of experiments is indicated in Tables 1 and 2) were used to calculate the mean values and SEM of these variables.

The valency of the OligoA₁₂₀ for PABP was calculated with the formula $\text{Valency} = \text{Mr ligand} \times \text{R max} / \text{Mr analyte} \times \text{R ligand}$.

RESULTS

The glycine repeat at the N-terminal extremity of human eRF3 influences eRF3-PABP interaction

Our goal was to compare the binding affinities of the different human eRF3a alleles for PABP. We included in this study eRF3b, which is devoid of the N-terminal glycine stretch encoded by the GGC repeat in eRF3a/GSPT1 gene. To obtain quantitative kinetic measurements of the eRF3-PABP interaction, experiments were conducted on an SPR-based biosensor (Biacore 3000). For the first series of experiments, purified His-tagged full-length PABP (1,000-2,500 RU) was immobilized through primary amino groups to the carboxy-methylated dextran matrix of a CM5 sensor chip. In order to subtract any background noise from each dataset, the same coupling procedure, but in the absence of protein, was used to prepare a mock surface (see Materials and Methods). A range of analyte (either 7-GGC, 10-GGC, 11-GGC, 12-GGC eRF3a alleles or eRF3b) concentrations was injected for 5 min, followed by a dissociation phase of 5 min over ligand (PABP) surface or mock surface. The resulting set of curves was then analyzed by curve fitting using numerical integration methods (see Materials and Methods). Removal of the noise was achieved by subtracting the signal generated from a “blank” (running buffer) injection (Fig. 1, 0 nM curves) over the entire dataset ; this is known as “double referencing” (Law et al., 2005). After blank subtraction, the analysis of the sensorgrams yielded good fits when a simple 1:1 Langmuir interaction model was applied. The fitting to this model was judged by the quality of the residual (typically not exceeding +/- 2 RU). The sensorgrams and residual plots of typical SPR experiments are shown in Figure 1, and the kinetic parameters are summarized in Table 1. The 10-GGC allele of eRF3a which seems to be the most frequent in the human population (~70% in all samples of populations studied so far, see discussion) was chosen as a reference for the interactions, and eRF3a in the following text will refered to the 10-GGC allele.

The results of kinetic determinations indicate that eRF3a binds to PABP with a fast association ($k_a = 1.61 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) and a slow dissociation rate constant ($k_d = 2.12 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). The dissociation equilibrium constant (K_D) indicates a high binding affinity between eRF3a and PABP ($K_D = 1.45 \text{ nM}$). The fitting results reveal that 7-GGC and 11-GGC eRF3a alleles bind to PABP with association and dissociation rate constants comparable to those measured for eRF3a (Table 1), resulting in K_D values of the same order of magnitude (4.19 nM and 2.93 nM,

respectively). In contrast, the equilibrium constant of PABP interaction with the 12-GGC eRF3a allele differed by one order of magnitude ($K_D = 12.02$ nM, $P = 0.0012$) with that observed for PABP-eRF3a interaction (Fig. 1F and Table 1). This difference was mainly due to a loss in the association rate while the dissociation rate was of the same magnitude as that observed for eRF3a (Table 1). Conversely, with the fastest association rate ($k_a = 9.66 \times 10^5$ M⁻¹ s⁻¹), the affinity of the PABP-eRF3b interaction ($K_D = 0.55$ nM) was almost 3-fold higher than that of the PABP-eRF3a interaction.

Remembering that (i) the eRF3a alleles only differ by the length of their N-terminal glycine stretch and (ii) the glycine stretch is lacking in eRF3b, and (iii) the glycine stretch is located close to the PABP binding site in the unstructured N-terminal domain of eRF3, our results support the idea that the variations of the equilibrium constant could be attributed to the variations of the glycine stretch encoded by the GGC repeat. This is particularly clear for the eRF3a 12-GGC allele for which the presence of an additional glycine residue, compared to the 11-GGC allele, seems to play a critical role in its association with PABP.

SPR analysis of PABP interacting with poly(A) tail

In cells, cytoplasmic PABP is mainly associated to the poly(A) tail of mRNAs. Thus, eRF3-PABP complex is likely formed mainly when PABP is bound to poly(A). In addition, one must also consider the fact that PABP multimerizes on the mRNA poly(A) tail. Both elements, poly(A) tail and PABP multimerization could potentially modify eRF3-PABP interaction. We therefore decided to study the kinetic parameters of the eRF3a-PABP interaction when PABP is bound to an oligoribonucleotide carrying a poly(A) tail. A 5' biotinylated 18-mer synthetic oligoribonucleotide was elongated with adenosine residues using *E. coli* polyA-polymerase (see Materials and Methods). The resulting oligoribonucleotide (hereafter named OligoA₁₂₀) contained approximately 120-140 adenosine residues (supp. Figure S1) and could theoretically carry 5-7 PABP molecules, considering that a single PABP covers ~20–25 adenosine residues of the poly(A) oligomer (Kühn and Pieler, 1996; Sachs et al., 1987).

To confirm the specificity of PABP binding toward the poly(A) sequence, we immobilized either the biotinylated 18-mer synthetic oligoribonucleotide (68 RU) used for the polyA-polymerase reaction or the biotinylated OligoA₁₂₀ (72 RU) through streptavidin onto SA sensor chip. Small amounts of RNA were used to coat the surface in order to minimize mass transport effects. Purified full-length PABP was used as the analyte in the running buffer. As expected, we did not observe any mass accumulation on the SA sensor chip when the 18-mer oligoribonucleotide was immobilized, showing that PABP has no binding affinity for the 18-mer

synthetic oligoribonucleotide (data not shown). Because we wished to perform multiple-binding SPR experiments with the biotinylated OligoA₁₂₀ immobilized on the SA sensor chip, we first checked whether eRF3a has by itself binding affinity for the biotinylated OligoA₁₂₀. eRF3a was injected at increasing concentrations (10, 50 and 100 nM) over the biotinylated OligoA₁₂₀ (220 RU) immobilized on the surface. As a control 5 nM of PABP was injected on the same surface. The resulting set of curves unambiguously showed that, in contrast to PABP, eRF3a had no binding affinity for the OligoA₁₂₀ (supp. Fig. S2). We next determined the binding capacity of the OligoA₁₂₀ for PABP. In a first experiment, the biotinylated OligoA₁₂₀ (22 RU) was immobilized on the sensor chip surface and multiple injections were performed with increasing concentrations of PABP (25–200 nM) without removing bound protein (20 min injection of PABP followed by a dissociation phase of 20 min with running buffer alone). In a second experiment, PABP at 100 nM concentration was injected for 20 min over the same biotinylated OligoA₁₂₀ (22 RU) surface. These experiments allow (i) to assess the stability of the OligoA₁₂₀ surface over the time of the experiments and (ii) to estimate the number of PABP molecules bound per OligoA₁₂₀ molecule. Both recorded sensorgrams reached a plateau during the injection of PABP at high concentration, consistent with steady-state binding (supp. Fig. S3). This result allowed us to calculate that the OligoA₁₂₀ molecule could bind 5 to 7 PABP molecules (see Materials and Methods), in good agreement with a binding of one PABP for ~20 A residues as previously described (Sachs et al., 1987). This result showed that PABP binds in a linear manner along the poly(A) of the OligoA₁₂₀ molecule. The sensorgrams also showed that, at the end of the association phase, bound PABP dissociated slowly from the immobilized OligoA₁₂₀ suggesting that multimerized PABP formed a stable complex with the poly(A) tail of the OligoA₁₂₀. In addition, these results demonstrated the high stability of the OligoA₁₂₀ surface over experimental time. We also verified the stability of the immobilized OligoA₁₂₀ on the SA sensor chip when several cycles of PABP injection (5 min) at various concentrations (10 to 100 nM), dissociation (8 min) with running buffer, and regeneration (1 min) with 0.1% SDS were applied (see Materials and Methods). We observed that regeneration with 0.1% SDS solution is the most efficient method to remove all bound proteins without damaging the RNA surface (No modification of the base line corresponding to immobilized OligoA₁₂₀ was observed, see supp. Fig. S4). We next determined the kinetic parameters of PABP-OligoA₁₂₀ interaction. A range of PABP (0.75 to 2.5 nM) concentrations was injected for 5 min, followed by a dissociation phase of 8 min over the immobilized OligoA₁₂₀ (220 RU). Disruption of any complex that remained bound after a 8 min dissociation was achieved using a 1 min injection of 0.1% SDS at 30 μ l/min. After blank subtraction (no target RNA was captured on the reference flow cell surface), the

analysis of the sensorgrams yielded good fits when a single site interaction model was applied. The fitting to this model was also judged by the low value of the chi2 and the good quality of the residuals (Fig. 2A). This strongly suggested that no preferential PABP interaction occurred on the OligoA₁₂₀ and that a single PABP bound to the different A₂₀ sites with the same affinity. The results from the fittings of the PABP-OligoA₁₂₀ interaction indicated a moderately fast association rate (k_a) of $1.15 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, a very slow dissociation rate (k_d) of $1.75 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, and a resulting K_D of 1.5 nM. The measurements of the concentration dependencies for the response versus time was employed to calculate the equilibrium constant (K_D) of PABP-OligoA₁₂₀ interaction (Fig. 2B). The values of response at equilibrium obtained for PABP-OligoA₁₂₀ interaction in the experiments shown in Figure 2A and suppl. Figure S4, which were performed on the same immobilized OligoA₁₂₀ surface, were processed using the BIAevaluation software for the steady-state affinity fitting.

Altogether these results validate our synthetic model of poly(A) tail that can be used for the SPR studies of proteins that associate with poly(A)-bound PABP.

Interaction of eRF3a alleles with poly(A)-bound PABP

To confirm the results obtained by SPR with the CM5 sensor chip, we decided to determine the kinetic parameters of eRF3a alleles when interacting with poly(A) bound PABP in multiple-binding SPR experiments. In a preliminary experiment, we evaluated the binding capacities of the different eRF3a alleles. To this end, the biotinylated OligoA₁₂₀ (30 RU) immobilized on the sensor chip surface was covered with PABP by manual injection of a solution of 80 nM PABP for 5 min at 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ followed by a dissociation phase of 8 min with running buffer. This yielded approximately 300 RU of bound PABP, corresponding to ~ 5.4 PABP per OligoA₁₂₀ molecule. Then, eRF3a or one of its allelic forms (7-GGC, 11-GGC and 12-GGC) were injected at 10 nM or 20 nM for 5 min at 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Each eRF3a and allele injection was followed by a dissociation phase of 8 min and by regeneration with 0.1% SDS for 1 min. The resulting sensorgrams showed that eRF3a alleles mainly differed in their association with PABP whereas the dissociation phases were identical (Fig. 3). eRF3a 12-GGC allele had the slowest association rate when compared to eRF3a, 7-GGC and 11-GGC alleles. We also reproducibly observed that the 7-GGC and 11-GGC alleles have slightly lower association rates than that of eRF3a (10-GGC allele).

We therefore studied the kinetic parameters of the interaction of eRF3a and eRF3a 12-GGC allele with poly(A)-bound PABP using the same method as above. A range of eRF3a or eRF3a 12-GGC concentrations was injected over the PABP-bound OligoA₁₂₀ surface. After blank subtraction, the resulting set of curves was analyzed by curve fitting with a simple 1:1 Langmuir

interaction model (see Materials and Methods). The fitting to this model was judged by the quality of the residual plots. The sensorgrams and residuals plots of typical experiments are shown in Figure 4, and the kinetic parameters of 4 independent experiments are summarized in Table 2. In complete agreement with the kinetic parameters obtained with PABP immobilized on a CM5 sensor chip, the fitted results indicated that eRF3a bound to poly(A)-bound PABP with a fast association rate ($k_a = 1.64 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) and a slow dissociation rate ($k_d = 2.37 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$), yielding an equilibrium dissociation constant of 1.33 nM (Table 2). Moreover, we also observed a ~20-fold loss in the association rate of eRFa 12-GGC when compared to that of eRF3a, resulting in a K_D value of 56 nM for eRFa 12-GGC binding to poly(A)-bound PABP (Table 2). These results confirmed that the binding affinity of eRF3a 12-GGC allele for PABP was lower than that of eRF3a (10-GGC allele) by one order of magnitude or more. For both, eRF3a and 12-GGC allele, the dissociation rate constant k_d was in same order ($2-3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$). It is interesting to note that this dissociation rate is ~10-fold faster than that of PABP binding to poly(A) (Fig. 2). This suggests that dissociation of PABP from the immobilized OligoA₁₂₀ surface only marginally affects the dissociation rate of eRF3a-PABP interaction.

DISCUSSION

Surface plasmon resonance (SPR) can visualize complex formation in real time providing unique insights into the dynamics of its association and dissociation. We took advantage of this method to reevaluate the interaction between PABP and the different forms of human translation termination factor eRF3 including eRF3a alleles and eRF3b. What is new is that we show that SPR allows to determine the kinetic parameters of eRF3a-PABP interaction when PABP is multimerized onto a poly(A) tail. Our synthetic model of poly(A) tail mimics the natural situation of cytoplasmic PABP multimerized on the mRNA poly(A) tail.

Our measurements of the kinetic parameters of eRF3 revealed that eRF3a binds to PABP with a nanomolar affinity. It is of interest to note that, in previous reports, the eRF3-PABP interaction measured by isothermal titration calorimetry (ITC) results in an equilibrium constant (K_D) of a micromolar or submicromolar range, thus differing from our K_D value by ~2 order of magnitude (Kononenko et al., 2010; Kozlov et al., 2004; Osawa et al., 2012). A similar discrepancy was observed for Paip1, which also carries a PAM2 site and interacts with PABP MLL domain (Roy et al., 2002). It has been proposed by Kozlov et al. that the use of Paip1 isolated PAM2 motif (Kozlov et al., 2004) instead of full-length Paip1 (Roy et al., 2002) could be responsible for the several hundred fold decrease in Paip1-PABP binding affinity. The comparison of full-length

eRF3a, Paip1 and Paip2 interactions with the PABP MLE domain shows that the binding affinities (K_D) are different: 1.5 nM for eRF3a in the present work, 5.7 nM for Paip1 (Roy et al., 2002), 85 nM for Paip2 (Khaleghpour et al., 2001). These differences are mainly due to a lower dissociation rate ($k_d = 2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ for eRF3a compared to $2.5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ for Paip1 and Paip2). This suggests that the different partners of PABP C-terminal region are recruited in different ways depending on their relative affinities reflecting their mechanisms of action in translation regulation and mRNA stability.

The ~120 A-long RNA (OligoA₁₂₀) molecule we used to study eRF3a-PABP interaction is a polyvalent ligand for PABP. Whereas the preferred binding polarity of multiple PABP molecules along the poly(A) tail remains unknown, in a recent report, Lin et al. (2012) have shown a ~50% cooperative binding conformation of two PABPs using a C₅₀A₂₅ RNA oligomer. In the cooperative binding conformation, the C-termini of adjacent PABPs interact directly with each other thereby stabilizing the overall complex. This cooperative binding conformation resulted in a longer dissociation time of poly(A)-PABP complex when compared with a noncooperatively bound complex. In our experiments, PABPs binding onto the poly(A) of the OligoA₁₂₀ involved multiple molecular interactions with probably cooperative and noncooperative PABP conformations. This heterogeneous binding mode, and particularly its cooperative component, is likely responsible for the very slow dissociation kinetics observed. Thus, the single-step binding model that we used to measure the kinetic parameters of PABP- OligoA₁₂₀ interaction, did not take into consideration the heterogeneous PABP binding mode and provided only an effective method for measuring PABP-Poly(A) binding constants. Recently, ITC experiments with peptides containing eRF3a PAM2 motif (residues 64 to 94) showed that the presence of a polyA₁₀₀₀ polymer during the calorimetric titration resulted in 100-fold increase in eRF3 affinity for PABP, 0.04 versus 4 μM (Osawa et al., 2012). However, we did not observe such a considerable variation in eRF3a binding affinity when PABP was bound to poly(A). Conversely, in our experiments, PABP binding to poly(A) did not seem to affect eRF3 binding to PABP suggesting that, in cells, eRF1-eRF3 termination complex dissociates from PABP bound on the poly(A) tail and not the PABP-eRF3-eRF1 complexes. As proposed recently, upon translational termination, recruitment of PABP-dissociated translation termination complex to the ribosomes permits the binding of the deadenylase complexes to the PABP molecule bound at the end of the poly(A) tail, thus coupling mRNA deadenylation with translation termination (Osawa et al., 2012).

eRF3 is the only known example of protein with two overlapping PAM2 sites (PAM2-N and PAM2-C). However, the eRF3-PABP complex exists exclusively in one-to-one stoichiometry

and it has been shown that the presence of overlapping PAM2 sites increases the affinity of eRF3-PABP interaction (Kozlov et al., 2004; Osawa et al., 2012). Structural studies showed that the overlapping PAM2 sites bind slightly different regions of PABP MLLE domain: PAM2-N occupy the hydrophobic pocket between MLLE helices $\alpha 2$ and $\alpha 3$ whereas PAM2-C interact between helices $\alpha 3$ and $\alpha 5$ (Kozlov and Gehring, 2010; Osawa et al., 2012). The presence of overlapping PAM2 sites may explain the small heterogeneity of experimental dissociation curves relative to the fitting curves and the asymmetrical deviations in the dissociation phase of residual plots observed for all eRF3a forms in our SPR experiments (Figs. 1 and 4).

Our kinetic studies reveal that the different forms of human eRF3, i. e., eRF3 7-, 10-, 11-, 12-GGC alleles and eRF3b, which differs by the length of the glycine extension at their N-terminal extremity, have different affinities for the C-terminal region of PABP. In addition, these differences are mainly due to variations in the association rates suggesting that the glycine extension is able to change the kinetics of complex formation. This effect is particularly clear for the 12-GGC allele of eRF3a which has a 10-fold lower association rate than that of the most common eRF3a 10-GGC allele and for eRF3b which has a 6-fold higher association rate than that of eRF3a 10-GGC allele (Table 1). What could be the structural basis for these differences? Mutations in eRF3a PAM2 sites compromised binding to PABP (Kononenko et al., 2010; Singh et al., 2008) showing that these PAM2 motifs are the only interaction sites for binding to PABP. We can then speculate that the presence of the glycine repeat at the end of eRF3a N-terminal domain leads to a significant change in the adjustment of PAM2 motif upon PABP binding. This is supported by the facts that (i) only the association rate is changed by the presence of the glycine repeat and (ii) the absence of glycine repeat in eRF3b results in an enhanced affinity for PABP (Table 1). It has been reported previously that deletions of Paip1 outside of its PAM2 motif decrease its affinity for PABP (Roy et al., 2002) suggesting structural elements outside of the PAM2 motif are critical for the interaction. The crystal structures of the MLLE domain from PABP in complex with the two PAM2 regions of eRF3 reveals that the MLLE/PAM2 interactions are mostly hydrophobic with the PAM2 peptide in an extended conformation wrapped around the highly conserved KITGMLLE motif and interacting with the hydrophobic pockets of MLLE (Kozlov and Gehring, 2010). The glycine repeat at eRF3a N-terminal extremity is separated from the PAM2 sites by a 48 amino acids sequence in which 4 prolines with propensity to form β -turns are interspersed. The folding of this region could bring the glycine extension in the vicinity of the PAM2 motifs lowering its affinity for the MLLE domain. In this conformation, the length of the glycine repeat could be of great significance, the addition of a single glycine, as in eRF3a

12-GGC allele relative to the 11-GGC allele, inducing even more pronounced changes in the adjustment of PAM2 motifs upon PABP binding.

Interestingly, the eRF3a 12-GGC allele was involved in cancer susceptibility in several studies on portugese and iranian populations with gastric and breast cancer (Brito et al., 2005; Malta-Vacas et al., 2009; Miri et al., 2012). Strikingly, the comparison of allele frequencies in different sample of populations including portugese and iranian populations mentioned above and the population that participates to the NHLBI Exome Sequencing Project (Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA), reveals substantial variations (Table 3). The 9-GGC allele was not found in the iranian population studied by Miri et al. (2012), whereas the 12-GGC allele was completely absent in the population samples of NHLBI Exome Sequencing Project. Further studies with a worldwide distribution of human population samples is needed to accurately ascertain eRF3a allele frequencies, in particular for the 12-GGC allele. We have previously shown that eRF3a 12-GGC allele did not exhibit difference in translation termination activity (Malta-Vacas et al., 2009). However, what could be the biological significance of the low affinity of eRF3a 12-GGC allele for PABP? It is tempting to speculate that lowering the affinity of eRF3a for PABP could affect the coupling of mRNA deadenylation with translation termination. Indeed, by decreasing the binding of translation termination complex to PABP, eRF3a 12-GGC allele could favor the recruitment of deadenylation complexes, and thus, enhance the degradation of the subset of mRNAs that are sensitive to PAN2-PAN3 degradation pathway. Among these mRNAs, those involved in cellular proliferation would be of paramount importance. The status of mRNA degradation in cells carrying the 12-GGC allele needs to be further examined.

ACKNOWLEDGMENTS

S. J. held fellowships from the French Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur (MENESR).

REFERENCES

- Bernstein, P., Peltz, S.W., and Ross, J. (1989). The poly(A)-poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro. *Mol. Cell. Biol.* *9*, 659–670.
- Brito, M., Malta-Vacas, J., Carmona, B., Aires, C., Costa, P., Martins, A.P., Ramos, S., Conde, A.R., and Monteiro, C. (2005). Polyglycine expansions in eRF3/GSPT1 are associated with gastric cancer susceptibility. *Carcinogenesis* *26*, 2046–2049.

- Brook, M., and Gray, N.K. (2012). The role of mammalian poly(A)-binding proteins in coordinating mRNA turnover. *Biochem. Soc. Trans.* *40*, 856–864.
- Burgess, H.M., and Gray, N.K. (2010). mRNA-specific regulation of translation by poly(A)-binding proteins. *Biochem. Soc. Trans.* *38*, 1517–1522.
- Chaloin, O., Peter, J.-C., Briand, J.-P., Masquida, B., Desgranges, C., Muller, S., and Hoebeke, J. (2005). The N-terminus of HIV-1 Tat protein is essential for Tat-TAR RNA interaction. *Cell. Mol. Life Sci.* *62*, 355–361.
- Chauvin, C., and Jean-Jean, O. (2008). Proteasomal degradation of human release factor eRF3a regulates translation termination complex formation. *RNA* *14*, 240–245.
- Chauvin, C., Salhi, S., Le Goff, C., Viranaicken, W., Diop, D., and Jean-Jean, O. (2005). Involvement of human release factors eRF3a and eRF3b in translation termination and regulation of the termination complex formation. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 5801–5811.
- Cosson, B., Berkova, N., Couturier, A., Chabelskaya, S., Philippe, M., and Zhouravleva, G. (2002). Poly(A)-binding protein and eRF3 are associated in vivo in human and *Xenopus* cells. *Biol. Cell* *94*, 205–216.
- Drescher, D.G., Ramakrishnan, N.A., and Drescher, M.J. (2009). Surface plasmon resonance (SPR) analysis of binding interactions of proteins in inner-ear sensory epithelia. *Methods Mol. Biol.* *493*, 323–343.
- Ezzeddine, N., Chang, T.-C., Zhu, W., Yamashita, A., Chen, C.-Y.A., Zhong, Z., Yamashita, Y., Zheng, D., and Shyu, A.-B. (2007). Human TOB, an antiproliferative transcription factor, is a poly(A)-binding protein-dependent positive regulator of cytoplasmic mRNA deadenylation. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 7791–7801.
- Funakoshi, Y., Doi, Y., Hosoda, N., Uchida, N., Osawa, M., Shimada, I., Tsujimoto, M., Suzuki, T., Katada, T., and Hoshino, S. (2007). Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases. *Genes Dev.* *21*, 3135–3148.
- Le Goff, X., Philippe, M., and Jean-Jean, O. (1997). Overexpression of human release factor 1 alone has an antisuppressor effect in human cells. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 3164–3172.
- Hoshino, S. (2012). Mechanism of the initiation of mRNA decay: role of eRF3 family G proteins. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* *3*, 743–757.
- Hoshino, S., Imai, M., Mizutani, M., Kikuchi, Y., Hanaoka, F., Ui, M., and Katada, T. (1998). Molecular cloning of a novel member of the eukaryotic polypeptide chain-releasing factors (eRF). Its identification as eRF3 interacting with eRF1. *J. Biol. Chem.* *273*, 22254–22259.
- Hoshino, S., Imai, M., Kobayashi, T., Uchida, N., and Katada, T. (1999). The eukaryotic polypeptide chain releasing factor (eRF3/GSPT) carrying the translation termination signal to the 3'-Poly(A) tail of mRNA. Direct association of erf3/GSPT with polyadenylate-binding protein. *J. Biol. Chem.* *274*, 16677–16680.

- Jakobsen, C.G., Seggaard, T.M., Jean-Jean, O., Frolova, L., and Justesen, J. (2001). Identification of a novel termination release factor eRF3b expressing the eRF3 activity in vitro and in vivo. *Mol. Biol. (Mosk.)* 35, 672–681.
- Jean-Jean, O., Le Goff, X., and Philippe, M. (1996). Is there a human [psi]? *Comptes Rendus Académie Sci. Sér. III* 319, 487–492.
- Kahvejian, A., Roy, G., and Sonenberg, N. (2001). The mRNA closed-loop model: the function of PABP and PABP-interacting proteins in mRNA translation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 66, 293–300.
- Khaleghpour, K., Kahvejian, A., De Crescenzo, G., Roy, G., Svitkin, Y.V., Imataka, H., O'Connor-McCourt, M., and Sonenberg, N. (2001). Dual interactions of the translational repressor Paip2 with poly(A) binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5200–5213.
- Kononenko, A.V., Mitkevich, V.A., Atkinson, G.C., Tenson, T., Dubovaya, V.I., Frolova, L.Y., Makarov, A.A., and Haurlyiuk, V. (2010). GTP-dependent structural rearrangement of the eRF1:eRF3 complex and eRF3 sequence motifs essential for PABP binding. *Nucleic Acids Res.* 38, 548–558.
- Kozlov, G., and Gehring, K. (2010). Molecular basis of eRF3 recognition by the MLLE domain of poly(A)-binding protein. *PloS One* 5, e10169.
- Kozlov, G., De Crescenzo, G., Lim, N.S., Siddiqui, N., Fantus, D., Kahvejian, A., Trempe, J.-F., Elias, D., Ekiel, I., Sonenberg, N., et al. (2004). Structural basis of ligand recognition by PABC, a highly specific peptide-binding domain found in poly(A)-binding protein and a HECT ubiquitin ligase. *EMBO J.* 23, 272–281.
- Kühn, U., and Pieler, T. (1996). *Xenopus* poly(A) binding protein: functional domains in RNA binding and protein-protein interaction. *J. Mol. Biol.* 256, 20–30.
- Law, M.J., Chambers, E.J., Katsamba, P.S., Haworth, I.S., and Laird-Offringa, I.A. (2005). Kinetic analysis of the role of the tyrosine 13, phenylalanine 56 and glutamine 54 network in the U1A/U1 hairpin II interaction. *Nucleic Acids Res.* 33, 2917–2928.
- Lin, J., Fabian, M., Sonenberg, N., and Meller, A. (2012). Nanopore detachment kinetics of poly(A) binding proteins from RNA molecules reveals the critical role of C-terminus interactions. *Biophys. J.* 102, 1427–1434.
- Malta-Vacas, J., Chauvin, C., Gonçalves, L., Nazaré, A., Carvalho, C., Monteiro, C., Bagrel, D., Jean-Jean, O., and Brito, M. (2009). eRF3a/GSPT1 12-GGC allele increases the susceptibility for breast cancer development. *Oncol. Rep.* 21, 1551–1558.
- Miri, M., Hemati, S., Safari, F., and Tavassoli, M. (2012). GGCn polymorphism of eRF3a/GSPT1 gene and breast cancer susceptibility. *Med. Oncol.* 29, 1581–1585.
- Osawa, M., Hosoda, N., Nakanishi, T., Uchida, N., Kimura, T., Imai, S., Machiyama, A., Katada, T., Hoshino, S., and Shimada, I. (2012). Biological role of the two overlapping poly(A)-binding protein interacting motifs 2 (PAM2) of eukaryotic releasing factor eRF3 in mRNA decay. *RNA* 18, 1957–1967.

- Park, S., Myszka, D.G., Yu, M., Littler, S.J., and Laird-Offringa, I.A. (2000). HuD RNA recognition motifs play distinct roles in the formation of a stable complex with AU-rich RNA. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4765–4772.
- Roy, G., De Crescenzo, G., Khaleghpour, K., Kahvejian, A., O'Connor-McCourt, M., and Sonenberg, N. (2002). Paip1 interacts with poly(A) binding protein through two independent binding motifs. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3769–3782.
- Sachs, A.B., Davis, R.W., and Kornberg, R.D. (1987). A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability. *Mol. Cell. Biol.* 7, 3268–3276.
- Sagliocco, F., Laloo, B., Cosson, B., Laborde, L., Castroviejo, M., Rosenbaum, J., Ripoche, J., and Grosset, C. (2006). The ARE-associated factor AUF1 binds poly(A) in vitro in competition with PABP. *Biochem. J.* 400, 337–347.
- Siddiqui, N., Mangus, D.A., Chang, T.-C., Palermino, J.-M., Shyu, A.-B., and Gehring, K. (2007). Poly(A) nuclease interacts with the C-terminal domain of polyadenylate-binding protein domain from poly(A)-binding protein. *J. Biol. Chem.* 282, 25067–25075.
- Singh, G., Rebbapragada, I., and Lykke-Andersen, J. (2008). A competition between stimulators and antagonists of Upf complex recruitment governs human nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS Biol.* 6, e111.
- Yamashita, A., Chang, T.-C., Yamashita, Y., Zhu, W., Zhong, Z., Chen, C.-Y.A., and Shyu, A.-B. (2005). Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 1054–1063.

LEGEND TO FIGURES

Figure 1: SPR analysis of the interaction between eRF3 and PABP (2000-2200 RU) immobilized on a CM5 sensor chip surface. Typical experimental sensorgrams (top panels) and residuals plots (difference between calculated and experimental data points, bottom panels) are shown for eRF3a 10-GGC allele (**A**), eRF3a 12-GGC allele (**B**), eRF3a 7-GGC allele (**C**), eRF3a 11-GGC allele (**D**), and eRF3b (**E**). The different concentrations of the injected analytes are indicated on the right of the sensorgrams (for experimental details see Materials and Methods). Data were treated and integrated using a simple Langmuir 1:1 model. (**F**) Comparison of eRF3a alleles and eRF3b equilibrium dissociation constants (K_D) listed in Table 1. Error bars indicate the standard error (SEM). Statistical significance (P-values from Student's t-test) of differences between eRF3a 12-GGC and other eRF3a alleles are indicated.

Figure 2: Kinetic analyses of PABP binding to 5' biotinylated OligoA₁₂₀ RNA (220 RU) immobilized onto a SA sensor chip surface. (**A**) Sensorgrams of the binding profiles using a Langmuir 1:1 binding model (top panel) and residuals plots (bottom panel) are shown. Concentrations of PABP injected are indicated on the right of the sensorgrams. Kinetic parameters (k_a , k_d and K_D) and the Chi2 value of the fitting are also indicated. (**B**) Plot of the response versus PABP concentration used for the steady-state affinity fitting with the BIAevaluation software (see text for details).

Figure 3: Sensorgrams of single-binding analysis of eRF3a and 7-GGC, 11-GGC, and 12-GGC alleles. eRF3a alleles were injected at 10 and 20 nM concentrations (indicated on the right of each sensorgram) over PABP (300 RU) bound to OligoA₁₂₀ RNA (30 RU) immobilized on a SA sensor chip.

Figure 4: Kinetic analyses of eRF3a 10-GGC allele (**A**) and eRF3a 12-GGC allele (**B**) interacting with PABP (300 RU) bound to OligoA₁₂₀ RNA (30 RU) immobilized onto a SA sensor chip surface. Typical sensorgrams and fitting of the binding profiles to a Langmuir 1:1 binding model (top panel) and residuals plots (bottom panel) are shown. Concentrations of injected analytes are indicated on the right of the sensorgrams.

LEGEND TO SUPPLEMENTARY FIGURES

Supp. Figure S1: (A) Northern blot analysis of 5' biotinylated 18-mer RNA oligo and of the RNA oligo elongated with poly(A) polymerase (OligoA₁₂₀). The 18-mer RNA oligo and the poly(A) elongated RNA oligo (2 different experiments) were run onto a denaturing 10% polyacrylamide gel, transferred onto a Nylon membrane and revealed using HRP-conjugated streptavidin reagent (see Materials and Methods). Size markers are indicated on the left in nucleotides (nt). (B) Experion analysis of typical purified fractions of PABP and different eRF3a forms indicated above each lane using Experion Pro260 (Bio-Rad). Molecular weight ladder in kiloDaltons, left lane.

Supp. Figure S2: Sensorgrams of eRF3a and PABP binding to OligoA₁₂₀ RNA (220 RU) immobilized on a SA sensor chip. eRF3a and PABP were injected at the concentrations indicated on the right of each sensorgram.

Supp. Figure S3: Analysis of PABP binding to OligoA₁₂₀ RNA (22 RU) immobilized on a SA sensor chip. (A) PABP was injected for 20 min at a flow rate of 5 μ l/min at the concentrations indicated, followed by a dissociation phase of 20 min in running buffer. The dissociation phase was followed by a new PABP injection time with out regenerating step. (B) Single injection of PABP (100 nM) for 20 min at a flow rate of 5 μ l/min. R_{max} corresponds to the saturation of the immobilized OligoA₁₂₀ with PABP. R_{max} was used to calculate the number of PABP molecules bound to the OligoA₁₂₀ RNA.

Supp. Figure S4: Analysis of the stability of OligoA₁₂₀ RNA (220 RU) immobilized on a SA sensor chip upon PABP binding. Several cycles of PABP injection (5 min) at various concentrations (10 to 100 nM as indicated), dissociation (8 min) with running buffer, and regeneration (30 s) with 0.1% SDS were applied. The stability of the baseline during the course of the experiment demonstrates the absence of OligoA₁₂₀ degradation over time and the very good efficiency of the regeneration.

TABLES

Table 1. Kinetic parameters for eRF3a alleles and eRF3b interaction with PABP immobilized on a CM5 sensor chip surface^a

Protein	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)	Number of experiments	Fold ^b
eRF3a (10-GGC)	1.61 +/- 0.38 x 10 ⁵	2.12 +/- 0.26 x 10 ⁻⁴	1.5 +/- 0.2	5	1
12-GGC	3.01 +/- 0.92 x 10 ⁴	3.22 +/- 0.96 x 10 ⁻⁴	12.0 +/- 2.3	4	8.3
11-GGC	1.31 +/- 0.13 x 10 ⁵	3.74 +/- 0.23 x 10 ⁻⁴	2.9 +/- 0.4	3	2
7-GGC	1.02 +/- 0.23 x 10 ⁵	4.04 +/- 0.41 x 10 ⁻⁴	4.2 +/- 0.6	3	2.9
eRF3b	9.66 +/- 0.85 x 10 ⁵	5.38 +/- 1.32 x 10 ⁻⁴	0.5 +/- 0.1	2	0.4

^aAll differences in k_a and K_D between eRF3a 12-GGC allele and the other forms of eRF3 (7-GGC, 10-GGC, 11-GGC alleles and eRF3b) alleles were statistically significant ($P < 0.05$, Student's t-test), Values of k_d , were not significantly different ($P > 0.2$). The SEM is indicated in the k_a , k_d and K_D columns.

^bFold difference between eRF3a (10-GGC) and alleles for K_D values.

Table 2. Kinetic parameters for eRF3a and eRF3a 12-GGC allele interaction with PABP bound to OligoA₁₂₀ immobilized on a SA sensor chip surface^a

Protein	k_a ($M^{-1} s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (nM)	Number of experiments
eRF3a (10-GGC)	1.64 +/- 0.26 x 10 ⁵	2.37 +/- 1.01 x 10 ⁻⁴	1.3 +/- 0.4	4
12-GGC	7.38 +/- 3.9 x 10 ³	2.31 +/- 0.63 x 10 ⁻⁴	56.2 +/- 17.2	4

^aAll differences in k_a and K_D between eRF3a and the 12-GGC allele were statistically significant with $P(k_a) = 0.00099$ and $P(K_D) = 0.01872$ (Student's t-test), Values of k_d were not significantly different ($P = 0.96$). The SEM is indicated in the k_a , k_d and K_D columns.

Table 3. eRF3a allele frequencies in human population

Population	7-GGC (%)	9-GGC (%)	10-GGC (%)	11-GGC (%)	12-GGC (%)	Count^a	References
Portugese	7.1	0.7	69.2	21.2	1.9	940	Brito et al., 2005 Malta-Vacas et al., 2009
Iranian	5.6	0.0	66.5	26.0	1.9	1000	Miri et al., 2012
European American	6.7	4.9	75.3	13.1	0.0	838	NHLBI Exome Sequencing Project ^b
African American	5.4	4.9	78.3	11.4	0.0	184	NHLBI Exome Sequencing Project ^b

^a Total count of alleles

^bhttp://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;g=ENSG00000103342;r=16:11868128-11916082;v=TMP_ESP_16_12009531_12009539;vdb=variation;vf=118359499

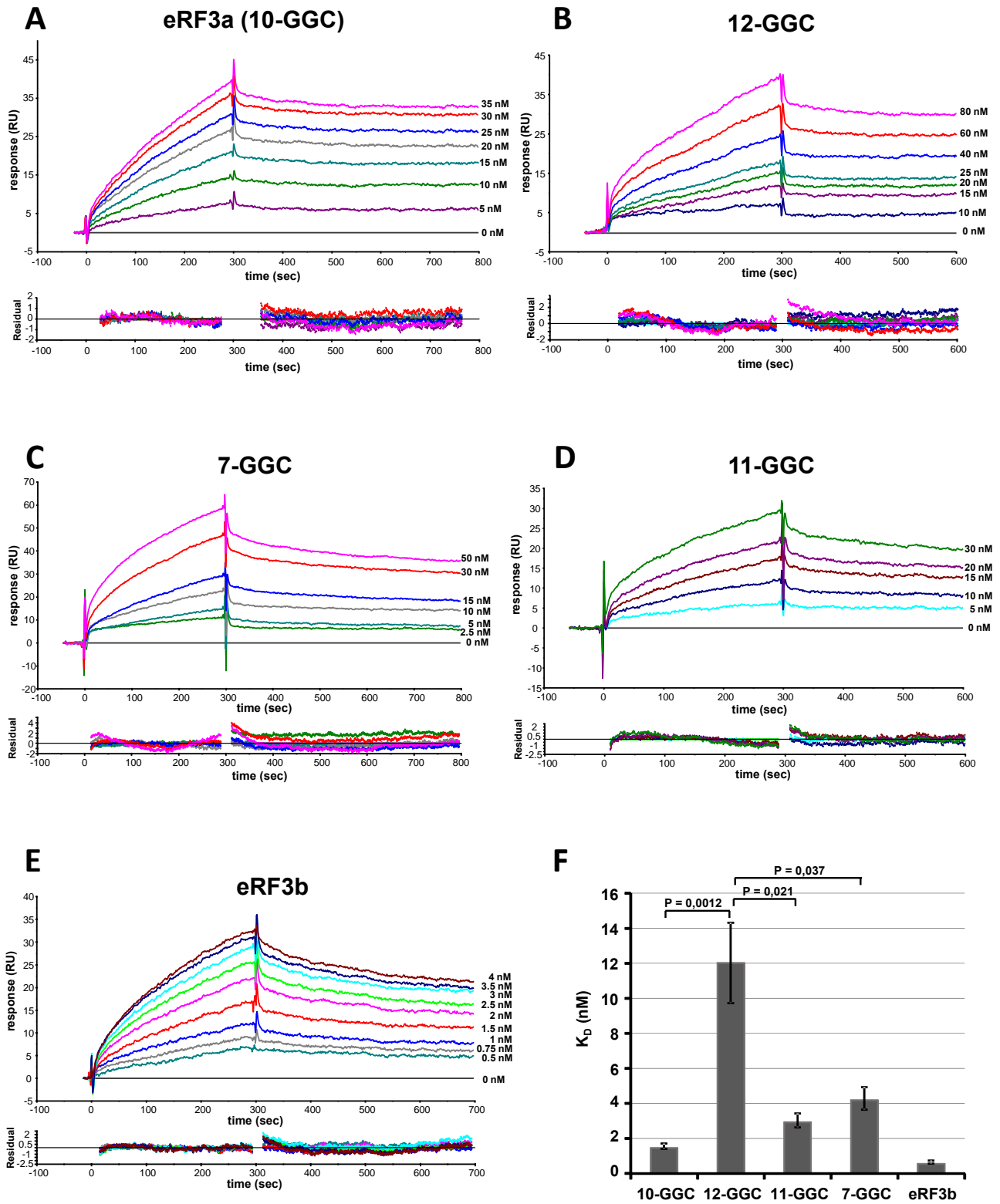
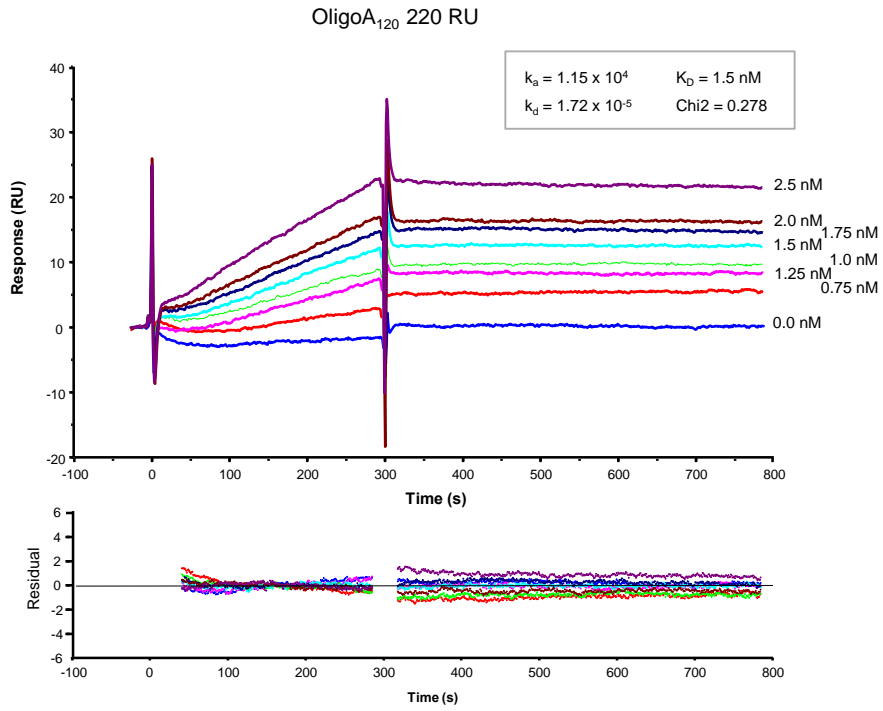


Figure 1

A



B

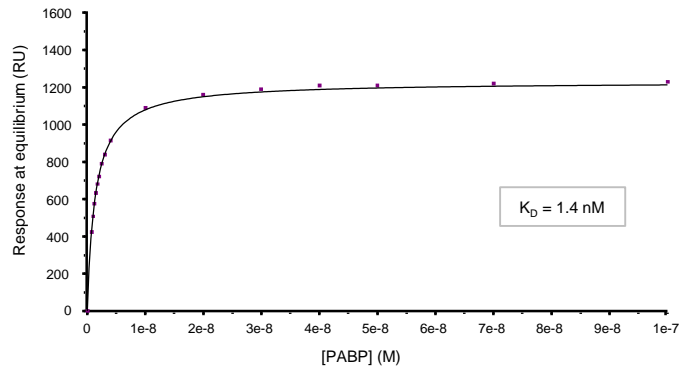


Figure 2

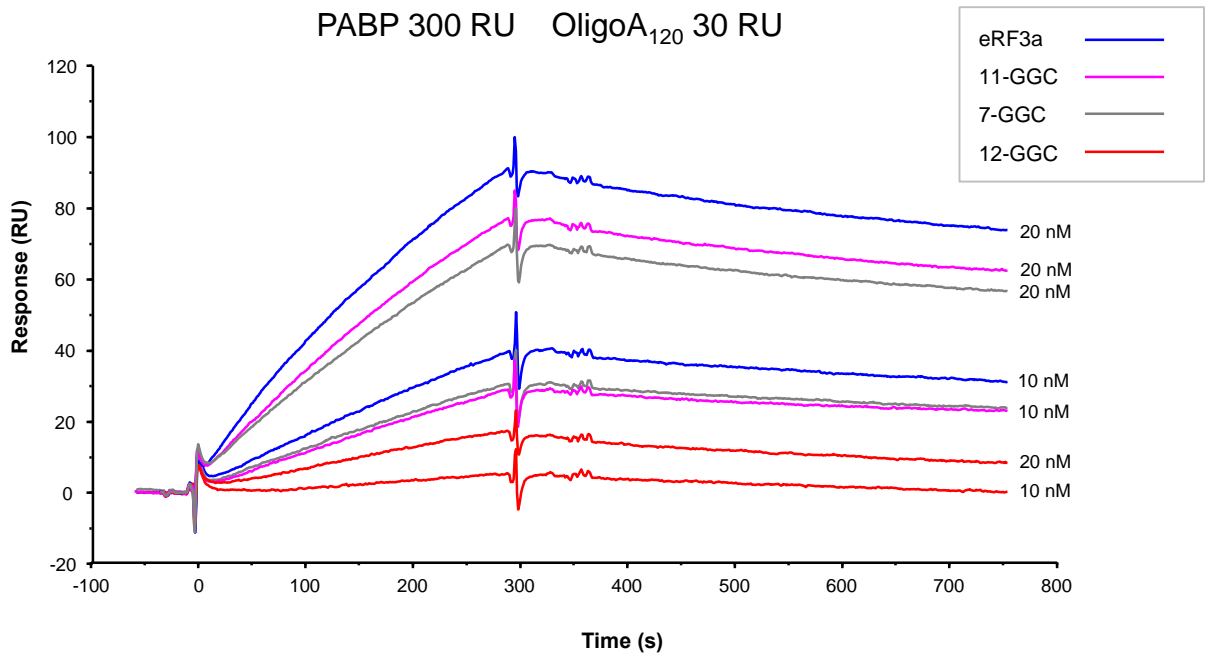


Figure 3

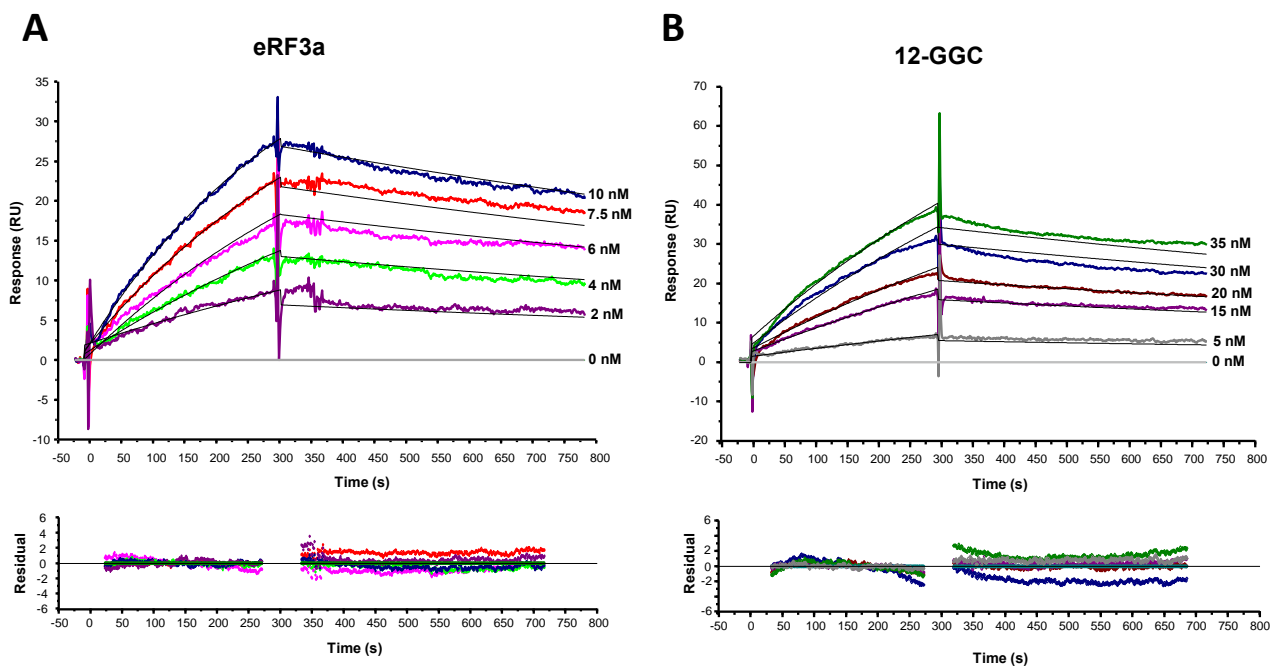
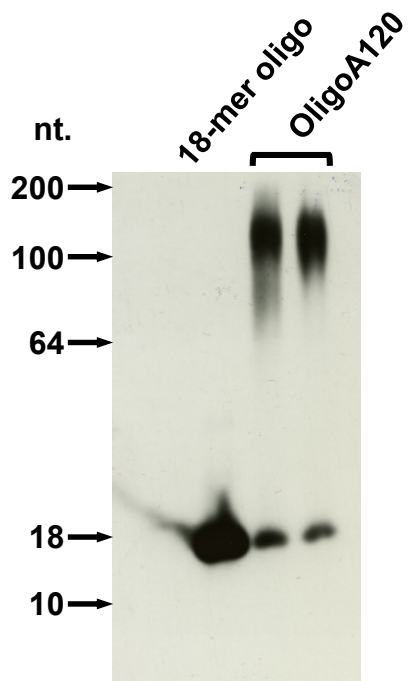
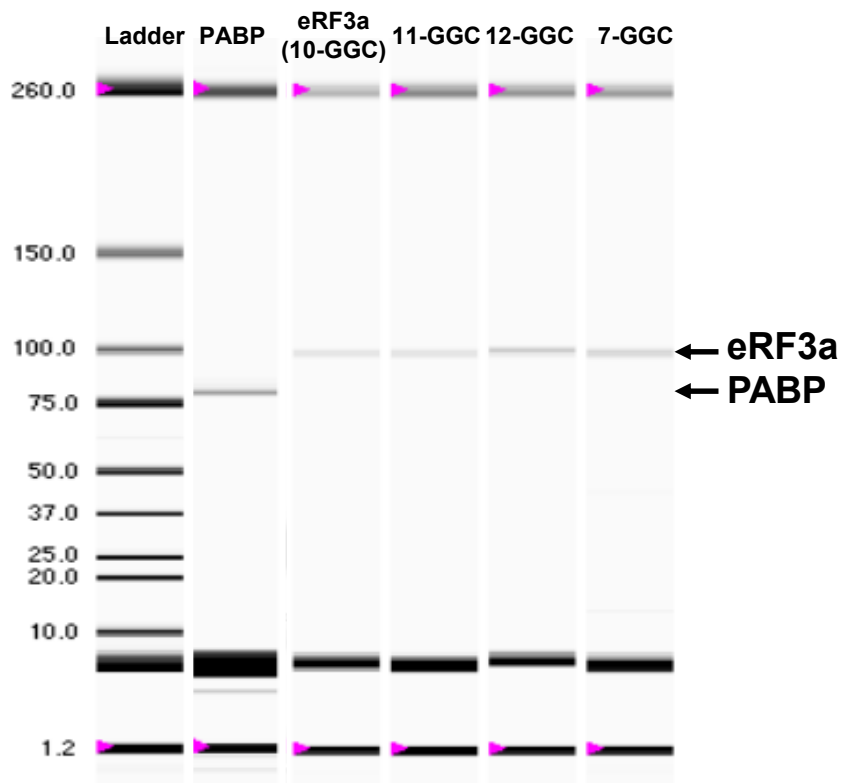
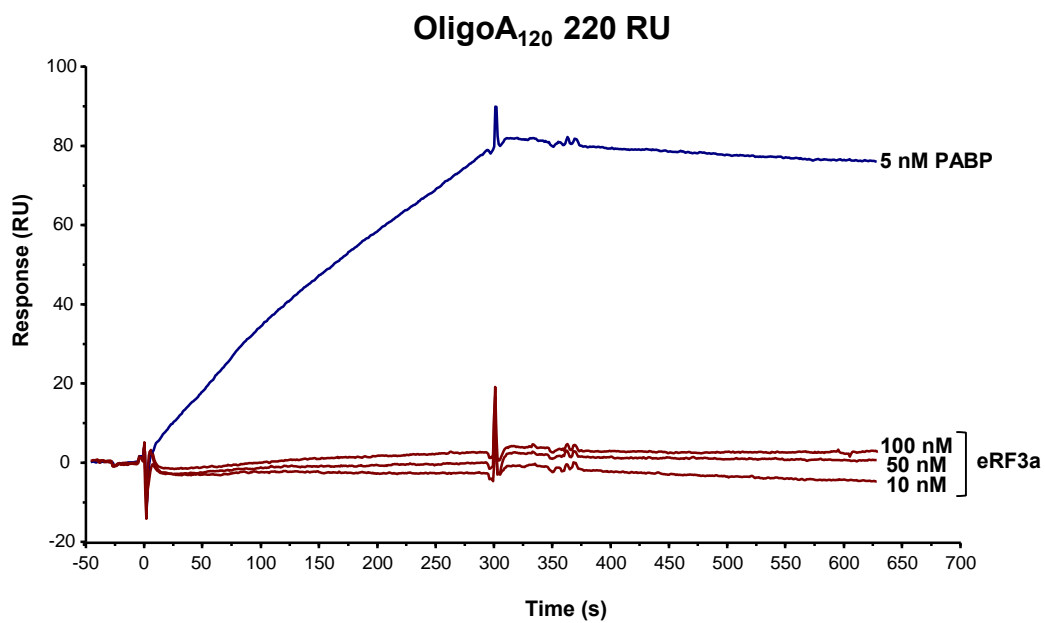


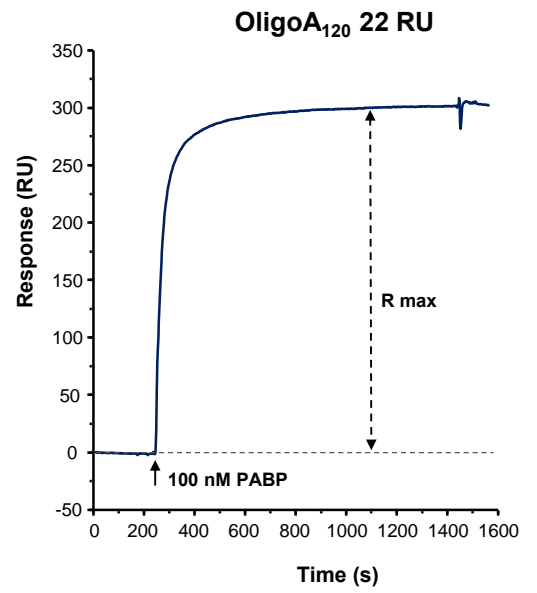
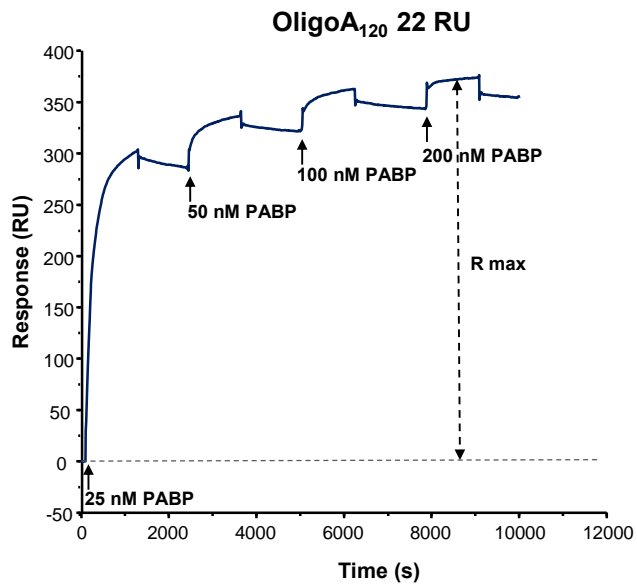
Figure 4

A**B**

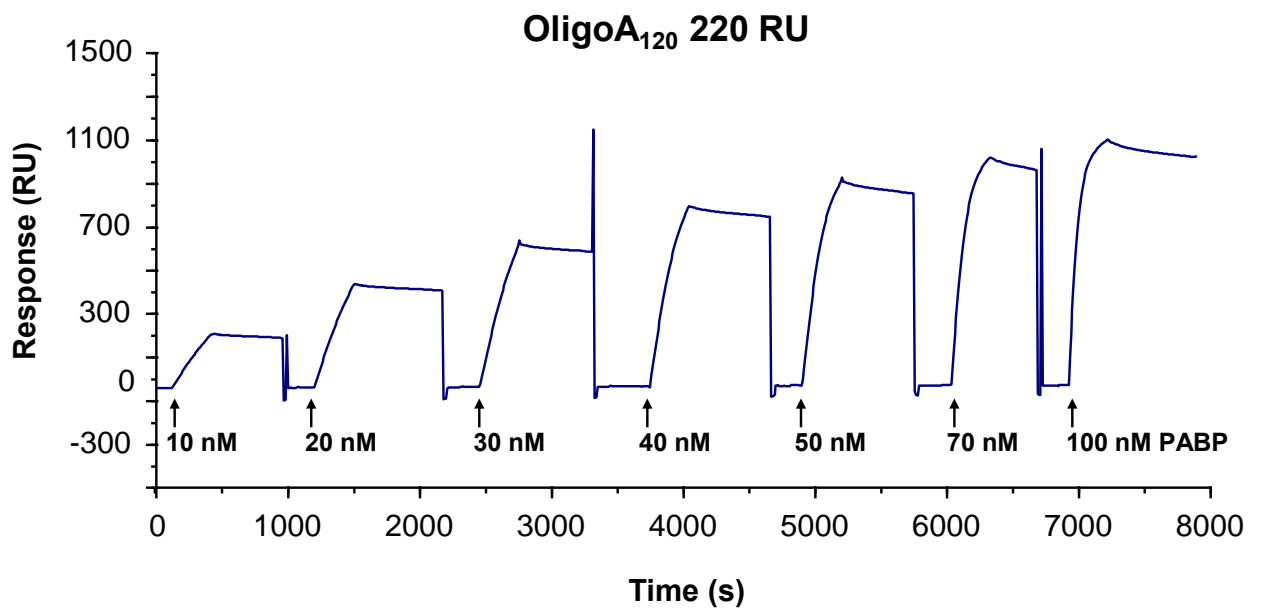
Supp. Fig. S1



Supp. Fig. S2



Supp. Fig. S3



Supp. Fig. S4

VI. Le motif PAM2-N est le plus impliqué dans l'interaction d'eRF3 avec PABP

Le facteur eRF3a (10-GGC) est la seule protéine PAM2 qui contienne deux sites PAM2 chevauchant. Afin d'évaluer l'importance respective des deux sites PAM2 d'eRF3a, nous avons réalisé des mutants d'eRF3 en modifiant les résidus conservés des motifs PAM2.

Un plasmide pET-His-eRF3a-KAKA exprimant le mutant d'eRF3 portant les mutations L vers K, N vers A, A vers K et F vers A du motif PAM2-N (RQLNVNAKPFVPH) et le plasmide pET-His-eRF3a-AKA portant les mutations H vers A, A vers K et F vers A du motif PAM2-C (FVPHVHAAEFVPSFL) ont été obtenus par une méthode de PCR par concaténation. Les protéines mutantes résultantes eRF3a-KAKA et eRF3a-AKA ont été surexprimées et purifiées. Notre objectif était de déterminer lequel de ces deux motifs a le plus d'affinité pour PABP. Comme pour les formes alléliques d'eRF3, nous avons d'abord étudié les interactions entre les mutants d'eRF3 et PABP en absence de l'OligoA₁₂₀. J'ai utilisé pour cela un *Sensor Chip* CM5 sur lequel a été immobilisé PABP dans les mêmes conditions que dans l'étude des interactions des formes alléliques. Les résultats des cinétiques montrent que les valeurs des constantes de dissociation à l'équilibre K_D de eRF3a-AKA et de eRF3a-KAKA sont respectivement de l'ordre de 7,34 nM et de 103 nM. En conséquence, l'affinité de eRF3a-AKA est proche de celle de eRF3a (10-GGC) alors que celle du mutant eRF3a-KAKA est beaucoup plus faible (plus d'un ordre de grandeur de différence). Nos résultats montrent que les mutations au niveau du site PAM2-N endommagent fortement l'interaction d'eRF3a avec PABP. Ainsi, le site PAM2-N serait le plus impliqué dans cette interaction.

Etant donné que l'expansion de glycine d'eRF3a se trouve à proximité des sites PAM2 (à une distance d'environ 40 résidus), nous avons voulu savoir s'il y aurait un lien entre l'expansion glycine d'eRF3a et les sites PAM2 qui pourrait influencer sur l'affinité d'eRF3a avec PABP. Pour répondre à cette interrogation, nous avons construit et surexprimé des mutants dans les sites PAM2 de la forme 12-GGC d'eRF3a (12-GGC-AKA et 12-GGC-KAKA).

Il a été difficile de déterminer les affinités de ces interactions du fait des très faibles réponses obtenues. Notre système n'a pas pu détecter d'interaction mesurable entre les mutants 12-GGC-AKA et 12-GGC-KAKA. Ce qui signifie que l'affinité entre ces mutants et PABP est trop faible pour pouvoir être déterminée.

L'ensemble des résultats va dans le sens d'un impact de l'expansion glycine sur l'interaction PAM2-PABP et cet impact serait plus prononcé en présence de la forme allélique 12-GGC.

Pour aller plus loin, nous avons testé les niveaux d'interaction des mutants d'eRF3a et de l'allèle 12-GGC sur PABP multimérisé sur l'OligoA₁₂₀. Pour cela, nous avons d'abord injecté PABP jusqu'à 300RU (soit 5 à 6 PABP/OligoA₁₂₀), suivi d'une injection soit d'eRF3a, d'eRF3a-AKA, d'eRF3a-KAKA, de 12-GGC-AKA ou de 12-GGC-KAKA à une concentration de 50 nM pendant 5 min suivi d'une dissociation pendant 5 min. Les résultats de cette expérience sont présentés dans la **Figure 31**.

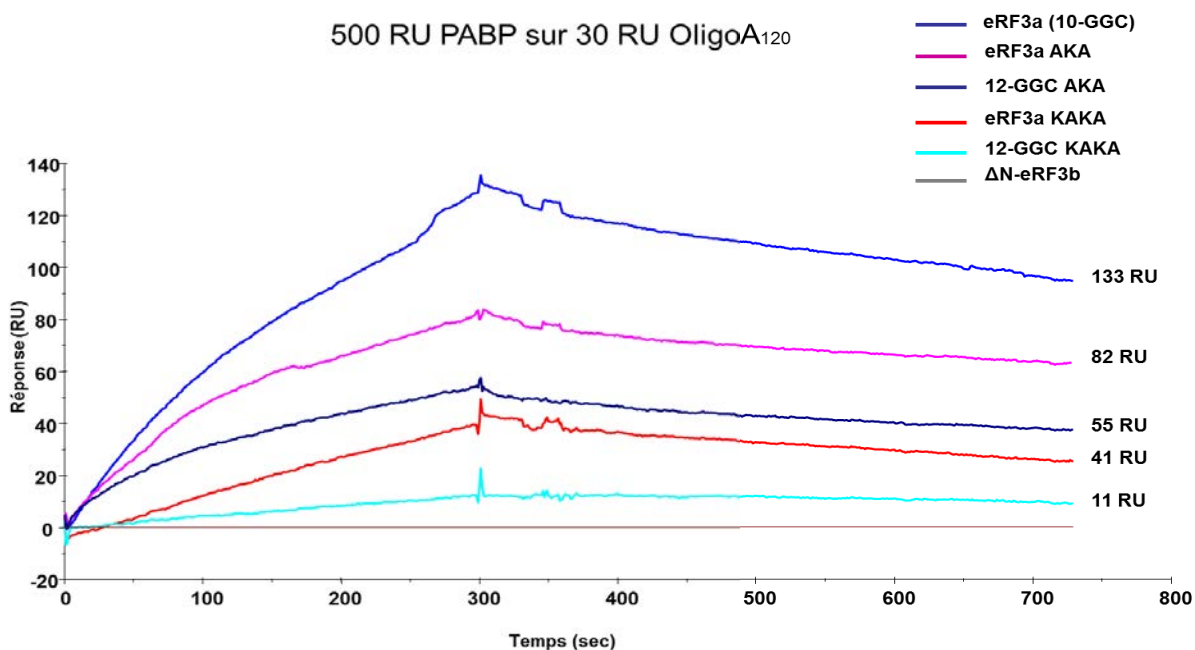


Figure 31 : Comparaison des niveaux d'interaction des mutants d'eRF3a et du 12-GGC(mutations des motifs PAM2-N et PAM2-C).

Les sensorgrammes obtenus montrent que les différences sont au niveau de la phase d'association. Comme en l'absence d'OligoA₁₂₀, le mutant 12-GGC-KAKA semble ne pas interagir avec PABP. Cette fois-ci, l'interaction du 12-GGC-AKA est mesurable : 12-GGC-

AKA et eRF3a-KAKA ont des niveaux d'association rapprochés mais plus faibles que ceux d'eRF3a et eRF3a-AKA. Le mutant eRF3a-AKA présente une association légèrement plus faible que le 10-GGC.

Ces observations sont en cohérence avec les résultats obtenus sur le *Sensor Chip* CM5. Dans les deux cas, il n'a pas été possible de mesurer des paramètres cinétiques du mutant 12-GGC-KAKA. Les mutations dans le site PAM2-N associées à l'expansion 12-Glycine endommagent totalement l'interaction d'eRF3a avec PABP. Les mutations dans le site PAM2-C (eRF3a-AKA) entraînent seulement la réduction de l'interaction (une formation plus faible du complexe). Cependant cette réduction est plus prononcée avec le mutant 12-GGC-AKA.

Ces résultats confirment l'implication de l'expansion de glycine dans la reconnaissance de l'interaction eRF3a-PABP. Nous confirmons, au vu des résultats précédents, que l'expansion de glycine dans le domaine N-terminal d'eRF3a (qui est un domaine non structuré) a une influence sur l'interaction d'eRF3a avec PABP et peut donc jouer un rôle dans la désadénylation des ARNm.

VII. Etude de la compétition entre les facteurs de désadénylation et eRF3

Comme mentionné dans l'introduction de ce chapitre, notre projet avait pour objectif, entre autres, d'éclaircir le rôle d'eRF3 dans la désadénylation. Nous avons donc voulu remettre en question la compétition entre eRF3a et les facteurs de désadénylation PAN3 et TOB pour la fixation sur PABP quand il est multimérisé sur l'OligoA₁₂₀. Notre stratégie était d'une part, d'étudier les interactions entre TOB et PAN3 avec PABP en présence ou en absence de l'OligoA₁₂₀ et d'autre part, d'étudier l'influence d'eRF3 sur ces interactions.

Pour ce faire, la protéine TOB a été surexprimée et purifiée sous sa forme entière et avec une étiquette 6-His du côté C-terminal. Pour la protéine PAN3, après de nombreuses tentatives, la surproduction de sa forme entière a été abandonnée et nous avons eu recours à la synthèse peptidique de motifs PAM2 et PAM2 muté comme témoin d'interaction (**Figure 32**). Deux peptides ont été synthétisés chimiquement par le synthétiseur Liberty Blue et par la suite

purifiés par HPLC en phase inverse. Le premier peptide correspond au motif PAN3 wt avec quelques résidus de part et d'autre (QRRKTPNPTASEFIPKGGSTS). Le deuxième peptide (PAN3 mut) correspond à un motif PAM2 de PAN3 muté dans trois acides aminés fortement impliqués dans l'interaction de PAN3 avec PABP (QRRKTPAPTKSEAIPKGGSTS) et n'est pas censé pouvoir interagir avec PABP.

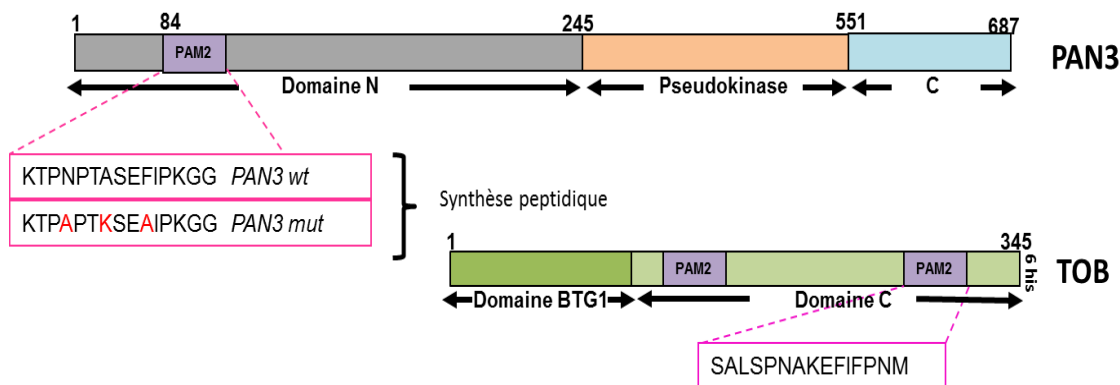


Figure 32 : Schéma du motif PAM2 de PAN3 obtenu par synthèse peptidique et de son peptide mutant. Présentation de la protéine TOB entière avec son étiquette 6 his en C-ter.

Notre premier objectif était de comparer les paramètres cinétiques des interactions TOB-PABP et PAN3-PABP et eRF3a-PABP. Nous avons utilisé un *Sensor Chip* CM5 sur lequel a été immobilisé le ligand PABP. Une série de concentration de TOB (analyte) allant de 0 jusqu'à 120 nM a été injectée pendant un temps d'association de 5 min à un flux de 5 min/ μ l et un temps de dissociation de 8 min suivi d'une régénération avec une solution de Glycine à pH 2. En ce qui concerne l'interaction PABP-PAN3, du fait de la différence du poids moléculaire entre PABP et le peptide PAN3 wt, nous avons immobilisé PAN3 wt en tant que ligand jusqu'à un niveau de 560 RU sur un premier canal et le canal de référence est obtenu en immobilisant le peptide PAN3 mut jusqu'à 560 RU. Ce canal contrôle servira pour éliminer les interactions non spécifiques qui peuvent se mettre en place durant l'injection de PABP. Une série de concentration de PABP allant de 0 à 500 nM a été injectée. Les sensorgrammes obtenus (**Figure 33**) sont analysés selon le modèle *Langmuir 1:1*. Les paramètres cinétiques qui en résultent sont résumés dans le **Tableau 5**. Les résultats montrent que les taux d'association des complexes PABP-PAN3 et TOB-PABP sont plus faibles que celui d'eRF3a-PABP ($0,35$ et $0,16 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ respectivement contre $1,61 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ pour eRF3a) et que les taux de dissociation sont plus

élevés (20 et $5,75 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, respectivement contre $2,12 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ pour eRF3a). En conséquence, l'affinité de PAN3 pour PABP est environ 40 fois plus faible que celle d'eRF3a. Cette différence est due essentiellement à la baisse de la stabilité du complexe (k_d). L'affinité de TOB pour PABP est environ 30 fois plus faible et ceci est dû à la baisse de l'association (k_a).

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des valeurs de paramètres cinétiques obtenus pour les interactions eRF3, PAN3 et TOB avec PABP.

Paramètres	eRF3a(Réf)	PAN3	TOB
K_D (nM)	1,45±0.15	61,90±17.60	47,95±24.45
Facteur d'augmentation du K_D (= K_D / K_D Réf)	1,00	42,69	33,07
k_a ($\times 10^5$) ($M^{-1} \text{ s}^{-1}$)	1,61±0.38	0.35±0.06	0.16±0.09
Facteur de diminution de k_a (= k_a Réf / k_a)	1,00	4,54	9,56
k_d ($\times 10^{-4}$) (s^{-1})	2,12±0.25	20±1.7	5,72±0.52
Facteur d'augmentation du k_d (= k_d / k_d Réf)	1,00	9,43	2,70

En sachant que les complexes de désadénylation interviennent en deux temps au cours de la désadénylation (d'abord PAN3 et par la suite TOB), nos résultats suggèrent que la plus grande dissociation de PAN3 sur PABP faciliterait l'association du complexe TOB-CCR4-NOT à PABP. De plus, les faibles affinités des deux complexes pour PABP confirment le rôle d'eRF3a comme antagoniste aux facteurs de désadénylation. Le début de la désadénylation ne se ferait qu'après le départ d'eRF3a de PABP.

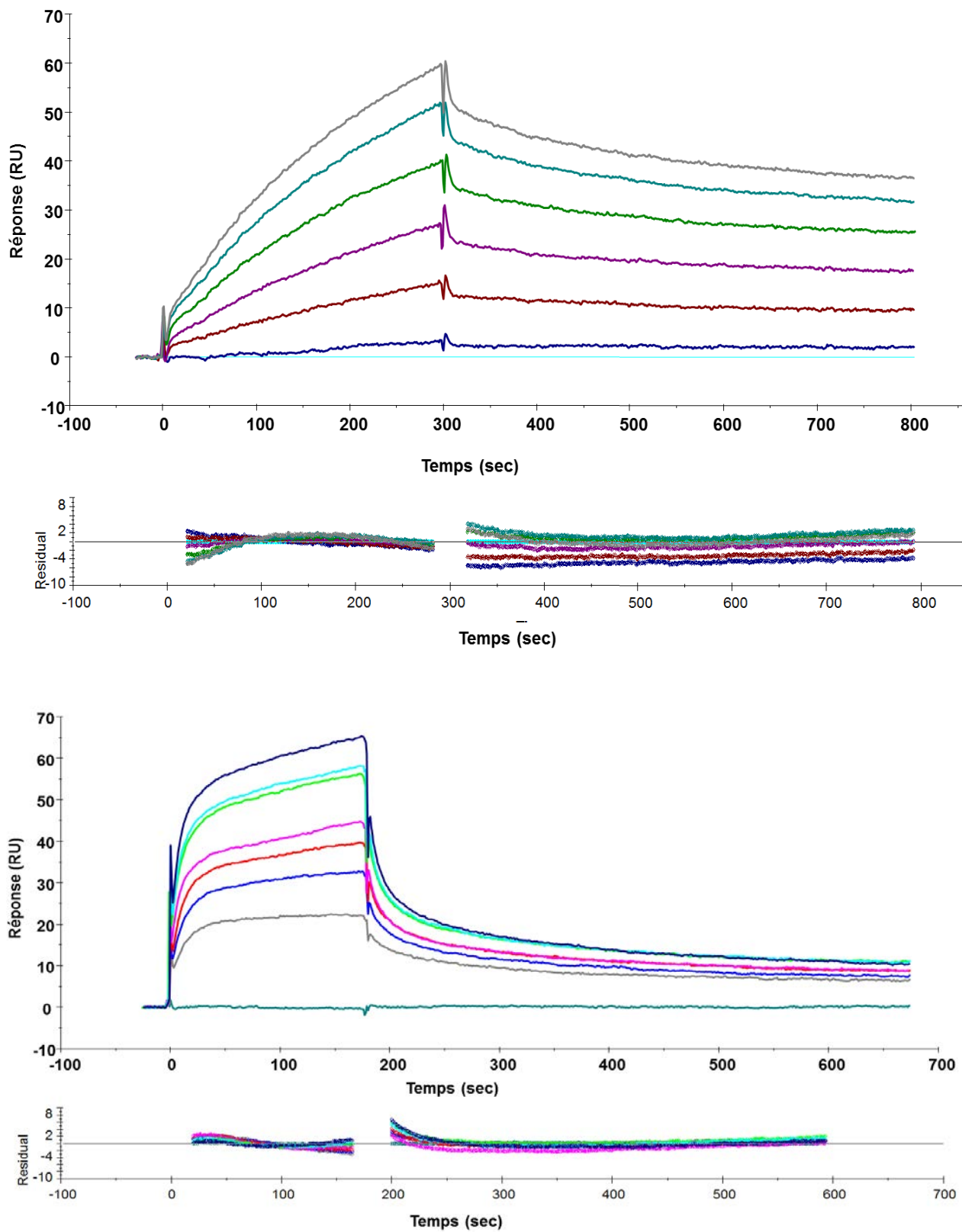


Figure 33 : Sensorgrammes des cinétiques d'intractions avec leurs '*Residuals*' correspondants. (A) cinétique de PABP-PAN3 wt.(B) cinétique de PABP-TOB.

Discussion et perspectives

L'objectif de mon travail était d'améliorer notre compréhension du rôle d'eRF3 dans la stabilité des ARNm. Nous nous sommes intéressés en particulier au rôle de la partie N-terminale d'eRF3 dans la désadénylation, étape limitante de la dégradation des ARNm. Nous avons réussi à mettre au point un système *in vitro* utilisant la technique de résonance plasmonique de surface (Biacore) qui nous a permis d'évaluer l'affinité d'eRF3 et de ses formes alléliques avec PABP quand il est multimérisé sur un modèle de queue Poly(A).

Avec cette queue Poly(A) modèle, la valence du système PABP-OligoA₁₂₀ est de 5 à 7 molécules de PABP/OligoA₁₂₀, ce qui se rapproche de la valence théorique attendue si l'on considère qu'une molécule de PABP couvre environ 20 résidus A. Cette queue Poly(A) synthétique nous permet donc de mimer la situation naturelle où, dans le cytoplasme des cellules, PABP recouvre la queue Poly(A) des ARNm. Nous trouvons que la dissociation du complexe PABP-OligoA₁₂₀ est de l'ordre de $1,75 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$, ce qui reflète la grande stabilité du complexe et montre que la dissociation du complexe PABP-Poly(A) est plus lente que celle du complexe eRF3-PABP qui est de l'ordre de $\sim 2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Cette dissociation lente du complexe PABP-Poly(A) n'interfererait donc pas avec la dissociation du complexe eRF3-PABP. Il a été décrit que la multimérisation de PABP sur la queue Poly(A) pourrait augmenter de 100 fois l'affinité de l'interaction entre PABP et eRF3 (Osawa et al., 2012). Nous ne retrouvons pas cette grande différence dans nos expériences. Cependant, dans l'expérience de microcalorimétrie d'Osawa, la queue poly(A) était représentée par un oligomère synthétique d'environ 1000 résidus adénosine, ce qui est très loin de notre modèle qui est beaucoup plus proche de la réalité. Nos résultats montrent aussi qu'eRF3 pourrait se détacher de PABP alors que PABP reste associé à la queue Poly(A) des ARNm. Ainsi, à la suite de la terminaison de la traduction, le complexe eRF3-eRF1 serait libéré et le domaine MLLE des molécules de PABP

restées attachées à la queue Poly(A) des ARNm serait alors accessible aux sites PAM2 des facteurs PAN3 et TOB, déclenchant la désadénylation.

Trois études ont mis en évidence une corrélation entre l'allèle 12-GGC et le risque de développement de cancer du sein et de l'estomac. Il a été montré que le gène eRF3a/GSPT1 est significativement surexprimé dans le cancer de l'estomac (Brito et al., 2005) et dans le cancer du sein (Malta-Vacas et al., 2009). Cependant cette élévation de l'expression d'eRF3a n'a pas été corrélée avec des variations du niveau d'expression d'autres facteurs de traduction et ainsi n'a pas été associée avec l'augmentation du taux de la traduction. Etant donné que l'activité de la terminaison de la traduction semble ne pas être affectée par ce polymorphisme, nous avons cherché à évaluer l'effet de la présence de l'allèle 12-GGC sur la désadénylation et donc sur la stabilité des ARNm, à travers l'étude de l'interaction des formes alléliques d'eRF3 avec PABP.

Nous avons utilisé deux systèmes d'étude, en absence et en présence de la queue Poly(A) des ARNm, afin de comparer les interactions des formes alléliques d'eRF3 avec PABP. Nous trouvons que les valeurs de K_D de l'interaction PABP-eRF3 sont de l'ordre du nano molaire. Ce qui est 2 ordre de grandeur plus petit que les valeurs de K_D déterminées par microcalométrie par (Kozlov et al., 2004 ; Osawa et al., 2012 ; Kononenko et al., 2010). Une variation comparable a été trouvée dans l'étude de l'interaction de Paip1 avec PABP faites par microcalométrie et SPR. Il a été proposé que l'utilisation du motif PAM2 isolé (Kozlov et al., 2004) à la place de Paip1 entier (Roy et al., 2002) pourrait être la cause des différences d'affinité entre Paip1 et PABP. Cependant, les méthodes utilisées pourraient aussi en partie être responsables de ces différences. La méthode SPR semble à l'heure actuelle beaucoup plus fiable et précise pour la mesure des paramètres cinétiques des interactions macromoléculaires que la titration calorimétrique.

Nos résultats montrent sans ambiguïté que la forme allélique 12-GGC présente l'affinité la plus faible pour PABP par rapport aux autres formes alléliques : eRF3a 10-GGC, 7-GGC et 11-GGC. L'isoforme eRF3b (qui ne possède pas d'expansion glycine) présente, quant à elle, l'affinité la plus élevée. Ces différences d'affinité sont même légèrement accentuées quand on utilise le modèle mimant la queue Poly(A) des ARNm (la valeur du K_D passe de 12 nM à 56 nM pour l'allèle 12-GGC). Les différences d'affinité sont essentiellement dues à des différences d'association entre les formes alléliques d'eRF3 avec PABP, c'est-à-dire à des différences au

niveau de la formation des complexes protéiques. Ce résultat montre l'effet de l'expansion de glycine sur l'interaction eRF3-PABP. L'expansion de glycine d'eRF3a dans le cas du 12-GGC pourrait interférer avec les sites PAM2 chevauchant d'eRF3a et gêner ainsi son interaction avec PABP. Du fait que l'expansion de glycine se trouve dans une région très peu structurée (Albrecht and Lengauer, 2004) et séparés seulement par une quarantaine de résidus des motifs PAM2 d'eRF3, la longueur de la répétition de glycine pourrait interagir avec les motifs PAM2 et entraîner des modifications de l'interaction PAM2-MLLE. Ainsi, cet effet serait maximal dans la reconnaissance PAM2-MLLE dans le cas d'eRF3 12-GGC et minimal en l'absence de l'expansion de glycine dans le cas d'eRF3b. Il faut cependant remarquer qu'il ne semble pas y avoir de relation proportionnelle entre la longueur de la répétition de glycine et l'affinité pour PABP, en l'effet, l'allèle 11-GGC semble plus afin que le 7-GGC.

Concernant la répartition des fréquences alléliques d'eRF3a dans les populations portugaise et iranienne, le 10-GGC est le plus fréquents à 72% et 68%, respectivement, le 9-GGC est complètement absent dans la population iranienne. Une fréquence de 78% pour le 10-GGC a été retrouvée avec le projet de séquençage NHLBI (*Exome Sequencing*) sur une population d'Afro-Américains et d'Américains d'Europe. L'allèle 9-GGC est présent à ~ 14% dans ces deux populations américaines dans lesquelles, de façon étonnante, l'allèle 12-GGC est complètement absent. Une étude plus élargie avec un échantillonnage englobant une plus grande diversité de la population mondiale pourrait donner une répartition plus sûre des fréquences alléliques d'eRF3a.

Dans notre étude comparée de différentes protéines partant un site PAM2, nous montrons aussi que l'affinité d'eRF3 avec PABP est environ 30 fois supérieure à celle de TOB et 40 fois supérieure à celle de PAN3. Nos résultats se rapprochent de ceux obtenus par d'autre laboratoires qui montrent, par des mesures d'interactions de fragments peptidiques, que l'affinité de PAN3 pour PABP est 40 fois plus faible que celle d'eRF3 et que l'affinité de TOB pour PABP est 30 fois plus faible que celle d'eRF3 (Siddiqui et al., 2007 ; Ruan et al 2010). Nos résultats semblent confirmer l'idée d'une compétition entre eRF3 et les facteurs de désadénylation pour la fixation sur PABP et sont donc en faveur d'un effet protecteur d'eRF3 contre la désadénylation. eRF3 inhiberait la fixation des complexes de désadénylation et la

désadénylation ne pourrait se produire qu'après le départ du complexe eRF1-eRF3 de la queue Poly(A) des ARNm.

L'ensemble de tous ces résultats nous amène à postuler que le couplage entre la terminaison de la traduction et la désadénylation est assuré par eRF3 et que dans le cas de la forme 12-GGC, ce processus pourrait être affecté ou dérégulé. Ce qui pourrait avoir un impact sur le niveau global des ARNm dans la cellule mais aussi sur la stabilité de certains ARNm spécifiques intervenant dans la prolifération cellulaire et dans la régulation de la synthèse protéique. Il est connu qu'une dérégulation de la stabilité de certains ARNm tels que ceux codant pour des suppresseurs de tumeurs peut conduire à la prolifération cellulaire et au développement du cancer. Les cellules eucaryotes possèdent plusieurs moyens pour réguler l'expression de leurs gènes. Bien que la régulation transcriptionnelle soit cruciale, le contrôle de la régulation des gènes dépend aussi fortement de la traduction et le mécanisme de la synthèse des protéines procure des moyens sophistiqués de modulation de la production des protéines clés. Les processus moléculaires qui contrôlent la traduction de l'ARNm chez les cellules eucaryotes sont extrêmement complexes et s'intègrent dans le contrôle du cycle cellulaire. Leur dérégulation peut apparaître à différents stades de la croissance cellulaire. C'est donc au niveau de la stabilité de certains ARNm qu'interviendrait l'expansion 12-GGC d'eRF3. Ainsi, cette petite séquence conservée du domaine N-terminal d'eRF3 aurait ainsi une influence primordiale dans les processus qui gouvernent la prolifération des cellules.

En ce qui concerne les autres formes d'eRF3, nous trouvons que les affinités des formes 11-GGC et 7-GGC pour PABP sont proches de celle d'eRF3a (10-GGC). Ce qui nous amène à dire que contrairement au 12-GGC, les 11-GGC et 7-GGC n'ont pas d'impact sur la stabilité des ARNm et donc sur le cancer. Cela pourrait expliquer l'absence de corrélation entre les formes 11-GGC et 7-GGC avec le cancer dans les études concernant la population portugaise. Cependant, dans la population iranienne, la forme 7-GGC a été corrélée avec le cancer du sein chez les homozygotes 7-GGC. Cette observation laisse penser que la forme 7-GGC pourrait aussi être impliquée dans des processus cellulaires qui conduiraient au cancer.

Nous avons étudié plus précisément les rôles des motifs PAM2 au moyen de mutants de ces deux motifs. Nous montrons que les mutations dans le motif PAM2-N (eRF3a-KAKA) réduisent considérablement l'affinité d'eRF3 avec PABP. Les mutations dans le motif PAM2-C

(eRF3a-AKA), par contre, ne diminuent que faiblement l'affinité d'eRF3 pour PABP. Ces mêmes variations sont obtenues quand PABP est multimérisé sur la queue Poly (A). Nos résultats sont proches de ceux obtenus par Singh et al. (2008) qui montre que le motif PAM2-N est indispensable à l'interaction eRF3-PABP et non le motif PAM2-C. De plus, les expériences d'Osawa et al. (2012) montrent la forte implication du motif PAM2-N dans l'interaction. Les deux motifs peptidiques PAM2-N et PAM2-C d'eRF3 associée à PABP ont été étudiés par cristallographie (Kozlov et al., 2010). Cette étude met en évidence les résidus les plus impliqués dans l'interaction eRF3-PABP et ces résidus sont plutôt situés sur le motif PAM2-N. Par ailleurs, nous trouvons une plus forte diminution des interactions lorsque ces mêmes mutations sont effectuées dans la forme 12-GGC. Les mutations du motif PAM2-N de la forme 12-GGC abolissent complètement l'interaction eRF3-PABP. Par contre les mutations du motif PAM2-C n'entraînent pas la perte totale de l'interaction. En accord avec les résultats de la littérature, nos résultats montrent que le motif PAM2-N d'eRF3 est primordial pour l'interaction eRF3-PABP. Les résultats avec l'allèle 12-GGC confirment la forte implication du motif PAM2-N dans l'interaction eRF3-PABP et la présence d'une coopérativité entre l'expansion glycine et les motifs PAM2 d'eRF3.

Notre modèle utilisant une molécule d'ARN mimant la queue Poly(A) des ARNm pourrait être un outil utile pour étudier la complexité des interactions entre PABP et ses nombreux partenaires. La résonance plasmonique de surface semble être une méthode de choix pour de telles études. Nous avons montré à travers deux modèles (en absence et en présence de la queue Poly(A) des ARNm) que la forme impliquée dans le risque de cancer, 12-GGC, a une faible affinité pour PABP, comparé aux autres formes alléliques. Nous suggérons que la partie N-terminale d'eRF3 est cruciale pour la régulation de la désadénylation à travers son interaction avec PABP. Certes, il serait souhaitable de confirmer nos résultats par d'autres techniques *in vivo*.

Afin de mieux comprendre la coopérativité entre l'expansion glycine et les sites PAM2, il serait intéressant d'étudier d'un point de vue structural l'interaction PAM2-MLLE en intégrant l'expansion glycine. Il serait aussi intéressant d'étudier la compétition entre les facteurs de désadénylation PAN3 et TOB avec la forme allélique 12-GGC sur le modèle de queue Poly(A) que nous avons mis au point.

Bibliographie

- Albrecht, M., and Lengauer, T. (2004). Survey on the PABC recognition motif PAM2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *316*, 129–138.
- Amrani, N., Dong, S., He, F., Ganesan, R., Ghosh, S., Kervestin, S., Li, C., Mangus, D.A., Spatrick, P., and Jacobson, A. (2006). Aberrant termination triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Biochem. Soc. Trans.* *34*, 39–42.
- Berlanga, J.J., Baass, A., and Sonenberg, N. (2006). Regulation of poly(A) binding protein function in translation: Characterization of the Paip2 homolog, Paip2B. *RNA* *12*, 1556–1568.
- Bhat, M., Robichaud, N., Hulea, L., Sonenberg, N., Pelletier, J., and Topisirovic, I. (2015). Targeting the translation machinery in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* *14*, 261–278.
- Bhattacharjee, R.B., and Bag, J. (2012). Depletion of nuclear poly(A) binding protein PABPN1 produces a compensatory response by cytoplasmic PABP4 and PABP5 in cultured human cells. *PloS One* *7*, e53036.
- Blanchet, S., Cornu, D., Argentini, M., and Namy, O. (2014). New insights into the incorporation of natural suppressor tRNAs at stop codons in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* *42*, 10061–10072.
- Blanchet, S., Rowe, M., Von der Haar, T., Fabret, C., Demais, S., Howard, M.J., and Namy, O. (2015). New insights into stop codon recognition by eRF1. *Nucleic Acids Res.* *43*, 3298–3308.

- Blobel, G. (1972). Protein tightly bound to globin mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47, 88–95.
- Boeck, R., Tarun, S., Rieger, M., Deardorff, J.A., Müller-Auer, S., and Sachs, A.B. (1996). The yeast Pan2 protein is required for poly(A)-binding protein-stimulated poly(A)-nuclease activity. *J. Biol. Chem.* 271, 432–438.
- Brito, M., Malta-Vacas, J., Carmona, B., Aires, C., Costa, P., Martins, A.P., Ramos, S., Conde, A.R., and Monteiro, C. (2005). Polyglycine expansions in eRF3/GSPT1 are associated with gastric cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 26, 2046–2049.
- Brune, C., Munchel, S.E., Fischer, N., Podtelejnikov, A.V., and Weis, K. (2005). Yeast poly(A)-binding protein Pab1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm and functions in mRNA export. *RNA* 11, 517–531.
- Chauvin, C., and Jean-Jean, O. (2008). Proteasomal degradation of human release factor eRF3a regulates translation termination complex formation. *RNA* 14, 240–245.
- Chauvin, C., Salhi, S., Le Goff, C., Viranaicken, W., Diop, D., and Jean-Jean, O. (2005). Involvement of human release factors eRF3a and eRF3b in translation termination and regulation of the termination complex formation. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5801–5811.
- Chauvin, C., Salhi, S., and Jean-Jean, O. (2007). Human eukaryotic release factor 3a depletion causes cell cycle arrest at G1 phase through inhibition of the mTOR pathway. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5619–5629.
- Chen, C.-Y.A., and Shyu, A.-B. (2011). Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 2, 167–183.
- Cheng, Z., Saito, K., Pisarev, A.V., Wada, M., Pisareva, V.P., Pestova, T.V., Gajda, M., Round, A., Kong, C., Lim, M., et al. (2009). Structural insights into eRF3 and stop codon recognition by eRF1. *Genes Dev.* 23, 1106–1118.

- Cosson, B., Berkova, N., Couturier, A., Chabelskaya, S., Philippe, M., and Zhouravleva, G. (2002). Poly(A)-binding protein and eRF3 are associated in vivo in human and *Xenopus* cells. *Biol. Cell* 94, 205–216.
- Cosson, B., Couturier, A., Chabelskaya, S., Kiktev, D., Inge-Vechtomov, S., Philippe, M., and Zhouravleva, G. (2002). Poly(A)-binding protein acts in translation termination via eukaryotic release factor 3 interaction and does not influence [PSI(+)] propagation. *Mol. Cell. Biol.* 22, 3301–3315.
- Craig, A.W., Haghghat, A., Yu, A.T., and Sonenberg, N. (1998). Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. *Nature* 392, 520–523.
- Von Der Haar, T., Ball, P.D., and McCarthy, J.E. (2000). Stabilization of eukaryotic initiation factor 4E binding to the mRNA 5'-Cap by domains of eIF4G. *J. Biol. Chem.* 275, 30551–30555.
- Eliseeva, I.A., Lyabin, D.N., and Ovchinnikov, L.P. (2013). Poly(A)-binding proteins: structure, domain organization, and activity regulation. *Biochemistry (Mosc.)* 78, 1377–1391.
- Van den Elzen, A.M.G., Henri, J., Lazar, N., Gas, M.E., Durand, D., Lacroute, F., Nicaise, M., van Tilbeurgh, H., Séraphin, B., and Graille, M. (2010). Dissection of Dom34-Hbs1 reveals independent functions in two RNA quality control pathways. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1446–1452.
- Eyler, D.E., Wehner, K.A., and Green, R. (2013). Eukaryotic release factor 3 is required for multiple turnovers of peptide release catalysis by eukaryotic release factor 1. *J. Biol. Chem.* 288, 29530–29538.
- Ezzeddine, N., Chang, T.-C., Zhu, W., Yamashita, A., Chen, C.-Y.A., Zhong, Z., Yamashita, Y., Zheng, D., and Shyu, A.-B. (2007). Human TOB, an Antiproliferative Transcription Factor, Is a Poly(A)-Binding Protein-Dependent Positive Regulator of Cytoplasmic mRNA Deadenylation. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7791–7801.

- Ezzeddine, N., Chen, C.-Y.A., and Shyu, A.-B. (2012). Evidence Providing New Insights into TOB-Promoted Deadenylation and Supporting a Link between TOB's Deadenylation-Enhancing and Antiproliferative Activities. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 1089–1098.
- Fabian, M.R., and Sonenberg, N. (2012). The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 586–593.
- Fabian, M.R., Cieplak, M.K., Frank, F., Morita, M., Green, J., Srikumar, T., Nagar, B., Yamamoto, T., Raught, B., Duchaine, T.F., et al. (2011). miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 1211–1217.
- Fatscher, T., Boehm, V., Weiche, B., and Gehring, N.H. (2014). The interaction of cytoplasmic poly(A)-binding protein with eukaryotic initiation factor 4G suppresses nonsense-mediated mRNA decay. *RNA* *20*, 1579–1592.
- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* *19*, 92–105.
- Frolova, L., Le Goff, X., Rasmussen, H.H., Cheperegin, S., Drugeon, G., Kress, M., Arman, I., Haenni, A.L., Celis, J.E., and Philippe, M. (1994). A highly conserved eukaryotic protein family possessing properties of polypeptide chain release factor. *Nature* *372*, 701–703.
- Funakoshi, Y., Doi, Y., Hosoda, N., Uchida, N., Osawa, M., Shimada, I., Tsujimoto, M., Suzuki, T., Katada, T., and Hoshino, S. (2007). Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases. *Genes Dev.* *21*, 3135–3148.
- Garneau, N.L., Wilusz, J., and Wilusz, C.J. (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 113–126.
- Gray, N.K., Collier, J.M., Dickson, K.S., and Wickens, M. (2000). Multiple portions of poly(A)-binding protein stimulate translation in vivo. *EMBO J.* *19*, 4723–4733.

- Grzmil, M., and Hemmings, B.A. (2012). Translation regulation as a therapeutic target in cancer. *Cancer Res.* 72, 3891–3900.
- Hegde, R., Srinivasula, S.M., Datta, P., Madesh, M., Wassell, R., Zhang, Z., Cheong, N., Nejme, J., Fernandes-Alnemri, T., Hoshino, S., et al. (2003). The polypeptide chain-releasing factor GSPT1/eRF3 is proteolytically processed into an IAP-binding protein. *J. Biol. Chem.* 278, 38699–38706.
- Hoshino, S. (2012). Mechanism of the initiation of mRNA decay: role of eRF3 family G proteins. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 3, 743–757.
- Hoshino, S., Miyazawa, H., Enomoto, T., Hanaoka, F., Kikuchi, Y., Kikuchi, A., and Ui, M. (1989). A human homologue of the yeast GST1 gene codes for a GTP-binding protein and is expressed in a proliferation-dependent manner in mammalian cells. *EMBO J.* 8, 3807–3814.
- Hoshino, S., Imai, M., Mizutani, M., Kikuchi, Y., Hanaoka, F., Ui, M., and Katada, T. (1998). Molecular cloning of a novel member of the eukaryotic polypeptide chain-releasing factors (eRF). Its identification as eRF3 interacting with eRF1. *J. Biol. Chem.* 273, 22254–22259.
- Hoshino, S., Hosoda, N., Araki, Y., Kobayashi, T., Uchida, N., Funakoshi, Y., and Katada, T. (1999). Novel function of the eukaryotic polypeptide-chain releasing factor 3 (eRF3/GSPT) in the mRNA degradation pathway. *Biochem.* 64, 1367–1372.
- Hosoda, N., Kobayashi, T., Uchida, N., Funakoshi, Y., Kikuchi, Y., Hoshino, S., and Katada, T. (2003). Translation termination factor eRF3 mediates mRNA decay through the regulation of deadenylation. *J. Biol. Chem.* 278, 38287–38291.
- Hosoda, N., Lejeune, F., and Maquat, L.E. (2006). Evidence that poly(A) binding protein C1 binds nuclear pre-mRNA poly(A) tails. *Mol. Cell. Biol.* 26, 3085–3097.
- Huntzinger, E., Braun, J.E., Heimstädt, S., Zekri, L., and Izaurralde, E. (2010). Two PABPC1-binding sites in GW182 proteins promote miRNA-mediated gene silencing. *EMBO J.* 29, 4146–4160.

- Imataka, H., Gradi, A., and Sonenberg, N. (1998). A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J.* *17*, 7480–7489.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2012). Termination and post-termination events in eukaryotic translation. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* *86*, 45–93.
- Jakobsen, C.G., Seggaard, T.M., Jean-Jean, O., Frolova, L., and Justesen, J. (2001). Identification of a novel termination release factor eRF3b expressing the eRF3 activity in vitro and in vivo. *Mol. Biol. (Mosk.)* *35*, 672–681.
- Kapp, L.D., and Lorsch, J.R. (2004). The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu. Rev. Biochem.* *73*, 657–704.
- Karim, M.M., Svitkin, Y.V., Kahvejian, A., De Crescenzo, G., Costa-Mattioli, M., and Sonenberg, N. (2006). A mechanism of translational repression by competition of Paip2 with eIF4G for poly(A) binding protein (PABP) binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 9494–9499.
- Kashima, I., Yamashita, A., Izumi, N., Kataoka, N., Morishita, R., Hoshino, S., Ohno, M., Dreyfuss, G., and Ohno, S. (2006). Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* *20*, 355–367.
- Kebaara, B.W., and Atkin, A.L. (2009). Long 3'-UTRs target wild-type mRNAs for nonsense-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* *37*, 2771–2778.
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M.J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Golan, D.E., and Anderson, P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J. Cell Biol.* *169*, 871–884.
- Khaleghpour, K., Kahvejian, A., De Crescenzo, G., Roy, G., Svitkin, Y.V., Imataka, H., O'Connor-McCourt, M., and Sonenberg, N. (2001). Dual interactions of the translational repressor Paip2 with poly(A) binding protein. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 5200–5213.

- Kikuchi, Y., Shimatake, H., and Kikuchi, A. (1988). A yeast gene required for the G1-to-S transition encodes a protein containing an A-kinase target site and GTPase domain. *EMBO J.* 7, 1175–1182.
- Kim, H.-J., Raphael, A.R., LaDow, E.S., McGurk, L., Weber, R., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., Finkbeiner, S., Gitler, A.D., and Bonini, N.M. (2014). Therapeutic modulation of eIF2 α -phosphorylation rescues TDP-43 toxicity in amyotrophic lateral sclerosis disease models. *Nat. Genet.* 46, 152–160.
- Kobayashi, T., Funakoshi, Y., Hoshino, S., and Katada, T. (2004). The GTP-binding Release Factor eRF3 as a Key Mediator Coupling Translation Termination to mRNA Decay. *J. Biol. Chem.* 279, 45693–45700.
- Kong, C., Ito, K., Walsh, M.A., Wada, M., Liu, Y., Kumar, S., Barford, D., Nakamura, Y., and Song, H. (2004). Crystal structure and functional analysis of the eukaryotic class II release factor eRF3 from *S. pombe*. *Mol. Cell* 14, 233–245.
- Kononenko, A.V., Mitkevich, V.A., Atkinson, G.C., Tenson, T., Dubovaya, V.I., Frolova, L.Y., Makarov, A.A., and Haurlyiuk, V. (2010). GTP-dependent structural rearrangement of the eRF1:eRF3 complex and eRF3 sequence motifs essential for PABP binding. *Nucleic Acids Res.* 38, 548–558.
- Kozak, M. (1978). How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell* 15, 1109–1123.
- Kozlov, G., and Gehring, K. (2010). Molecular basis of eRF3 recognition by the MLLE domain of poly(A)-binding protein. *PLoS One* 5, e10169.
- Kozlov, G., Trempe, J.F., Khaleghpour, K., Kahvejian, A., Ekiel, I., and Gehring, K. (2001). Structure and function of the C-terminal PABC domain of human poly(A)-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 4409–4413.
- Kozlov, G., De Crescenzo, G., Lim, N.S., Siddiqui, N., Fantus, D., Kahvejian, A., Trempe, J.-F., Elias, D., Ekiel, I., Sonenberg, N., et al. (2004). Structural basis of ligand recognition by

- PABC, a highly specific peptide-binding domain found in poly(A)-binding protein and a HECT ubiquitin ligase. *EMBO J.* 23, 272–281.
- Kozlov, G., Ménade, M., Rosenauer, A., Nguyen, L., and Gehring, K. (2010). Molecular determinants of PAM2 recognition by the MLLE domain of poly(A)-binding protein. *J. Mol. Biol.* 397, 397–407.
- Kühn, U., and Wahle, E. (2004). Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1678, 67–84.
- Kulkarni, S.D., Muralidharan, B., Panda, A.C., Bakthavachalu, B., Vindu, A., and Seshadri, V. (2011). Glucose-stimulated translation regulation of insulin by the 5' UTR-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 286, 14146–14156.
- Kushnirov, V.V., Ter-Avanesyan, M.D., Telckov, M.V., Surguchov, A.P., Smirnov, V.N., and Inge-Vechtomov, S.G. (1988). Nucleotide sequence of the SUP2 (SUP35) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 66, 45–54.
- Lee, J.A., Park, J.E., Lee, D.H., Park, S.G., Myung, P.K., Park, B.C., and Cho, S. (2008). G1 to S phase transition protein 1 induces apoptosis signal-regulating kinase 1 activation by dissociating 14-3-3 from ASK1. *Oncogene* 27, 1297–1305.
- Lee, T., Li, Y.R., Chesi, A., Hart, M.P., Ramos, D., Jethava, N., Hosangadi, D., Epstein, J., Hodges, B., Bonini, N.M., et al. (2011). Evaluating the prevalence of polyglutamine repeat expansions in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 76, 2062–2065.
- Li, M., Wang, J., Yang, L., Gao, P., Tian, Q.-B., and Liu, D.-W. (2014). eRF3b, a biomarker for hepatocellular carcinoma, influences cell cycle and phosphorylation status of 4E-BP1. *PloS One* 9, e86371.
- Lim, C., Lee, J., Choi, C., Kilman, V.L., Kim, J., Park, S.M., Jang, S.K., Allada, R., and Choe, J. (2011). The novel gene twenty-four defines a critical translational step in the *Drosophila* clock. *Nature* 470, 399–403.

- Lin, J., Fabian, M., Sonenberg, N., and Meller, A. (2012). Nanopore detachment kinetics of poly(A) binding proteins from RNA molecules reveals the critical role of C-terminus interactions. *Biophys. J.* *102*, 1427–1434.
- Malta-Vacas, J., Aires, C., Costa, P., Conde, A.R., Ramos, S., Martins, A.P., Monteiro, C., and Brito, M. (2005). Differential expression of the eukaryotic release factor 3 (eRF3/GSPT1) according to gastric cancer histological types. *J. Clin. Pathol.* *58*, 621–625.
- Malta-Vacas, J., Chauvin, C., Gonçalves, L., Nazaré, A., Carvalho, C., Monteiro, C., Bagrel, D., Jean-Jean, O., and Brito, M. (2009). eRF3a/GSPT1 12-GGC allele increases the susceptibility for breast cancer development. *Oncol. Rep.* *21*, 1551–1558.
- Martineau, Y., Derry, M.C., Wang, X., Yanagiya, A., Berlanga, J.J., Shyu, A.-B., Imataka, H., Gehring, K., and Sonenberg, N. (2008). Poly(A)-binding protein-interacting protein 1 binds to eukaryotic translation initiation factor 3 to stimulate translation. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 6658–6667.
- Mauxion, F., Chen, C.-Y.A., Séraphin, B., and Shyu, A.-B. (2009). BTG/TOB factors impact deadenylases. *Trends Biochem. Sci.* *34*, 640–647.
- Mazzoni, C., and Falcone, C. (2011). mRNA stability and control of cell proliferation. *Biochem. Soc. Trans.* *39*, 1461–1465.
- Miri, M., Hemati, S., Safari, F., and Tavassoli, M. (2012). GGC_n polymorphism of eRF3a/GSPT1 gene and breast cancer susceptibility. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* *29*, 1581–1585.
- Moretti, F., Kaiser, C., Zdanowicz-Specht, A., and Hentze, M.W. (2012). PABP and the poly(A) tail augment microRNA repression by facilitated miRISC binding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 603–608.
- Mullin, C., Duning, K., Barnekow, A., Richter, D., Kremerskothen, J., and Mohr, E. (2004). Interaction of rat poly(A)-binding protein with poly(A)- and non-poly(A) sequences is preferentially mediated by RNA recognition motifs 3+4. *FEBS Lett.* *576*, 437–441.

- Murina, O.A., Moskalenko, S.E., and Zhuravleva, G.A. (2010). [Overexpression of genes encoding tRNA(Tyr) AND tRNA(Gln) improves viability of nonsense mutants in SUP45 gene in yeast *Saccharomyces cerevisiae*]. *Mol. Biol. (Mosk.)* *44*, 301–310.
- Narod, S.A., and Foulkes, W.D. (2004). BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 665–676.
- Norbury, C.J. (2013). Cytoplasmic RNA: a case of the tail wagging the dog. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 643–653.
- Ogami, K., Hosoda, N., Funakoshi, Y., and Hoshino, S. (2014). Antiproliferative protein Tob directly regulates c-myc proto-oncogene expression through cytoplasmic polyadenylation element-binding protein CPEB. *Oncogene* *33*, 55–64.
- Ohyama, T., Nagata, T., Tsuda, K., Kobayashi, N., Imai, T., Okano, H., Yamazaki, T., and Katahira, M. (2012). Structure of Musashi1 in a complex with target RNA: the role of aromatic stacking interactions. *Nucleic Acids Res.* *40*, 3218–3231.
- Osawa, M., Hosoda, N., Nakanishi, T., Uchida, N., Kimura, T., Imai, S., Machiyama, A., Katada, T., Hoshino, S., and Shimada, I. (2012). Biological role of the two overlapping poly(A)-binding protein interacting motifs 2 (PAM2) of eukaryotic releasing factor eRF3 in mRNA decay. *RNA* *18*, 1957–1967.
- Parker, R., and Song, H. (2004). The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 121–127.
- Pisarev, A.V., Skabkin, M.A., Pisareva, V.P., Skabkina, O.V., Rakotondrafara, A.M., Hentze, M.W., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2010). The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling. *Mol. Cell* *37*, 196–210.
- Pisareva, V.P., Pisarev, A.V., Hellen, C.U., Rodnina, M.V. and Pestova, T.V. (2006) Kinetic analysis of interaction of eukaryotic release factor 3 with guanine nucleotides. *J Biol Chem*, **281**, 40224-40235.

- Ramaswami, M., Taylor, J.P., and Parker, R. (2013). Altered Ribostasis: RNA-Protein Granules in Degenerative Disorders. *Cell* *154*, 727–736.
- Roy, G., De Crescenzo, G., Khaleghpour, K., Kahvejian, A., O'Connor-McCourt, M., and Sonenberg, N. (2002). Paip1 interacts with poly(A) binding protein through two independent binding motifs. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 3769–3782.
- Roque, S., Cerciati, M., Gaugué, I., Mora, L., Floch, A.G., de Zamaroczy, M., Heurgué-Hamard, V., and Kervestin, S. (2015). Interaction between the poly(A)-binding protein Pab1 and the eukaryotic release factor eRF3 regulates translation termination but not mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA N. Y. N* *21*, 124–134.
- Ruan, L., Osawa, M., Hosoda, N., Imai, S., Machiyama, A., Katada, T., Hoshino, S., and Shimada, I. (2010). Quantitative characterization of Tob interactions provides the thermodynamic basis for translation termination-coupled deadenylase regulation. *J. Biol. Chem.* *285*, 27624–27631.
- Sachs, A.B., and Davis, R.W. (1989). The poly(A) binding protein is required for poly(A) shortening and 60S ribosomal subunit-dependent translation initiation. *Cell* *58*, 857–867.
- Sachs, A.B., and Deardorff, J.A. (1992). Translation initiation requires the PAB-dependent poly(A) ribonuclease in yeast. *Cell* *70*, 961–973.
- Sachs, A.B., Davis, R.W., and Kornberg, R.D. (1987). A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability. *Mol. Cell. Biol.* *7*, 3268–3276.
- Safaei, N., Kozlov, G., Noronha, A.M., Xie, J., Wilds, C.J., and Gehring, K. (2012). Interdomain allostery promotes assembly of the poly(A) mRNA complex with PABP and eIF4G. *Mol. Cell* *48*, 375–386.
- Salas-Marco, J., and Bedwell, D.M. (2004). GTP hydrolysis by eRF3 facilitates stop codon decoding during eukaryotic translation termination. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 7769–7778.

- Siddiqui, N., Mangus, D.A., Chang, T.-C., Palermino, J.-M., Shyu, A.-B., and Gehring, K. (2007). Poly(A) nuclease interacts with the C-terminal domain of polyadenylate-binding protein domain from poly(A)-binding protein. *J. Biol. Chem.* *282*, 25067–25075.
- Silva Neto, B., Koff, W.J., Biolchi, V., Brenner, C., Biolo, K.D., Spritzer, P.M., and Brum, I.S. (2008). Polymorphic CAG and GGC repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: analysis of a Brazilian population. *Cancer Invest.* *26*, 74–80.
- Silvera, D., Formenti, S.C., and Schneider, R.J. (2010). Translational control in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 254–266.
- Simms, C.L., Hudson, B.H., Mosior, J.W., Rangwala, A.S., and Zaher, H.S. (2014). An active role for the ribosome in determining the fate of oxidized mRNA. *Cell Rep.* *9*, 1256–1264.
- Simón, E., and Séraphin, B. (2007). A specific role for the C-terminal region of the Poly(A)-binding protein in mRNA decay. *Nucleic Acids Res.* *35*, 6017–6028.
- Singh, G., Rebbapragada, I., and Lykke-Andersen, J. (2008). A competition between stimulators and antagonists of Upf complex recruitment governs human nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS Biol.* *6*, e111.
- Skabkin, M.A., Skabkina, O.V., Dhote, V., Komar, A.A., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2010). Activities of Ligatin and MCT-1/DENR in eukaryotic translation initiation and ribosomal recycling. *Genes Dev.* *24*, 1787–1801.
- Sonenberg, N., and Hinnebusch, A.G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* *136*, 731–745.
- Song, H., Mugnier, P., Das, A.K., Webb, H.M., Evans, D.R., Tuite, M.F., Hemmings, B.A., and Barford, D. (2000). The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1--mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell* *100*, 311–321.
- Standart, N., and Minshall, N. (2008). Translational control in early development: CPEB, P-bodies and germinal granules. *Biochem. Soc. Trans.* *36*, 671–676.

- Tarun, S.Z., and Sachs, A.B. (1996). Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J.* *15*, 7168–7177.
- Thakur, A., Xu, H., Wang, Y., Bollig, A., Biliran, H., and Liao, J.D. (2005). The role of X-linked genes in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *93*, 135–143.
- Tsukahara, F., Urakawa, I., Hattori, M., Hirai, M., Ohba, K., Yoshioka, T., Sakaki, Y., and Muraki, T. (1998). Molecular characterization of the mouse *mtprd* gene, a homologue of human TPRD: unique gene expression suggesting its critical role in the pathophysiology of Down syndrome. *J. Biochem. (Tokyo)* *123*, 1055–1063.
- Uchida, N., Hoshino, S.-I., Imataka, H., Sonenberg, N., and Katada, T. (2002). A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in Cap/Poly(A)-dependent translation. *J. Biol. Chem.* *277*, 50286–50292.
- Uchida, N., Hoshino, S.-I., and Katada, T. (2004). Identification of a human cytoplasmic poly(A) nuclease complex stimulated by poly(A)-binding protein. *J. Biol. Chem.* *279*, 1383–1391.
- Volkov, K., Osipov, K., Valouev, I., Inge-Vechtomov, S., and Mironova, L. (2007). N-terminal extension of *Saccharomyces cerevisiae* translation termination factor eRF3 influences the suppression efficiency of *sup35* mutations. *FEMS Yeast Res.* *7*, 357–365.
- Wada, M., and Ito, K. (2014). A genetic approach for analyzing the co-operative function of the tRNA mimicry complex, eRF1/eRF3, in translation termination on the ribosome. *Nucleic Acids Res.* *42*, 7851–7866.
- Wahle, E., and Winkler, G.S. (2013). RNA decay machines: Deadenylation by the Ccr4–Not and Pan2–Pan3 complexes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* *1829*, 561–570.
- Wang, Z., Hong, Y., Zou, L., Zhong, R., Zhu, B., Shen, N., Chen, W., Lou, J., Ke, J., Zhang, T., et al. (2014). Reelin gene variants and risk of autism spectrum disorders: an integrated meta-analysis. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. Off. Publ. Int. Soc. Psychiatr. Genet.* *165B*, 192–200.

- Wiederhold, K., and Passmore, L.A. (2010). Cytoplasmic deadenylation: regulation of mRNA fate. *Biochem. Soc. Trans.* *38*, 1531–1536.
- Winkler, G.S., and Balacco, D.L. (2013). Heterogeneity and complexity within the nuclease module of the Ccr4-Not complex. *Front. Genet.* *4*, 296.
- Xie, J., Kozlov, G., and Gehring, K. (2014). The “tale” of poly(A) binding protein: the MLLE domain and PAM2-containing proteins. *Biochim. Biophys. Acta* *1839*, 1062–1068.
- Yamashita, A., Chang, T.-C., Yamashita, Y., Zhu, W., Zhong, Z., Chen, C.-Y.A., and Shyu, A.-B. (2005). Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 1054–1063.
- Yang, R., Gaidamakov, S.A., Xie, J., Lee, J., Martino, L., Kozlov, G., Crawford, A.K., Russo, A.N., Conte, M.R., Gehring, K., et al. (2011). La-related protein 4 binds poly(A), interacts with the poly(A)-binding protein MLLE domain via a variant PAM2w motif, and can promote mRNA stability. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 542–556.
- Zaborske, J.M., Zeitler, B., and Culbertson, M.R. (2013). Multiple transcripts from a 3'-UTR reporter vary in sensitivity to nonsense-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* *8*, e80981.
- Zekri, L., Huntzinger, E., Heimstädt, S., and Izaurralde, E. (2009). The silencing domain of GW182 interacts with PABPC1 to promote translational repression and degradation of microRNA targets and is required for target release. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 6220–6231.
- Zekri, L., Kuzuoğlu-Öztürk, D., and Izaurralde, E. (2013). GW182 proteins cause PABP dissociation from silenced miRNA targets in the absence of deadenylation. *EMBO J.* *32*, 1052–1065.
- Zhouravleva, G., Frolova, L., Le Goff, X., Le Guellec, R., Inge-Vechtomov, S., Kisselev, L., and Philippe, M. (1995). Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. *EMBO J.* *14*, 4065–4072.

Zhouravleva, G., Schepachev, V., Petrova, A., Tarasov, O., and Inge-Vechtomov, S. (2006). Evolution of translation termination factor eRF3: is GSPT2 generated by retrotransposition of GSPT1's mRNA? *IUBMB Life* 58, 199–202.